دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری
پژوهشنامه اصلاح گیاهان زراعی

"مقاله پژوهشی"

بررسی صفات مورفولوژیک و بیوشیمیایی در جوانه‌های ارقام کلم بروکلی تحت تنش مانیتول

شعله کیانی[۱]، نادعلی بابائیان جلودار[۲]، هاله اخوان نیاکی[۳]، نادعلی باقری[۴] و حمید نجفی زرینی[۴]

۱- دانشجوی دکتری اصلاح نباتات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری
۲- استاد، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، (نویسنده مسوول: n.babaeiyan@umz.ac.ir)
۳- استاد، دانشگاه علوم پزشکی بابل، انستیتو تحقیقات بیولوژی سلولی و مولکولی
۴- دانشیار، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری
تاریخ دریافت: ۹۶/۱۰/۲۵ تاریخ پذیرش: ۹۷/۴/۲۳
صفحه: ۲۱۳ تا ۲۲۴

چکیده

تنش‌های زنده و غیرزنده از مهم‌ترین عوامل تاثیرگذار روی تولیدات کشاورزی می‌باشند، برای ارزیابی اثر تنش خشکی ناشی از مانیتول در سه سطح (صفر، ۸۸ و ۱۷۶ میلی‌مولار) بر صفات بیوشیمیایی، مرفولوژیکی و پلی‌فنلیک شش ژنوتیپ بروکلی (گرین ماجیک، ساکورا، هراکلیون، ماراتون، ماتسوری و کاستل دم)، آزمایش فاکتوریل در قالب طرح پایه کاملا تصادفی در دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری در سال ۱۳۹۵ اجرا شد. نتایج نشان داد که استفاده از مانیتول به‌عنوان تنش خشکی، موجب کاهش معنی‌دار وزن خشک (۱۰ تا ۲۵ درصد) و طول جوانه (۱۲ تا ۳۰ درصد) شد. فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی به‌طور متوسط ۱۹ تا ۲۳۰ و فعالیت۲ ،۲-دیفنیل-۱-پریکیل هیدرازیل ، ۳=$\bar{y}$ در شرایط استفاده از مانیتول در سطح ۱۷۶ میلی‌مولار نسبت به شاهد افزایش معنی‌داری در سطح پنج درصد داشته است. همچنین نتایج نشان داد که تنش مانیتول، مقدار آنتی‌اکسیدان سولفورفان را افزایش داد، به‌طوری‌که پاسخ سولفورفان به سطوح تنش در ژنوتیپ‌های مختلف، متفاوت بود. ماراتون بالاترین میزان سولفورفان را در بین تمام ژنوتیپ‌ها، در شرایط طبیعی (۶/۱۳۹) و تحت تنش (۱۴/۱۲۲) نشان داد. نتایج حاصل از تجزیه مسیر نشان داد که فنل و برخی از آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی دارای رابطه مستقیم و معنی‌داری با سولفورفان در هر دو شرایط نرمال و تنش بودند. تجزیه به مولفه اصلی نشان داد که ۷۳/۵ درصد در شرایط نرمال و ۶۸ درصد در شرایط تنش از تغییرات کل، توسط دو مولفه اول توجیه شدند. نتایج بای‌پلات، ژنوتیپ‌های مورد مطالعه را در سه گروه قرار داد. در شرایط تنش، سولفورفان و آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و ژنوتیپ ماراتون در گروه اول، آنتوسیانین، فلاونویید و مالون دی الدئید و ژنوتیپ‌های هراکلبون و گرین ماجیک در گروه دوم و ۲ ،۲-دیفنیل-۱-پریکیل هیدرازیل، وزن خشک و طول جوانه و ژنوتیپ‌های ماتسوری و کاستل دم در گروه سوم قرار گرفتند. در نتیجه، ماراتون مناسب‌ترین ژنوتیپ برای کشت اقتصادی در مزارع کشاورزی بود.

واژه‌های کلیدی: تحلیل عاملی، سولفورفان، فلاونوئید، کلم بروکلی، مالون دی آلدئید

مقدمه

کلم بروکلی (*Brassica oleracea Var.* Italica) یکی از اعضای خانواده Brassicaceae است و گونه وحشی آن در سرتاسر منطقه مدیترانه و به‌طور گسترده ای در بسیاری از کشورهای اروپایی، امریکایی و آسیایی کشت می‌شود (۱). کلم بروکلی یکی از سبزیجات با ارزش است که سرشار از مواد مغذی می‌باشد و فواید بی‌شماری برای ارتقاء سلامتی انسان دارد. جوانه‌های بروکلی دارای ماده‌ای به نام سولفورفان هستند که تعداد، اندازه و تکثیر تومورهای سرطانی را کاهش می‌دهد. علاوه‌بر این، جوانه آن غنی از فیبر، کاروتنوئید، ویتامین A، ویتامین C و ویتامین K است (۲۷،۵). این گیاه به‌صورت بهاره یا پاییزه کشت می‌شود، اما در مراحل اولیه حساس به شرایط سرد و خشک است. در میان تنش‌های غیرزنده، کمبود آب و تنش خشکی به‌عنوان مهم‌ترین محدودیت تولید گیاهان در اکثر نقاط جهان شناخته شده است. (۲۲). به‌دلیل غیریکنواختی محیط خاک و عدم امکان کنترل عوامل محیطی در مزرعه، تحقیقات آزمایشگاهی اهمیت ویژه‌ای برای ارزیابی تحمل گیاهان به تنش خشکی دارد. برای ایجاد محیط‌های مصنوعی کنترل پتانسیل آب، معمولاً از موادی با جرم مولکولی زیاد استفاده می‌شود. از جمله این مواد مانیتول است که به‌دلیل ایجاد فشار اسمزی با شرایط مشابه طبیعی، اغلب برای ارزیابی تحمل به خشکی در محیط کنترل شده استفاده می‌شود (۱۷). تنش خشکی، تولید گونه‌های اکسیژن فعال ROS مانند پراکسید هیدروژن (H_2O_2)، رادیکال سوپر اکسید (H_2)، هیدروکسل (OH) را افزایش می‌دهد که تجمع آنها منجر به تنش اکسیداتیو می‌شود (۳۱). گیاهان برای کاهش‌دادن اثر مخرب گونه‌های اکسیژن فعال مکانیسم‌های متفاوتی دارند. از جمله این مکانیسم‌ها می‌توان به سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی اشاره کرد. آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان مانند کاتالاز، سوپراکسیددیسموتاز و پراکسیداز در پاکسازی رادیکال‌های آزاد اکسیژن در سلول نقش دارند (۳۰). در پاسخ به افزایش تولید گونه‌های اکسیژن فعال، ظرفیت دفاع آنتی‌اکسیدانی و فعالیت آنزیمی آن افزایش می‌یابد. اولین آنزیم پاکسازی‌کننده سوپراکسید دیسموتاز است که تبدیل رادیکال سوپراکسید به پراکسید هیدروژن که یک مولکول با خاصیت غیررادیکالی است را بر عهده دارد. پراکسید هیدروژن تولید شده توسط آنزیم کاتالاز و یا آسکوربات پراکسیداز تبدیل به آب و اکسیژن می‌شود

www.SID.ir

Archive of SID

(۱۴). آنزیم پراکسیداز نقش مهمی را در خنثی‌کردن پراکسید هیدروژن دارد که این عمل با کمک اسید آسکوربیک به‌عنوان یک دهنده الکترون برای احیای پراکسید هیدروژن به آب صورت می‌گیرد (۳۱). در طی این واکنش، اسید اسکوربیک به مونو دهیدرو اسید آسکوربات تبدیل می‌شود. گوایاکول پراکسیداز (POX) گلیکوپروتئین‌هایی است که قادر به استفاده از فنل‌های دهنده هیدروژن برای مقابله با مقدار بالای رادیکال‌های آزاد اکسیژن هستند. علاوه‌بر این، دخالت POX در فرآیند رشد گیاه، تولید لیگنین، بیوسنتز اتیلن، دفاع از گیاهان در برابر تنش‌ها و بازسازی زخم‌ها اثبات شده است. (۲۱). تغییرات در فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان تحت تنش‌های محیطی مختلف نیز گزارش شده است (۱۵). ریدل و همکاران (۲۹) و دینکووا و همکاران (۱۳) در بررسی‌های متفاوت نشان داده‌اند که سولفورفان القاکننده قوی آنتی‌اکسیدان‌های سلولی و آنزیم‌های فاز دو شامل سوپر اکسید دیسموتاز، کاتالاز، گلوتاتیون ردوکتاز و گلوتاتیون پراکسیداز می‌باشد که مهم‌ترین عملکرد این آنزیم‌ها غیرفعال‌کردن رادیکال‌های آزاد است. پرز و هموران، ۲۰۱۱، سوئیسا، ۲۰۱۵ و گائولیک و همکاران، ۲۰۱۳ در زمینه کاربرد محرک‌هایی مانند مانیتول، نمک و H_2O_2 بر جوانه دو روزه گیاه عدس مبنی بر بالارفتن فلاوونویید و آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان مطابقت دارد (۱۴،۳۲،۲۸). گائو و همکارانش (۱۷) نشان دادند که تنش غیرزیستی افزایش ساکاروز به‌میزان ۱۷ مولار باعث افزایش معنی‌دار میزان سولفورافان و میزان تعدادی از پلی‌فنول‌های بروکلی شد. میزان سولفورفان با کاربرد تیمارهای قندی در گیاه بروکلی افزایش نشان داد. علاوه‌بر این، تحت تنش‌های غیرزنده، آسیب به پروتئین همراه با تجمع برخی از آمینو اسیدهای آزاد مانند پرولین به‌منظور حفظ فشار اسمزی، منجر به تنظیم سنتز پروتئین در سلول‌ها شده است (۲۶). برخی از پژوهش‌گران کاهش سنتز پروتئین را به کاهش تعداد پلی‌زوم‌های سلولی نسبت داده‌اند (۳۳،۱۹). یکی از واکنش‌هایی که در حضور انواع اکسیژن فعال سرعت بیشتری پیدا می‌کند، پراکسیداسیون لیپیدهای غشایی است که باعث تولید آلدئیدهایی مثل مالون دی آلدئید (MDA) و ترکیباتی مثل اتیلن می‌شوند (۶). علاوه‌بر این، اتیلن و اسید سالیسیلیک دو فیتو هورمون تشکیل‌شده از پلی‌فنل هستند که در واکنش‌های استرس گیاهان که تاثیر مستقیم، غیرمستقیم و متناوب در برخی فعالیت‌های حیاتی گیاهان مانند فتوسنتز و رشد گیاه در شرایط تنش دارند، مهم هستند (۱۸)

هدف از مطالعه حاضر، بررسی پارامترهای مختلف مورفولوژیکی، بیوشیمیایی و پلی‌فنل‌ها در پاسخ ژنوتیپ‌های مختلف بروکلی به تنش مانیتول در محیط آزمایشگاهی می‌باشد و در نهایت معرفی مناسب‌ترین ژنوتیپ برای استفاده دربرنامه‌های اصلاحی گیاه و تغذیه‌ای انسان است. در مجموع، ارتباط بین پارامترهای اندازه‌گیری‌شده با استفاده از تکنیک‌های آماری پیشرفته و چندمتغیره، برای کمک به اصلاح‌گران به‌منظور استفاده از آن‌ها به‌عنوان معیارهای غربالگری برای انتخاب غیرمستقیم ژنوتیپ‌ها با کیفیت بالاتر تغذیه‌ای، ارزیابی شد.

مواد و روش‌ها

بذرهای شش ژنوتیپ بروکلی (کاستل دم، گرین ماجیک، هراکلیون، ماراتون، ماتسوری و ساکارا) تهیه‌شده از شرکت پی اس آمریکا و توکی تا ژاپن در یک آزمایش فاکتوریل با دو عامل (سه سطح صفر، ۸۸ و ۱۷۶ میلی‌مولار مانیتول و ژنوتیپ‌ها) در قالب طرح پایه کاملا تصادفی با سه تکرار در پژوهشکده برنج طبرستان دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی ساری انجام شد. بذرها به‌مدت ۲ دقیقه در اتانول ۷۰ درصد خیس‌شده و سپس به‌مدت ۱۰ دقیقه با محلول (هیپوکلریت سدیم) ۲۰ درصد ضدعفونی شد و پس از آن بذرها ۴ بار با آب دیونیزه شستشو شدند. بذرهای استریل‌شده، روی کاغذهای صافی در سیکل ۱۶ ساعت نور و ۸ ساعت تاریکی به اتاق رشد با ۲۳ درجه سانتی‌گراد در روز و ۲۰ درجه در شب، به‌همراه رطوبت نسبی متوسط ۷۰ درصد، به‌مدت ۵ روز منتقل شدند. سپس جوانه‌های کوچک بروکلی، تحت تنش مانیتول با دو سطح ۸۸ و ۱۷۶ میلی‌مولار به‌مدت ۴۸ ساعت قرار گرفتند. این پژوهش روی جوانه‌های هفت‌روزه گیاه کلم بروکلی انجام گرفت. در واقع گیاهان هفت‌روزه پس از تنش، همراه با شاهد در همان روز جهت سنجش‌های بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی برداشت شدند (۱۷،۲۴).

اندازه‌گیری صفات

در پژوهش حاضر مطالعات مرفولوژیکی در مرحله رشد جوانه انجام گرفت. در این مرحله، طول جوانه، طول ریشه و وزن خشک جوانه اندازه‌گیری شد. برای اندازه‌گیری این صفات، از هر ژنوتیپ به تعداد ۲۵ جوانه برای هر تکرار، تهیه و سپس در فویل آلومینیومی پیچیده و به‌مدت ۴۸ ساعت در آون ۷۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. پس از خشک‌شدن کامل نمونه‌ها، وزن خشک آن‌ها اندازه‌گیری شد. طول جوانه و ریشه با استفاده از خط کش میلی‌متری محاسبه گردید. برای هر گروه تیماری سه تکرار محاسبه و میانگین بر اساس واحد سانتی‌متر گزارش گردید. سنجش غلظت پروتئین با استفاده از روش برادفورد (۸) در طول موج طیف سنجی ۵۹۵ نانومتر اندازه‌گیری شد. محتویات مالون دی آلدئید (MDA) و پراکسید هیدروژن (H_2O_2) با روش هیت و پکر (۱۹۶۸) و ولیکووا و همکاران (۲۰۰۰) محاسبه شد (۲۰ و ۳۵). آنتی‌اکسیدان‌های آنزیمی شامل آنزیم سوپراکسید دیسموتاز (SOD)، آسکوربیک پراکسیداز (APX)، گایاکول پراکسیداز (POX) و کاتالاز (CAT) با استفاده از روش‌های جیانوپولیتیس و ریز (۱۵) و ناکانو و اساد (۲۳)، دازی و همکاران (۱۱) و ابی (۲) به‌ترتیب اندازه‌گیری شد. روش‌های توصیف‌شده توسط آنیز ورس و جیل اسپی (۳) و اماه ماز (۲۵) و یوان و همکاران (۳۷) برای اندازه‌گیری محتوای فنل، فلاونوئید و آنتوسیانین در جوانه‌های بروکلی به‌ترتیب استفاده شد. DPPH به‌عنوان فرایندی جهت دفع گونه‌های اکسیژن فعال با استفاده از روش برند ویلیام و همکاران (۹) برآورد شد.

www.SID.ir

Archive of SID

با استفاده از استاندارد HPLC، محتوای سولفورفان در جوانه‌های بروکلی برای هر ژنوتیپ تحت تیمار، پس از تعیین پیک بر اساس روش برادر و همکاران (۷) اندازه‌گیری شد.

تجزیه و تحلیل آماری

داده‌ها با استفاده از آزمون تجزیه واریانس یک‌طرفه در نرم‌افزار آماری SAS مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند و سپس میانگین‌ها با استفاد از روش چنددامنه‌ای دانکن مقایسه شدند. نمودارها برای مقایسه میانگین با نرم‌افزار Excel 2016 رسم شد. ضرایب همبستگی، تجزیه به مولفه اصلی (PCA) و نمودار بای‌پلات با استفاده از نرم‌افزار آماری SAS و تجزیه علیت توسط نرم‌افزار آماری Minitab انجام گردید.

نتایج و بحث

جدول ۱ نتایج تجزیه واریانس را برای تمام صفات اندازه‌گیری‌شده ارائه می‌دهد. اثر اصلی ژنوتیپ‌ها برای همه صفات معنی‌دار ($p<0.01$) بودند. همچنین اثر مانیتول روی تمام صفات اندازه‌گیری‌شده ($p<0.01$) به‌جز طول ریشه معنی‌دار بود. اثر متقابل بین ژنوتیپ‌ها و مانیتول برای همه پارامترها معنی‌دار بود (جدول ۱). نتایج مقایسه میانگین براساس آزمون چنددامنه‌ای دانکن، برای خصوصیات رشد، از جمله طول جوانه و طول ریشه به‌همراه برخی از صفات پلی‌فنولی شامل فنل کل، فلاونوئید و آنتوسیانین در جدول ۲ تهیه شده است. در تمام ژنوتیپ‌ها، طول جوانه در شرایط کنترل بیشتر از کاربرد مانیتول در دو سطح ۸۸ و ۱۷۶ میلی‌مولار نشان داده شد. در ژنوتیپ‌های هراکلیون، ماراتون، گرین ماجیک و ماتسوری استفاده از سطح ۱۷۶ میلی‌مولار مانیتول کمترین طول جوانه را نشان داد، اما در سایر ژنوتیپ‌ها، تفاوت معنی‌داری بین دو سطح مانیتول، مشاهده نشد. دو ژنوتیپ کاستل دم و ماتسوری بیشترین طول جوانه را در مقایسه با سایر گونه‌ها نشان دادند. پاسخ ژنوتیپ‌های مختلف به سطوح مختلف مانیتول برای طول ریشه متفاوت بود. در شرایط کنترل، ژنوتیپ‌های ساکارا، هراکلیون و ماتسوری، طول ریشه بیشتری نسبت به شرایط تنش داشتند. برعکس، در ژنوتیپ‌های ماراتون، گرین ماجیک و کاستل دم، در شرایط نرمال، کاهش طول ریشه در مقایسه با سطوح تنش مشاهده شد. بیشترین و کمترین طول ریشه تحت تاثیر ۱۷۶ میلی‌مولار مانیتول به‌ترتیب در ماراتون (۱۳/۵۳ سانتی‌متر) و ساکورا (۶/۸۳ سانتی‌متر) به‌دست آمد. وزن خشک تمام ژنوتیپ‌ها تحت تاثیر مانیتول در مقایسه با شاهد به‌جز ژنوتیپ کاستل دم کاهش یافت. کاهش طول جوانه و وزن خشک ممکن است به‌علت کاهش میزان فتوسنتز تحت تنش ناشی از کاربرد مانیتول باشد. چاوز و همکاران (۱۰) گزارش کردند که تحت تنش خشکی، بسته‌شدن روزنه‌ها به‌منظور حفظ مقدار آب در سلول‌های گیاهی می‌باشد که به‌طور مستقیم بر سرعت رشد ساقه گیاه تاثیر می‌گذارد. همچنین کاهش سطح برگ و دیگر بخش‌های فتوسنتزکننده گیاه با بسته‌شدن دهانه روزنه‌ها افزایش می‌یابد (۶). از طرف دیگر، تحقیقات نشان داده که ریشه گیاهان به‌دنبال ذخیره‌سازی آب، با افزایش طول و تعداد ریشه‌های جانبی و ریشه‌های مودار همراه هستند (۱۰). طراحی سیستم ریشه (RSA) تحت تنش خشکی نشان می‌دهد که رشد ریشه می‌تواند در سطح مشخص افزایش یا حتی کاهش یابد؛ ولی به‌طور کلی رشد ریشه در تنش خشکی همیشه بالاتر از ساقه خواهد بود (۳۴). علاوه‌بر این، برخی از محققان اظهار داشتند که ژنوتیپ‌های متحمل معمولا به شیوه‌های مختلف به خشک‌سالی پاسخ می‌دهند که یکی از موثرترین راه‌های افزایش رشد ریشه است، درحالی‌که ژنوتیپ‌های حساس قادر نیستند این رشد را به‌درستی ژنوتیپ‌های متحمل کنترل کنند (۱۲). بالاترین مقدار محتوای فنل در ماراتون تحت تنش در سطح ۱۷۶ میلی‌مولار (۱۱۲/۲۹ میلی‌گرم بر گرم وزن تازه) بود و کمترین مقدار آن در ساکارا تحت شرایط نرمال (۳۹/۵۲ میلی‌گرم بر گرم وزن تازه) به‌دست آمد. مقدار فلاونوئید در تمام ژنوتیپ‌ها، به‌جز ماراتون، در سطح بالای مانیتول ، افزایش یافت. بالاترین مقدار فلاونوئیدها (۱۲۴/۴ میلی‌گرم بر گرم وزن تازه) در هراکلیون در غلظت بالای مانیتول (۱۷۶ میلی‌مولار) به‌دست آمد، در حالی که کمترین مقدار آن در ماتسوری در شرایط نرمال (۲۸/۷۳میلی‌گرم بر گرم وزن تازه) بود. مقدار آنتوسیانین در ژنوتیپ ماتسوری در پاسخ به تنش مانیتول در سطح ۱۷۶ میلی‌مولار کاهش یافت. در حالی‌که در سایر ژنوتیپ‌ها در غلظت بالای مانیتول، افزایش محتوای آنتوسیانین مشاهده شد. ماراتون تحت تنش ۱۷۶ میلی‌مولار از مانیتول، بالاترین مقدار آنتوسیانین (۰/۶۲۳ میلی‌گرم بر گرم وزن تازه) را در میان تمامی ژنوتیپ‌های تحت تنش داشته، در حالی که کاستل دم در حالت نرمال، کمترین مقدار آنتوسیانین (۰/۱۴ میلی‌گرم بر گرم وزن تازه) را نشان داد. در تمام ژنوتیپ‌ها، محتوای فنل کل، فلاونوئید و آنتوسیانین افزایش یافته است. ژنوتیپ ماراتون و هراکلیون میزان بالاتری از این سه پارامتر را نسبت به سایر ژنوتیپ‌ها نشان دادند. بر اساس مطالعه گاولیک (۱۴) ترکیبات فنلی در سبزیجات، گیاهان و دیگر گیاهان خوراکی به‌عنوان عامل کاهش‌دهنده ترکیبات اکسیدان عمل می‌کنند. در این وضعیت، ترکیبات فنلی می‌تواند به‌عنوان یک اهداکننده هیدروژن استفاده شود که منجر به خنثی‌سازی رادیکال‌های آزاد می‌شود. به‌نظر می‌رسد اسید فنولیک و فلاونوئیدها خواص آنتی‌اکسیدانی قوی دارند. آن‌ها قادر به واکنش با رادیکال‌ها هستند و واکنش‌های اکسیداتیو را کاتالیز می‌کنند که منجر به تخریب رادیکال‌های آزاد و تثبیت آنها در گیاهان می‌شود (۳۱). تحت تنش خشکی، گونه‌های اکسیژن فعال (ROS) در سلول‌های گیاهی ایجاد می‌شود که به‌طور معمول موجب آسیب به دستگاه سلولی می‌شود؛ بنابراین میزان بالاتر ترکیبات فنلی نشان‌دهنده تحمل بیشتر ژنوتیپ و گیاه به تنش خشکی است. علاوه‌بر این، گزارش شده است که فعالیت آنتی‌اکسیدانی در بخش‌های خوراکی گیاهان با خواص ضدموتاژنی و ضدسرطانی مرتبط است. در نتیجه، ژنوتیپ‌هایی با مقدار بالاتر از آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی از جمله ترکیبات فنلی می‌توانند برای برنامه‌های تغذیه‌ای و غذایی انسان مورد استفاده قرار گیرند. علاوه‌بر بروکلی، عصاره‌های مختلف میوه‌ها و سبزیجات با ترکیبات فنولی بالا، عکس‌العمل به

www.SID.ir

Archive of SID

تنش خشکی نشان داده‌اند (۱۴). مالون دی آلدئید (MDA) و پراکسید هیدروژن (H_2O_2) به‌عنوان دو فاکتور مهم در شرایط تنش می‌باشندکه در تمامی ژنوتیپ‌ها تحت تنش مانیتول اندازه‌گیری شد که نتایج آن‌ها در جدول ۲ درج شده است. در تمامی ژنوتیپ‌ها، بالاترین سطح تنش مانیتول منجر به افزایش مقدار هر دو فاکتور MDA و H_2O_2 شد. هراکلیون و ماراتون بالاترین مقدار MDA در پاسخ به کاربرد مانیتول رانشان دادند. ماراتون و گرین ماجیک هم بالاترین تفاوت را بین دو شرایط کنترل و تنش در میان ژنوتیپ‌ها برای صفت H_2O_2 نشان دادند. دو ژنوتیپ گرین ماجیک (۳/۹۶ میکرومول بر میلی‌گرم وزن تازه) و ساکورا (۰/۷۷ میکرومول بر میلی‌گرم وزن تازه) تحت تنش مانیتول در سطح ۱۷۶ میلی‌مولار بیشترین مقدار MDA و H_2O_2 را نشان دادند. مقدار MDA و H_2O_2 دو نشانه مهم استرس اکسیداتیو ایجادشده در گیاهان است که میزان این دو ترکیب در شرایط تنش کمتر شده و آسیب به گیاهان تحت این وضعیت کمتر خواهد شد ژنوتیپ‌ها و ارقامی با مقدار پایین MDA و H_2O_2 تحت شرایط تنش، تحمل بیشتری را نسبت به استرس نشان می‌دهند (۳۱). در این مطالعه محتوای MDA و H_2O_2 تحت تنش خشکی افزایش یافت. با این حال میزان پاسخ ژنوتیپ‌ها متفاوت بود. ژنوتیپ کاستل دم مقدار کمتری از این ترکیبات را نسبت به سایر ژنوتیپ‌ها در تمام سطوح مانیتول نشان داد.

همچنین تفاوت بین سطوح مانیتول در ماراتون و هراکلیون نسبت به سایر ژنوتیپ‌ها بالنسبه پایین بود. تحت تنش خشکی، تولید ROS در گیاه، در نتیجه استرس اکسیداتیو افزایش می‌یابد. H_2O_2 و دیگر ترکیبات اکسیژن واکنش‌پذیر با لیپید که منجر به پراکسیداسیون لیپید و بالارفتن MDA می‌شوند، به‌طور مستقیم در شرایط تنش واکنش نشان می‌دهند (۲۱). سوپراکسید دیسموتاز (SOD)، کاتالاز (CAT)، گویاکول پراکسیداز (POX) و پراکسیداز آسکوربیک (APX) به‌عنوان آنزیم‌های از بین برنده گونه‌های اکسیژن فعال، با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتری اندازه‌گیری شدند. پاسخ تمام آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی به غلظت بالاتر مانیتول، افزایش فعالیت آن‌ها را در تمامی ژنوتیپ‌ها نشان داد. افزایش SOD در ژنوتیپ ماتسوری بیشتر از سایر ژنوتیپ‌ها (۱۰۴ و ۱۶۶ درصد افزایش در سطوح ۸۸ و ۱۷۶ میلی‌مولار مانیتول در مقایسه با شاهد) بود. نتایج مشابهی در مورد دیگر آنتی‌اکسیدان آنزیمی اندازه‌گیری‌شده، برای این ژنوتیپ‌ها مشاهده شد (جدول ۲). ماراتون بیشترین فعالیت آنزیمی را به استثنا آنزیم CAT، در بین تمام ژنوتیپ‌ها تحت تنش ۱۷۶ میلی‌مولار مانیتول نشان داد. در حالی‌که ژنوتیپ هراکلیون تحت تنش مانیتول در بالاترین سطح، بیشترین فعالیت CAT را نشان داد. پایین‌ترین فعالیت آنزیم‌های SOD، CAT، POX و APX در ژنوتیپ‌های ساکورا، ماتسوری، گرین ماجیک وساکورا تحت شرایط کنترل، به‌ترتیب نشان داده شد. فعالیت DPPH (۲،۲–دیفنیل–۱–پریکیل هیدرازیل) نیز به‌عنوان یک دارنده رادیکال آزاد (جدول ۲) اندازه‌گیری شد. در ژنوتیپ ماراتون، فعالیت آنتی‌اکسیدانی DPPH درشرایط کنترل تفاوت معنی‌داری را با سطح ۸۸ میلی‌مولار مانیتول نشان داد، بالاترین فعالیت DPPH در هراکلیون در سطح ۱۷۶ میلی‌مولار مانیتول (۸۵/۴۵ میلی‌مول بر کیلوگرم) بود، اما پایین‌ترین مقدار آن در رقم ماتسوری درشرایط کنترل (۶۴/۷۱ میلی‌مول بر کیلوگرم) نشان داده شد. در تنش خشکی، افزایش ROS باعث فعال‌شدن ترکیبات آنتی‌اکسیدانی و به‌ویژه آنزیمی می‌شود. مطالعات متفاوت، توانایی گیاهان را در پاسخ به شرایط استرس، همراه با فعالیت بالای آنتی‌اکسیدان آنزیمی نشان می‌دهد (۱۸،۲۱،۲۳). بر اساس این دیدگاه، ژنوتیپ‌ها با فعالیت بالای آنزیمی آنتی‌اکسیدان می‌توانند به‌عنوان ژنوتیپ‌های مقاوم تر به تنش خشکی در نظر گرفته شوند (۴). علاوه‌بر ترکیبات فنلی و آنتی‌اکسیدان آنزیمی، DPPH که خود یک ترکیب رادیکالی است، به‌طور معمول به‌عنوان یک از بین برنده، برای سایر رادیکال‌های مضر عمل می‌کند و بنابراین به‌عنوان یک نشانگر برای فعالیت آنتی‌اکسیدانی بالا در گیاهان است. سولفورفان به‌عنوان یک ترکیب مهم در بروکلی نیز در تمام ژنوتایپ‌ها مورد بررسی قرار گرفت و نتایج آن در شکل ۱ ارائه شده است.

www.SID.ir

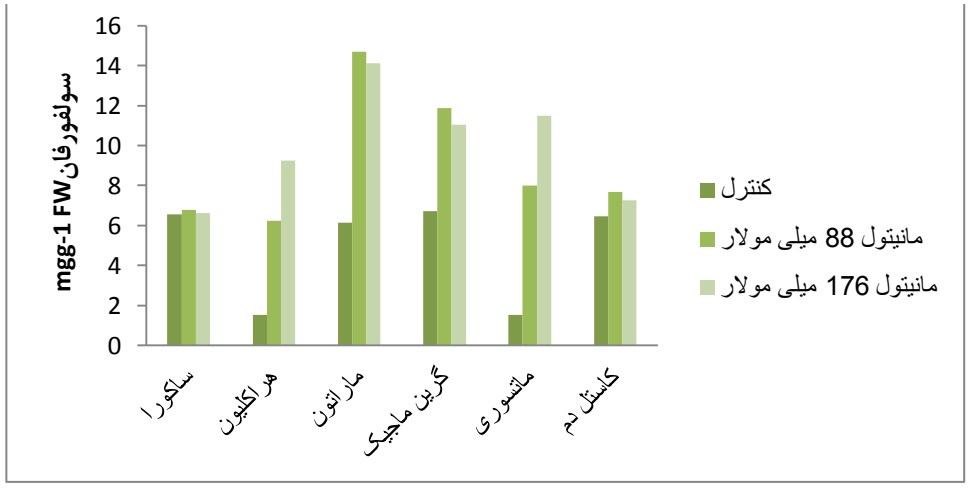
Archive of SID

جدول ۱- تجزیه واریانس صفات اندازه‌گیری شده در ژنوتیپ‌های مختلف بروکلی تحت تنش خشکی با استفاده از مانیتول

Table 1. Analysis of variance for measured traits in genotypes broccoli under mannitol treatment

منابع		میانگین مربعات MS												
		۲،۲-دیفنیل-۱-پریکریل هیدرازیل (میکرومول بر کیلوگرم)	اسکوربات پراکسیداز (میکرومول بر میلی گرم پروتئین)	گایاکول پراکسیداز (میکرو مول بر میلی گرم پروتئین)	کاتالاز (میکرومول بر میلی گرم پروتئین)	سوپر اکسید دیسموتاز (میکرومول بر میلی گرم پروتئین)	آنتوسیانین (میلی گرم بر گرم وزن خشک)	فلاوونوئید (میلی گرم بر گرم وزن خشک)	فنل (میلی گرم بر گرم وزن خشک)	پراکسید هیدروژن (میکرو مول بر میلی گرم وزن خشک)	ملون دی الدئید(میکرومول بر میلی گرم وزن خشک)	سولفورفان (میلی گرم بر گرم وزن تازه)	طول ریشه(سانتی متر)	طول جوانه (سانتی متر)	وزن خشک (گرم)
ژنوتیپ	۵	۵۷/۴۵**	۴۱۵۷/۵۳**	۷۶۴/۱۶**	۱۲۲۰/۷۳**	۵۹۱۰/۳۷**	۰/۲۴**	۱۳۱۴/۹۱**	۳۴۶۵/۷۸**	۰/۳۲**	۴/۱۸**	۴۶/۵۸**	۴۰/۳**	۵/۶۴**	۰/۱۷**
مانیتول	۲	۱۶۴/۸۴**	۱۱۵۹۶/۶۷**	۹۹۹/۸۴**	۲۴۹۳/۳۸**	۵۸۹۱/۷۶**	۰/۰۵**	۱۹۸۵/۸۹**	۱۳۳۸/۴۲**	۰/۰۷**	۰/۳**	۱۳۹/۳**	۱/۰۵	۱۱/۴۲**	۰/۰۶**
اثر متقابل	۱۰	۵۸/۱۵**	۳۶۳/۵۲**	۸۹/۵۴**	۱۳۵/۹۹**	۴۴۶/۹۴**	۰/۰۰۵**	۹۹۹/۹۸**	۱۰۶/۳۱**	۰/۱۴**	۰/۶**	۱۵/۱۷**	۲/۹۷**	۱/۵۶**	۰/۰۲**
خطا	۳۶	۰/۵۷	۰/۸۶	۰/۴۷	۱/۰۴	۲/۴۶	۰/۰۰۰۳	۲/۰۳	۴/۶۸	۰/۰۰۴	۰/۰۰۱	۰/۲۷	۰/۳۳	۰/۰۵	۰/۰۰۱
ضریب تغییرات		۰/۹۲	۱/۹۶	۳/۶۱	۲/۹۸	۲/۳۹	۴/۱۶	۲/۰۶	۳/۷	۶/۶۴	۱/۲۳	۶/۴۷	۵/۷۱	۴/۵۹	۳/۵۱

*، **: معنی‌داری در سطوح ۱ و ۵ درصد و غیرمعنی‌دار



شکل ۱- مقادیر متفاوت سولفورفان در ژنوتیپ‌های بروکلی تحت تنش مانیتول

Figure 1. Response of sulfonphane content of different broccoli genotypes to mannitol treatment.

www.SID.ir

Archive of SID

پاسخ تمام ژنوتیپ‌ها به استفاده از مانیتول موجب افزایش محتوای سولفورفان شد، اما میزان افزایش برخی از ژنوتیپ‌ها ازجمله ساکارا و کاستل دم کم بودند. میزان افزایش مقدار سولفورفان در ماتسوری و هراکلیون در پاسخ به افزایش غلظت مانیتول، مثبت بود. ماراتون و گرین ماجیک تفاوت معنی‌داری بین شرایط کنترل و تنش سطح ۸۸ میلی‌مولار مانیتول را نشان داد، اما تفاوت در میزان سولفورفان بین سطوح تنش ۸۸ و ۱۷۶ میلی‌مولار مانیتول مشاهده نشد. در تمام سطوح مانیتول و همچنین در کل، مقدار سولفورفان در مقایسه با سایر ژنوتیپ‌ها در ماراتون بالاتر بود. با توجه به عملکرد ضدانعقادی و ضدسرطانی سولفورفان، به‌عنوان یک ترکیب مهم در جوانه‌های بروکلی می‌باشد. از آنجایی که سولفورفان یک القاکننده طبیعی در فاز II آنزیم‌های موجود در بدن انسان و حیوان است که قادر به سم‌زدایی مواد شیمیایی ناشی از سرطان است، بنابر این استفاده از این غذاها و گیاهان از جمله بروکلی می‌تواند بسیار مفید باشد. سولفورفان علاوه‌بر ترکیبات ضدسرطانی، دارای اثر محافظتی علیه استرس‌های اکسیداتیو است (۱۶).

همبستگی بین پارامترهای اندازه‌گیری‌شده

همبستگی بین تمام جفت پارامترهای اندازه‌گیری‌شده بر اساس روش پیرسون در جدول ۳ ارائه شده است. به‌جز طول جوانه (۰/۷۴)، وزن خشک همبستگی منفی با سایر پارامترها دارد. طول ریشه همبستگی مثبت با سایر پارامترها به‌جز وزن خشک و طول جوانه نشان داد اما با محتوای فنل (۰/۵) SOD (۰/۷) و POX (۰/۶۷) معنی‌دار بود. سولفورفان ارتباط معنی‌داری با طول جوانه (۰/۶۱-)، محتوای فنل (۰/۶۵)، SOD(۰/۶۶)، CAT (۰/۵۸)، POX (۰/۵۲)، APX (۰/۵۸) و DPPH (۰/۴۷) را نشان داد. محتوای سولفورفان ارتباط معنی‌داری با فلاونوئیدها (۰/۲۹) و آنتوسیانین (۰/۳۱) نشان نداد. MDA همبستگی منفی معنی‌داری با وزن خشک (۰/۶۷-) و طول جوانه (۰/۵۷) داشت. همبستگی MDA با H_2O_2 (۰/۷۹-)، فلاونوئیدها (۰/۶۱)، آنتوسیانین (۰/۶۱)، CAT (۰/۵۴-) و POX (۰/۵۱-) معنی‌دار بود. همبستگی H_2O_2 با وزن خشک (۰/۶۶-) و طول جوانه (۰/۶۳-) معنی‌دار بود. همچنین H_2O_2 همبستگی معنی‌داری با (۰/۷۹) MDA، فلاونوئید (۰/۵۹)، آنتوسیانین (۰/۶۳)، SOD (۰/۴۳)، CAT (۰/۶۴-)، POX (۰/۴۷-) نشان داد. محتوای فنل همبستگی مثبت و معنی‌دار با تمام آنتی‌اکسیدان آنزیمی داشت. همبستگی فلاونوئید با CAT به‌طور مثبت معنی‌دار بود (۰/۵۱)، اما ارتباط آن با سایر آنتی‌اکسیدان آنزیمی معنی‌دار نبود. آنتوسیانین ارتباط معنی‌دار مثبت با CAT (۰/۶۳) و POX (۰/۶۹) داشت. تمام همبستگی‌های داخلی آنتی‌اکسیدان‌های آنزیمی مثبت بود. DPPH به‌عنوان یک ترکیب پایدار با توانایی آنتی‌اکسیدان، با SOD (۰/۴۸)، CAT (۰/۵۳) و POX (۰/۴۹) همبستگی مثبت داشت اما ارتباط آن با APX معنی‌دار نبود.

همچنین برای دستیابی به نتایج بهتر، اثر مستقیم همه متغیرها روی سولفورفان با استفاده از تحلیل ضریب مسیر مشخص شد (جدول ۴). تجزیه و تحلیل مسیر نشان داد که وزن خشک، محتوای H_2O_2 و سپس محتوای فنول، تاثیرات مثبت بیشتری بر محتوای سولفورفان دارند. از سوی دیگر، طول جوانه ضریب منفی برای تحلیل مسیر را نشان داد. ضریب همه متغیرهای دیگر در تحلیل مسیر، ناچیز بود.

تحلیل عاملی (Factor Analysis)

تجزیه و تحلیل عاملی برای ارزیابی رابطه بین ۱۴ ویژگی اندازه‌گیری‌شده در این مطالعه انجام شد (جدول۵). نتایج نشان داد که دو مولفه اول حدود ۸۱ درصد از کل تغییرات را به‌خود اختصاص دادند. بدین ترتیب، نمودار بای‌پلات برای دو مولفه، هم برای ژنوتیپ و هم پارامترها، می‌توان در یک پلات نشان داد (شکل ۲). وزن خشک و طول جوانه دارای تجمع منفی نسبت به پارامترها بود، زیرا آن‌ها در نمودار دوبعدی مولفه‌ها، در جهت عکس و منفی با تمام پارامترهای دیگر قرار گرفتند. ماتسوری و کاستل دم به‌عنوان دو ژنوتیپ مجاور در منطقه نزدیک به وزن خشک و طول جوانه قرار داده شدند. پارامترهای طول ریشه، میزان سولفورفان، مقدار فنل، APX، SOD، POX و CAT همبستگی مثبت و بالایی را با هم و هر دو مولفه اول و دوم نشان دادند. تنها ژنوتیپ ماراتون در مجاورت این پارامترها قرار دارد که نزدیک به سولفورفان نسبت به سایر ژنوتیپ‌ها است. H_2O_2 ، MDA، DPPH، محتوای فلاونوئید و محتوای آنتوسیانین دارای ضریب مثبت بالا برای مولفه اول، اما ضریب منفی بالا در مورد مولفه دوم بودند.

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۲- مقایسه میانگین صفات اندازه‌گیری شده برای اثر متقابل بین ژنوتیپ بروکلی و تنش مانیتول

Table 2. Multiple mean comparison of measured traits for interaction between broccoli genotype and mannitol treatment

ژنوتیپ	مانیتول (میلی مولار)	۲،۲-دیفنیل-۱-پریکریل هیدرازیل (میکرو مول بر کیلوگرم)	فنل (میلی گرم بر گرم وزن خشک)	فلاوونوئید (میلی گرم بر گرم وزن خشک)	آنتوسیانین (میلی گرم بر گرم وزن خشک)	ملون دی الدئید(میکرو مول بر میلی گرم وزن خشک)	پراکسید هیدروژن (میکرو مول بر میلی گرم وزن خشک)	سوپر اکسید دیسموتاز (میکرو مول بر میلی گرم پروتئین)	کاتالاز (میکرو مول بر میلی گرم پروتئین)	گایاکول پراکسیداز (میکرو مول بر میلی گرم پروتئین)	اسکوربات پراکسیداز (میکرو مول بر میلی گرم پروتئین)	طول جوانه (سانتی متر)	طول ریشه(سانتی متر)	وزن خشک (گرم)
ساکورا	۰	۸۲/۳۲۳^{f}	۳۹/۵۲۴^{l}	۶۳/۶۶۷^{g}	۰/۴۵۱^{e}	۲/۵۵^{1h}	۰/۲۳^{j1}	۲۴/۰۱۱^{l}	۲۶/۴۷۲^{i}	۱۰/۹۳۹^{j}	۱۴/۹۷۶^{n}	۳/۳۶۷^{b}	۷/۸۳۳^{i}	۰/۳۶۱^{h}
	۸۸	۸۴/۰۹۱^{bcde}	۴۷/۴۷۶^{hij}	۸۳/۰۶۷^{c}	۰/۵۰۵^{d}	۲/۷۲۲^{g}	۰/۳۵^{g}	۳۷/۵۵۳^{j}	۳۲/۶۷۰^{fg}	۱۱/۲۲۲^{j}	۴۰/۴۲۲^{i}	3.333^{k}	۷/۶۶۷^{ij}	۰/۳۲۱^{i}
	۱۷۶	۸۴/۴۹۵^{abc}	۶۶/۳۳۳^{d}	۸۳/۹۳۳^{c}	۰/۵۸۲^{b}	۲/۹۳۵^{f}	۰/۷۷^{a}	۳۱/۱۴۶^{k}	۳۵/۶۳۷^{e}	۱۳/۰۴۳^{i}	۵۵/۲۵۵^{g}	۴/۴۶۷^{fg}	۶/۸۳۳^{j}	۰/۳۱۴^{i}
هراکلیون	۰	۸۲/۰۲^{fg}	۴۵/۲۳۸^{jk}	۵۱/۷۳۳^{j}	۰/۴۸۷^{d}	۲/۳۷۳^{i}	۰/۲۱^{h}	۶۶/۵۲۲^{f}	۳۳/۴۱۳^{f}	۲۶/۲۸۷^{e}	۲۷/۰۱۳^{k}	۵/۵۶۷^{cd}	۱۳/۰۳۳^{ab}	۰/۴۱۱^{g}
	۸۸	۸۵/۱۵۲^{ab}	۵۲/۳۱۷^{efg}	۷۲/۰۰۱^{e}	۰/۵۳۴^{c}	۳/۲۲۳^{d}	۰/۴۴^{f}	۷۶/۰۰۵^{e}	۴۸/۷۸۹^{c}	۳۰/۸۶۶^{d}	۷۱/۵۱۵^{e}	۴/۷۱۱^{f}	۱۱/۱۱۲^{d}	۰/۳۴۴^{h}
	۱۷۶	۸۵/۴۵۵^{a}	۵۱/۶۱۹^{efg}	۱۲۳/۴۰۱^{a}	۰/۵۴۳^{c}	۳/۸۶۹^{b}	۰/۵۲^{e}	۸۲/۱۶۲^{d}	۶۴/۷۶۴^{a}	۳۷/۱۶۲^{b}	۹۵/۸۱۹^{b}	۳/۵۶۷^{jk}	۱۲/۵۰۱^{bc}	۰/۳۵۱^{h}
ماراتون	۰	۷۵/۹۶^{h}	۸۲/۱۴۳^{c}	۵۸/۳۳۳^{hi}	۰/۴۲۳^{e}	۲/۰۴۹^{k}	۰/۱۶^{g}	۸۲/۳۹۴^{d}	۳۲/۴۱۵^{fg}	۱۵/۰۰۲^{h}	۴۵/۹۸۵^{h}	۴/۳۰۱^{gh}	۱۲/۰۶۷^{c}	۰/۳۵۵^{h}
	۸۸	۸۵/۴۰۴^{a}	۹۷/۹۵۲^{b}	۷۲/۱۳۳^{e}	۰/۵۴۳^{c}	۲/۲۲۳^{j}	۰/۳^{j}	۱۰۱/۶۲۹^{b}	۴۵/۸۵۴^{d}	۲۶/۹۲۹^{e}	۸۴/۰۷۶^{c}	۴/۰۳۳^{hi}	۱۳/۱۶۷^{ab}	۰/۳۱۴^{i}
	۱۷۶	۸۳/۷۳۷^{cde}	۱۱۲/۲۸۶^{a}	۹۱/۱۲۳^{b}	۰/۶۲۳^{a}	۳/۰۵۵^{e}	۰/۵۲^{d}	۱۲۱/۴۶۴^{a}	۵۵/۵۰۲^{b}	۴۲/۹۹۷^{a}	۱۱۰/۶۴۶^{a}	۳/۸۰۱^{ij}	۱۳/۵۳۳^{a}	۰/۲۹۳^{ij}
گرین ماجیک	۰	۸۲/۲۷۳^{fg}	۴۵/۶۶۷^{ijk}	۵۷/۰۸۶^{i}	۰/۳۶۹^{f}	۳/۲۱۱^{d}	۰/۱۸^{hi}	۵۵/۵۳۸^{h}	۲۱/۵۵۸^{j}	۵/۴۷۷^{m}	۱۶/۴۳۷^{n}	۵/۱۱۱^{e}	۸/۹۳۲^{gh}	۰/۴۶۱^{f}
	۸۸	۸۳/۲۳۲^{def}	۵۰/۵۷۱^{fgh}	۷۱/۴۶۷^{e}	۰/۴۸۲^{d}	۳/۶۱۹^{c}	۰/۶۴^{c}	۷۶/۰۶۱^{e}	۳۱/۴۶۰^{g}	۲۱/۶۶۶^{f}	۲۳/۲۵۷^{l}	۴/۱۰۱^{fgh}	۸/۵۱^{ghi}	۰/۳۹۲^{g}
	۱۷۶	۸۳/۳۹۴^{abcd}	۵۴/۹۵۲^{e}	۷۵/۵۳۳^{d}	۰/۵۳۵^{c}	۳/۹۵۸^{a}	۰/۷۱^{b}	۹۶/۴۲۲^{c}	۴۴/۸۲۷^{d}	۳۳/۸۲۶^{c}	۳۴/۷۳۱^{j}	۳/۲۶۱^{k}	۱۰/۶۶۷^{de}	۰/۳۵۵^{h}
ماتسوری	۰	۶۴/۷۱۷^{i}	۴۰/۹۵۲^{l}	۲۸/۷۳۳^{k}	۰/۲۱۴^{g}	۱/۶۹۵^{m}	۰/۰۹^{jk}	۱۸/۸۴۵^{m}	۱۱/۴۱۹^{l}	۵/۳۴۴^{m}	۱۸/۷۲۹^{m}	۶/۸۶۷^{a}	۹/۹۳۳^{fe}	۰/۸۹۱^{a}
	۸۸	۸۲/۹۲۹^{ef}	۴۸/۹۴۴^{ghi}	۵۳/۱۳۳^{j}	۰/۱۹۵^{gh}	۱/۹۵۷^{l}	۰/۰۶^{kl}	۴۰/۶۸۱^{i}	۲۹/۰۵۴^{h}	۱۱/۴۰۵^{j}	۴۴/۶۵۵^{h}	۵/۷۱۱^{c}	۸/۱۱۱^{hi}	۰/۸۳۱^{b}
	۱۷۶	۸۴/۲۹۳^{abcd}	۶۷/۲۳۸^{d}	۶۰/۳۳۳^{h}	۰/۱۹۹^{gh}	۲/۰۵۱^{k}	۰/۱۶^{j}	۷۴/۰۲۵^{e}	۵۵/۵۴۸^{b}	۱۶/۰۳۲^{gh}	۸۰/۱۱۲^{d}	۴/۳۳۳^{fgh}	۷/۶۶۷^{ij}	۰/۶۵۲^{e}
کاستل دم	۰	۸۱/۰۶۱^{g}	۴۲/۶۶۷^{kl}	۵۳/۰۰۱^{j}	۰/۱۴۱^{i}	۱/۷۰۱^{m}	۰/۰۱^{m}	۳۵/۶۲۷^{j}	۱۰/۷۸۲^{l}	۶/۸۸۳^{l}	۹/۳۸۲^{o}	۶/۶۲۲^{ab}	۹/۳۳۳^{fg}	۰/۹۰۱^{a}
	۸۸	۸۳/۵۸۶^{cde}	۵۳/۵۲۴^{ef}	۸۱/۲۶۷^{c}	۰/۷۹^{h}	۱/۹۳۸^{l}	۰/۰۵^{l}	۵۹/۰۴۳^{g}	۱۵/۷۴۱^{k}	۹/۷۳۳^{k}	۱۸/۲۰۷^{m}	۵/۲۳۳^{de}	۱۰/۶۵۵^{de}	۰/۷۲۰^{d}
	۱۷۶	۸۴/۰۴۱^{bcde}	۵۰/۲۳۸^{fgh}	۶۷/۰۶۷^{f}	۰/۲۱۹^{g}	۲/۰۵۱^{k}	۰/۱۵^{j}	۹۵/۸۷۷^{c}	۲۰/۹۷۱^{j}	۱۶/۳۸۸^{g}	۶۰/۵۳۲^{f}	۵/۹۳۳^{b}	۱۰/۸۳۳^{de}	۰/۷۹۱^{c}

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۳- ضرایب همبستگی بین جفت صفات اندازه‌گیری شده در ژنوتیپ‌های مختلف تحت تنش مانیتول
Table 3. Pearson correlation coefficients for all pairs of the traits measured in different genotypes of broccoli under mannitol treatment

وزن خشک														
طول جوانه	۱													
طول ریشه	۰/۷۴**	۱												
۲،۲-دیفنیل-۱-پریکیل هیدرازیل	-۰/۲۳	-۰/۱۹	۱											
مالون دی الدیید	-۰/۵۲*	-۰/۵۳*	۰/۴۱	۱										
پراکسید هیدروژن	-۰/۶۷**	-۰/۵۷*	۰/۰۴	۰/۲۲	۱									
فنل	-۰/۶۶**	-۰/۶۳**	۰/۰۶	-۰/۴۶	۰/۷۹**	۱								
فلاونوئید	-۰/۴۲	-۰/۵*	۰/۵*	۰/۱۶	-۰/۱۲	۰/۱۸	۱							
آنتوسیانین	-۰/۵۳*	-۰/۶۵**	۰/۱۷	۰/۳۵	۰/۶۱**	۰/۵۹**	۰/۱۶	۱						
سوپراکسید دیسموتاز	-۰/۹۵**	-۰/۶۸**	۰/۳۱	۰/۳۴	۰/۶۱**	۰/۶۳**	۰/۴۲	۰/۴۴	۱					
کاتالاز	-۰/۳۸	-۰/۵۲*	۰/۷**	۰/۴۸*	-۰/۲۲	-۰/۴۳*	۰/۶۹**	۰/۲۶	۰/۳۹	۱				
گایاکول پراکسیداز	-۰/۶۳**	-۰/۷۵**	۰/۳۴	۰/۵۳*	-۰/۵۴*	-۰/۶۴**	۰/۵۲*	۰/۵۱*	۰/۶۳**	۰/۶**	۱			
آسکوربات پراکسیداز	-۰/۵۸*	-۰/۶**	۰/۶۷**	۰/۴۹*	-۰/۵۱*	-۰/۴۷*	۰/۵۱*	۰/۳۸	۰/۶۹**	۰/۷۹**	۰/۸۲**	۱		
سولفورفان	-۰/۳۸	-۰/۵۴*	۰/۴۴	۰/۳	-۰/۲۴	-۰/۱۱	۰/۷**	۰/۳۸	۰/۴۴	۰/۶۷**	۰/۸۴**	۰/۷۲**	۱	
وزن خشک	۰/۳۴	-۰/۶۱**	۰/۱۶	۰/۴۷*	۰/۱۸	-۰/۱۹	۰/۶۵**	۰/۲۹	۰/۳۱	۰/۶۶**	۰/۵۸*	۰/۵۲*	۰/۵۸*	۱

**و *: معنی‌داری در سطوح ۱ و ۵ درصد و غیر معنی‌دار

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۴- اثرات مستقیم هر متغییر روی میزان سولفورفان

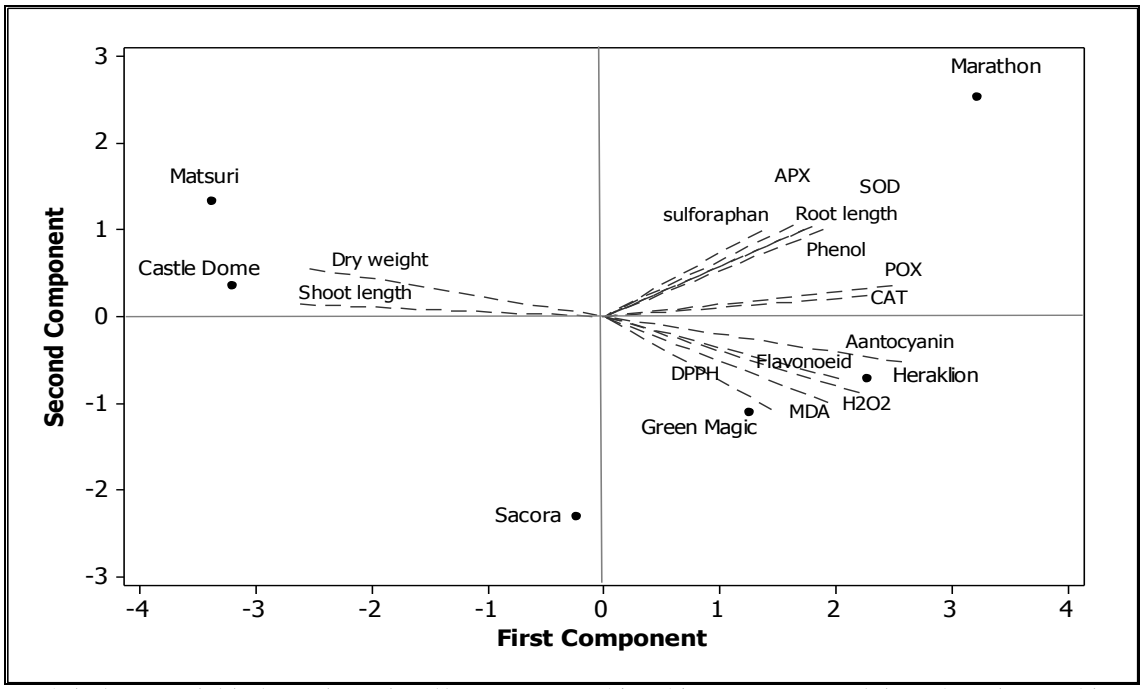
Table 4. Direct effect of each variable through sulforaphan content

صفات	ضرایب	همبستگی با سولفورفان
وزن خشک	۰/۸۵۰	۰/۳۴
طول جوانه	-۰/۵۲۱	-۰/۶۱
طول ریشه	۰/۰۴۱	۰/۱۶
مالون دی الدیید	۰/۲۶۶	۰/۱۸
پراکسید هیدروژن	۰/۸۴۸	-۰/۱۹
فنل	۰/۷۷۱	۰/۶۵
فلاونوئید	-۰/۰۴۳	۰/۲۹
آنتوسیانین	-۰/۱۶۶	۰/۳۱
سوپراکسید دیسموتاز	-۰/۰۳۸	۰/۶۶
کاتالاز	-۰/۳۲۸	۰/۵۸
گایاکول پراکسیداز	-۰/۳۷۳	۰/۵۲
آسکوربات پراکسیداز	-۰/۴۰۷	۰/۵۸
۲،۲-دیفنیل-۱-پریکیل هیدرازیل	-۰/۴۵۸	۰/۴۷

جدول ۵- نسبت توجیه شده هر مولفه اصلی و رتبه مربوط به هر یک از صفات

Table 5. Proportion of each principal component and the related score of each trait

جمع کل واریانس توجیه‌شده	مولفه اول PC_1	مولفه دوم PC_2
	۶/۸۰۸	۵/۷۲۱
وزن خشک	-۰/۹۱۲	-۰/۲۵۱
طول جوانه	-۰/۷۱۵	-۰/۶۲۴
طول ریشه	۰/۳۳۵	۰/۸۷۱
سولفورفان	۰/۱۳۹	۰/۸۳۹
مالون دی الدیید	۰/۹۶۵	-۰/۰۷۷
پراکسید هیدروژن	۰/۹۱۲	-۰/۳۳۵
فنل	۰/۰۱۳	۰/۹۰۱
فلاونوئید	۰/۹۹	-۰/۱۳۲
آنتوسیانین	۰/۹۳۴	-۰/۲۶۷
سوپراکسید دیسموتاز	۰/۲۱۸	۰/۹۶۵
کاتالاز	۰/۵۵۷	۰/۶۵۵
گایاکول پراکسیداز	۰/۵۷۵	۰/۷۰۱
آسکوربات پراکسیداز	۰/۱۷۶	۰/۹۶۳
۲،۲-دیفنیل-۱-پریکیل هیدرازیل	۰/۹۹۷	-۰/۰۵۳



شکل۲- نمودار بای‌پلات روابط بین ژنوتیپ‌های گیاه کلم بروکلی و صفات مورد مطالعه با استفاده از دو مولفه اول از تجزیه مولفه اصلی

Figure 2. Biplot graph of broccoli genotypes and studied traits using first two components of principal component analysis.

www.SID.ir

Archive of SID

ژنوتیپ‌های هراکلیون و گرین ماجیک در نزدیکی این پارامترها قرار گرفتند، در حالی که گرین ماجیک نزدیک‌ترین فاصله را با DPPH و هراکلیون با فلاونوئید داشت. ژنوتایپ ساکورا نشان‌دهنده روند معکوس نسبت به تمام ژنوتیپ‌های دیگر، در این تحقیق در نظر گرفته شده است. ساکورا ضریب منفی بالا را برای هر دو مولفه به‌دست آورد و در یک گروه جداگانه قرار گرفت (شکل ۲). با توجه به رابطه بین پارامترهای اندازه‌گیری‌شده، معلوم شد که وزن خشک و طول جوانه همبستگی منفی با سایر صفات اندازه‌گیری شده دارند. همبستگی مثبت بین محتوای سولفورفان، طول ریشه، محتوای فنل کل، SOD، APX، CAT و POX وجود داشت. همچنین ارتباط معنی‌داری بین میزان فلاونوئید، محتوای آنتوسیانین، MDA و H_2O_2 نشان داده شد. در گروه‌بندی گونه‌ها با توجه به پارامترهای اندازه‌گیری‌شده، ژنوتیپ ماراتون به‌عنوان گروه جداگانه مشخص شد. در این مطالعه، ماراتون بالاترین ارزش را برای صفات اندازه‌گیری شده نسبت به سایر ژنوتیپ‌ها نشان داد، در حالی که مقدار MDA و H_2O_2 آن تقریبا پایین‌تر از سایر ژنوتیپ‌ها بود. نتایج حاصل از تحلیل عاملی تاییدکننده نتایج بالا بوده به‌طوری‌که مولفه اول دارای ضرایب بالایی برای وزن خشک، طول جوانه، مالون دی الدیید، پراکسید هیدروژن، فلاونوئید، آنتوسیانین و ۲،۲-دیفنیل-۱-پریکیل هیدرازیل بوده و در نتیجه می‌توان گفت گزینش بر مبنای مولفه اول منجر به انتخاب ژنوتیپ‌هایی با فعالیت آنتی‌اکسیدانی قوی در مقابل تنش خواهد بود. هم‌چنین مولفه دوم دارای ضریب بالایی برای آنزیم‌های اکسیدانی و سولفورفان بود.

نتایج کلی این مطالعه نشان داد که استفاده از مانیتول به‌عنوان ترکیبب که پتانسیل اسمزی سلول‌ها را کاهش می‌دهد و تنش خشکی را در شرایط آزمایشگاهی شبیه‌سازی می‌کند، یک ترکیب مناسب است. همچنین تنش القاءشده، محتویات صفات اندازه‌گیری‌شده و فعالیت آنزیمی آنتی‌اکسیدان را تغییر داد. همچنین نتایج نشان داد که ماراتن بالاترین میزان سولفورفان را در بین تمام ژنوتیپ‌ها در هر دو شرایط طبیعی و استرس داشت. با توجه به همه این نتایج، پیشنهاد می‌شود که ماراتون به‌عنوان مناسب‌ترین ژنوتیپ‌ها برای اهداف کشت و پرورش در میان تمام ژنوتایپ‌های مورد مطالعه است. ژنوتیپ هراکلیون می‌تواند یک ژنوتیپ مفید باشد که در برنامه‌های اصلاحی به‌همراه ماراتون در نظر گرفته می‌شود. علاوه بر این، تحت هر دو سطح تنش شدید و متوسط، مقدار سولفورفان به‌همراه ترکیبات فنلی و آنتی‌اکسیدان افزایش یافت؛ بنابراین، می‌توان توضیح داد که شرایط تنش خشکی متوسط (۸۸ میلی‌مولارغلظت مانیتول) که باعث کاهش نسبی در پارامترهای رشد در مقایسه با شرایط کنترلی می‌شود، می‌تواند برای ایجاد مقدار بالاتری از ترکیبات سولفورفان و فنلی در بروکلی قابل استفاده باشد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان بابت در اختیار قرار دادن امکانات برای این مطالعه از دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی ساری و پژوهشکده برنج طبرستان تشکر و سپاسگزاری می‌کنند.

منابع

1. Abou El-Magd, M., A.R. Mahmoud, M.M. Hafiz and A.H. Ali. 2013. Effect of different levels of mineral phosphorus fertilizer and bio-phosphorus on vegetative growth, head yield and quality of broccoli. Research Journal of Agriculture and Biological Sciences, 9(5): 164-169.
2. Aebi, H. 1984. Catalase in vitro. Methods in enzymology, 105: 121-126.
3. Ainsworth, E.A. and K.M. Gillespie. 2007. Estimation of total phenolic content and other oxidation substrates in plant tissues using Folin-Ciocalteu reagent. Nature protocols, 2(4): 875-877.
4. Baxter, A., R. Mittler and N. Suzuki. 2014. ROS as key players in plant stress signalling. Journal of experimental botany, 65(5): 1229-1240.
5. Beecher, C.W. 1994. Cancer preventive properties of varieties of Brassica oleracea: a review. The American journal of clinical nutrition, 59(5): 1166S-1170S.
6. Berger, J., J. Palta and V. Vadez. 2016. Review: An integrated framework for crop adaptation to dry environments: Responses to transient and terminal drought. Plant Science, 253: 58-67.
7. Brader, G., M.D. Mikkelsen, B.A. Halkier and E. Tapio Palva. 2006. Altering glucosinolate profiles modulates disease resistance in plants. The Plant Journal, 46(5): 758-767.
8. Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical biochemistry, 72: 248-254.
9. Brand-Williams, W., M.E. Cuvelier and C. Berset. 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. LWT-Food science and Technology, 28(1): 25-30.
10. Chaves, M.M., J. Flexas and C. Pinheiro. 2009. Photosynthesis under drought and salt stress: regulation mechanisms from whole plant to cell. Annals of botany, 103(4): 551-560.
11. Dazy, M., V. Jung, J.F. Férard and J.F. Masfaraud. 2008. Ecological recovery of vegetation on a coke-factory soil: role of plant antioxidant enzymes and possible implications in site restoration. Chemosphere, 74(1): 57-63.
12. De Dorlodot, S., B. Forster, L. Pagès, A. Price, R. Tuberosa and X. Draye. 2007. Root system architecture: opportunities and constraints for genetic improvement of crops. Trends in plant science, 12(10): 474-481.

www.SID.ir

Archive of SID

13. Dinkova-Kostova, A.T., J.W. Fahey, K.L. Wade, S.N. Jenkins, T.A. Shapiro and E.J. Fuchs. 2007. Induction of the Phase 2 Response in Mouse and Human Skin by Sulforaphane-containing Broccoli Sprout Extracts. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 16: 851-7.
14. Gawlik-Dziki, U. 2008. Effect of hydrothermal treatment on the antioxidant properties of broccoli (Brassica oleracea var. botrytis italica) florets. Food chemistry, 109(2): 393-401.
15. Giannopolitis, C.N. and S.K. Ries. 1977. Superoxide dismutases I. Occurrence in higher plants. Plant physiology, 59(2): 309-314.
16. Gu, Y., Q. Guo, L. Zhang, Z. Chen, Y. Han and Z. Gu. 2011. Physiological and biochemical metabolism of germinating broccoli seeds and sprouts. Journal of agricultural and food chemistry, 60: 209-213.
17. Guo, R., G. Yuan and Q. Wang. 2011. Effect of sucrose and mannitol on the accumulation of health-promoting compounds and the activity of metabolic enzymes in broccoli sprouts. Scientia Horticulturae, 128(3): 159-165.
18. Gupta, B. and B. Huang. 2014. Mechanism of salinity tolerance in plants: physiological, biochemical, and molecular characterization. International journal of genomics, pp: 1-18.
19. Han, S.K. and D. Wagner. 2014. Role of chromatin in water stress responses in plants. Journal of experimental botany, 65(10): 2785-2799.
20. Heath, R.L. and L. Packer. 1968. Photoperoxidation in isolated chloroplasts: I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. Archives of biochemistry and biophysics, 125(1): 189-198.
21. Hossain, M.A., S. Bhattacharjee, S.M. Armin, P. Qian, W. Xin, H.Y. Li, D.J. Burritt, M. Fujita and L.S.P. Tran. 2015. Hydrogen peroxide priming modulates abiotic oxidative stress tolerance: insights from ROS detoxification and scavenging. Frontiers in plant science, 6 pp.
22. Lemoine, M.L., A.R. Chaves and G.A. Martínez. 2010. Influence of combined hot air and UV-C treatment on the antioxidant system of minimally processed broccoli (Brassica oleracea L. var. Italica). LWT-Food Science and Technology, 43(9): 1313-1319.
23. Nakano, Y. and K. Asada. 1981. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. Plant and cell physiology, 22(5): 867-880.
24. Natella, F., M. Maldini, M. Nardini, E. Azzini, M.S. Foddai, A.M. Giusti, S. Baima, G. Morelli and C. Scaccini. 2016. Improvement of the nutraceutical quality of broccoli sprouts by elicitation. Food chemistry, 201: 101-109.
25. Oomah, B.D. and G. Mazza. 1996. Flavonoids and antioxidative activities in buckwheat. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 44(7): 1746-1750.
26. Osakabe, Y., K. Yamaguchi-Shinozaki, K. Shinozaki and L.S.P. Tran. 2014. ABA control of plant macroelement membrane transport systems in response to water deficit and high salinity. New Phytologist, 202(1): 35-49.
27. Pereira, F.M.V., E. Rosa, J.W. Fahey, K.K. Stephenson, R. Carvalho and A. Aires. 2002. Influence of temperature and ontogeny on the levels of glucosinolates in broccoli (Brassica oleracea var. italica) sprouts and their effect on the induction of mammalian phase 2 enzymes. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 50(21): 6239-6244.
28. Pérez-Balibrea, S., D.A. Moreno and C. García-Viguera. 2011. Improving the phytochemical composition of broccoli sprouts by elicitation. Food Chem, 129(1): 35-44.
29. Riedl, M.A, A. Saxon and D. Diaz-Sanchez. 2009. Oral sulforaphane increases Phase II antioxidant enzymes in the human upper airway. Clin Immunol; 130: 244-51.
30. Saed-Moucheshi, A., H. Pakniyat, H. Pirasteh-Anosheh and M. Azooz. 2014. Role of ROS as signaling molecules in plants. Reactive Oxygen Species, Antioxidant Network and Signaling in Plants"(P Ahmad, ed) Springer Publication, New York, USA, 585-626.
31. Saed-Moucheshi, A., A. Shekoofa and M. Pessarakli. 2014. Reactive oxygen species (ROS) generation and detoxifying in plants. Journal of Plant Nutrition, 37(10): 1573-1585.
32. Swieca, M. and U. Gawlik-Dziki. 2015. Effects of sprouting and postharvest storage under cool temperature conditions on starch content and antioxidant capacity of green pea, lentil and young mung bean sprouts. J.Foodchem, 108 pp.
33. Suzuki, N., R.M. Rivero, V. Shulaev, E. Blumwald and R. Mittler. 2014. Abiotic and biotic stress combinations. New Phytologist, 203(1): 32-43.
34. Uga, Y., K. Sugimoto, S. Ogawa, J. Rane, M. Ishitani, N. Hara, Y. Kitomi, Y. Inukai, K. Ono and N. Kanno. 2013. Control of root system architecture by DEEPER ROOTING 1 increases rice yield under drought conditions. Nature Genetics, 45(9): 1097-1102.
35. Velikova, V., I. Yordanov and A. Edreva. 2000. Oxidative stress and some antioxidant systems in acid rain-treated bean plants: protective role of exogenous polyamines. Plant Science, 151(1): 59-66.
36. Vosough, A., R. Ghouchani and A. Saed-Moucheshi. 2015. Genotypic Variation and Heritability of Antioxidant related Traits in Wheat Landraces of Iran. Biological Forum; Research Trend, 7(2): 43-47.
37. Yuan, Y., L.W. Chiu and L. Li. 2009. Transcriptional regulation of anthocyanin biosynthesis in red cabbage. Planta, 230(6): 11-41.

www.SID.ir

Archive of SID

Effect of Mannitol Stress on Morphological, Biochemical and Polyphenol Parameters in Broccoli Sprouts (*Brassica oleracea* Var. Italica)

Sholeh Kiani[1], Nadali Babaian Jelodar[2], Haleh Akhavan Niaki[3], Nadali Bagheri[4] and Hamid Najafi Zarrini[4]

1- Ph.D. Student of Department of Plant Breeding, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University
2- Professors, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University,
(Corresponding author: n.babaeiyan@umz.ac.ir)
3- Professors of Babol University of Medical Sciences, Cellular and Molecular Biology Research Center, Health Research Institute
4- Associate Professor, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University
Receive: January 15, 2018 Accepted: July 14, 2018

Abstract

Biotic and abiotic stress are one of the most important factors affecting agricultural production. To assess the effect of drought stress induced by mannitol at three levels (0, 88 and 176 mM) on biochemical and polyphenolic traits of six F_1 broccoli hybrids, (Green Magic, Sacura, Heraklion, Marathon, Matsuri and Castell Dom) a factorial experiment based on completely randomized design was implemented at research station of Agricultural Sciences and Natural Resources University, Sari, Mazandaran, Iran in 2016. The results showed that using mannitol as drought stress reduced dry weight (10-25%) and stem length (12 to 30%). The activity of antioxidant enzymes averaged 19 to 230 and the activity of 2,2-diphenyl-1-perryl hydrazil, $\bar{y}$=3 Was significantly in 0.05 level increased in mannitol at 176 mM compared with control. Also, the results showed that mannitol stress increased the amount of sulforaphane, so that the response of sulforaphane to the stress levels was different in different genotypes. Marathon showed the highest sulphoraphane content in all genotypes under normal conditions (6.139) and under stress (14.122). The results of path analysis showed that phenol and some antioxidant enzymes had a direct and significant relationship with sulforaphane in both normal and stress conditions. The Principal Component Analysis showed that 73.5% in normal conditions and 68% in stress conditions from total variation were explained by the first two components. Biplot results categorized the genotypes into three groups. In terms of stress, sulphoraphane and antioxidant enzymes and marathon genotype in the first group, anthocyanin, flavonoids and malondialdehyde, and genotypes of Heraclion and Green magic in the second group and 2, 2-diphenyl-1-perryl hydrazyl, dry weight and stem length, and Genotypes of Matsuri and Castell Dom were placed in the third group. As a result, marathon was the most suitable genotype for economic cultivation in agricultural fields.

Keywords: Analysis Factor, Broccoli, Flavonoid, Malondialdehyde, Sulforaphan

www.SID.ir