

اثر پوترسین بر برخی خصوصیات فیزیولوژیکی و مورفولوژیکی گیاه همیشه‌بهار (*Calendula officinalis* L.) تحت تنش شوری

فاطمه بنی اسدی^۱، وحیدرضا صفاری^{۲*}، علی اکبر مقصدی مود^۳

۱. دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید باهنر کرمان

۲ و ۳. دانشیاران پژوهشکده باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید باهنر کرمان

تاریخ دریافت: ۹۲/۰۳/۲۸؛ تاریخ پذیرش: ۹۳/۱۱/۱۲

چکیده

آزمایشی به منظور بررسی اثر تنش شوری و پوترسین بر گیاه همیشه‌بهار در چهار سطح شوری حاصل از نمک کلرید سدیم با هدایت الکتریکی عصاره اشباع خاک در سطوح ۱، ۳، ۶ و ۹ دسی زیمنس بر متر و پوترسین در سه سطح (صفر، ۱ و ۲ میلی مولار) به صورت آزمایش فاکتوریل و در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۳ تکرار در گلخانه انجام گرفت. صفات مورد بررسی شامل میانگین طول روزنه‌ها در سطح فوقانی و زیرین برگ، محتوی نسبی آب، شاخص کلروفیل، فلورسانس کمینه (F0)، فلورسانس بیشینه (Fm) و عملکرد کوانتومی فتوسیستم II (Fv/Fm) بودند. نتایج به دست آمده از تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که تنش شوری اثر معنی‌داری بر صفات مذکور دارد، به طوری که با افزایش سطوح شوری همه پارامترها به جز فلورسانس کمینه و بیشینه کاهش پیدا کرد. شوری مقدار محتوای آب نسبی، شاخص کلروفیل، عملکرد کوانتومی، میانگین طول روزنه در سطح فوقانی و زیرین برگ را به ترتیب به میزان ۳۰٪، ۲۷/۳٪، ۵٪، ۲۳٪ و ۲۲/۵٪ کاهش داد. کاربرد پوترسین تا حدودی این اثرات منفی ناشی از تنش شوری را در برخی پارامترها از جمله شاخص کلروفیل و عملکرد کوانتومی کاهش داد. پوترسین نیز باعث کاهش طول روزنه‌ها شد.

واژه‌های کلیدی: پلی آمین، عملکرد کوانتومی، روزنه، کلروفیل، محتوای نسبی آب.

مقدمه

مشکل را جدی‌تر ساخته است (Digidem and Mehmet, 2008). روش‌هایی که اخیراً برای بهبود تحمل شوری در گیاهان به‌کاربرده شده‌اند شامل کاربرد خارجی انواع مختلفی از مواد شیمیایی شامل تنظیم‌کننده‌های رشد، محافظت‌کننده‌های اسمزی و مواد معدنی که به نظر می‌رسد مؤثر و مقرون به‌صرفه می‌باشند. استفاده از این قبیل مواد، رشد و عملکرد برخی گونه‌های رشد کرده در شرایط تنش شوری را افزایش می‌دهد (Ashraf et al., 2008). پلی-آمین‌ها هیدروکربن‌های الیفاتیک با وزن مولکولی کم و دارای زنجیره ۳ تا ۱۵ کربنه و دو گروه آمینی انتهایی هستند. این ترکیبات تقریباً در همه موجودات یافت می‌شوند و در طیف وسیعی از فرآیندهای فیزیولوژیکی

تنش شوری همانند بسیاری از تنش‌های غیر زیستی دیگر، رشد گیاه را محدود می‌کند. توقف و کاهش رشد در شرایط تنش شوری را می‌توان به تنش خشکی ناشی از وجود یون‌های محلول در خاک و یا بروز اثرات سمیت یونی و اختلال در جذب سایر عناصر نسبت داد (Munns and Tester, 2008).

شوری حدود یک‌سوم زمین‌های کشاورزی جهان را تحت تأثیر خود قرار داده و در مناطق خشک و نیمه‌خشک به‌عنوان یک مشکل جدی مطرح است. در این مناطق کمبود آب و بارندگی محدود، گرمای زیاد، تبخیر و تعرق بالا، کیفیت پایین آب‌های کشاورزی و یا روش‌های نادرست کشاورزی و مدیریت ضعیف در سیستم‌های آبیاری این

خشکی بوده است (Sayed, 2003). افزایش فلورسانس و کاهش عملکرد کواتومی، بیان‌کننده این است که توان فتوسنتزی گیاه کاهش یافته است و عواملی که باعث کاهش فتوسنتز می‌شوند مانند تنش‌های محیطی، منجر به افزایش کلروفیل فلورسانس می‌شوند (Baker and Rosenqvist, 2004).

کلروفیل نقش‌های مهمی در فرایندهای رشدی گیاه همچون جذب نور، ترکیب با پروتئین، انتقال انرژی در کربوهیدرات‌ها ایفا می‌کند. گزارش‌های متنوعی نشان داده‌اند که کلروفیل در واکنش به تنش‌های محیطی یا پیری برگ کاهش پیدا می‌کند و این در حالی است که پلی-آمین‌های آلفاتیک مانعی در جهت کاهش کلروفیل در مرکبات و منجر به گرفتن نور بیشتر برای بهبود سرعت فتوسنتز شدند، اگرچه مکانیسم مولکولی آن‌ها دقیقاً مشخص نیست (Shi et al., 2010). گزارش‌های مختلفی در مورد نقش پلی‌آمین‌ها در کاهش اثرات تنش شوری وجود دارد، برای مثال گزارش شده است که تیمار پوترسین^۲ که یک پلی‌آمین است موجب افزایش مقاومت گیاه نخودفرنگی (*Pisum sativum* L.) به شوری می‌شود (Hussein et al., 2006). تانگ و نوتن (Tang and Newton, 2005) نیز معتقدند که پوترسین آسیب‌های آنتی‌اکسیدانی که در اثر شوری به وجود آمده را با افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدان‌ها و کاهش لیپید پروکسیداسیون در کالوس‌ها و دانه‌ها کاج ویرجینیا^۳ بهبود بخشید. گیاه همیشه‌بهار با نام علمی (*Calendula officinalis* L.) گیاهی یک‌ساله و علفی از تیره کاسنی‌ها^۴ است که بومی اروپای جنوبی است. ترکیبات اصلی این گیاه دارویی شامل فلاونوئیدها، فلاونول‌ها، گلیکوزیدها و ساپونین است. از این گیاه به‌عنوان یک گیاه زینتی در طراحی فضای سبز نیز استفاده می‌گردد (Re et al., 2009). با توجه به جایگاه این گیاه در تولید داروهای گیاهی و ارزش‌های زینتی و سازگاری با اقلیم کشور ایران، این آزمایش جهت بررسی پاسخ‌های فیزیولوژیک و مورفولوژیک این گیاه به شوری و درک این مطلب که آیا برخی از پلی‌آمین‌ها مانند پوترسین می‌تواند اثرات سوء ناشی از شوری را کاهش دهد انجام گرفت.

ازجمله رشد و نمو گیاهان و جانوران، تحریک تقسیم سلولی، سنتز DNA و پروتئین‌ها، کنترل ریشه‌زایی و جنین‌زایی، واکنش به تنش‌های محیطی زنده و غیرزنده مانند دماهای پایین، بالا، شوری و تنش‌های آبی نقش ایفا می‌کنند (Liu et al., 2007).

در هنگام بروز تنش در گیاهان رفتار روزنه‌ها در پاسخ به این شرایط تغییر می‌یابد زیرا هنگامی که گیاه تحت تأثیر خشکی فیزیولوژیکی ناشی از شوری قرار می‌گیرد با کمبود آب مواجه و اولین پاسخ گیاه معمولاً بسته شدن روزنه‌هاست (Rouhi et al., 2007). روزنه‌ها یک نقش کلیدی در هدایت الکتریکی، پیری و سازگاری با تنش‌های غیرزنده مثل شوری، خشکی، سرما و گرما ایفا می‌کنند (Hetherington and Woodward, 2003). اندازه‌گیری محتوای نسبی آب^۱ می‌تواند تحت تأثیر میزان باز شدن روزنه‌ها قرار گیرد و برخی فرایندهای مهم فیزیولوژیکی و مورفولوژیکی، همچون بزرگ شدن برگ، باز و بسته شدن روزنه و فتوسنتز برگ مستقیماً تحت تأثیر پتانسیل تورژسانس برگ قرار گرفته و با از دست دادن آب برگ تحت تأثیر قرار می‌گیرد (Cicek and Cakirlar, 2002). برخی تنظیم‌کننده‌های رشد همچون پلی‌آمین تعداد و طول روزنه را در سطح رویی برگ جو (*Hordeum vulgare* L.) در شرایط تنش شوری کم کرده است که این مطلب بیانگر این است که این فرایند نوعی سازگاری با تنش شوری بوده و در نتیجه تنفس را کاهش می‌دهد (Çavuşoğlu et al., 2007).

کلروفیل فلورسانس به‌عنوان ابزاری مفید برای نشان دادن مقاومت واریته‌های مختلف به شوری، برای اندازه‌گیری تغییرات CO₂ و پتانسیل آب برگ است و همچنین نشان‌دهنده این مطلب است که چه میزان از انرژی جذب‌شده توسط کلروفیل دچار آسیب شده است (Maxwell and Johnson, 2000). همچنین گزارش‌های متعددی نشان داده‌اند که کلروفیل فلورسانس شاخص خوبی برای نشان دادن میزان مقاومت ژنوتیپ‌های جو به تنش خشکی، ارقام مختلف ذرت (*Zea mays* L.) به خشکی، میزان مقاومت به یخ‌زدگی یولاف بهاره و زمستانه (*Avena sativa* L.)، ارقام مختلف برنج (*Oryza sativa* L.) به شوری و ارقام مختلف سورگم (*Sorghum bicolor* L.) به

2. Putrescine
3. Virginia pine
4. Asteraceae

1. Relative Water Content

مواد و روش‌ها

این آزمایش در گلخانه تحقیقاتی دانشکده کشاورزی دانشگاه شهید باهنر کرمان با دمای حداکثر 30 ± 2 و حداقل 18 ± 2 درجه سانتی‌گراد و رطوبت نسبی ۴۰ درصد با طول روز متوسط ۱۴ ساعت (شدت نور ۸۰۰ میکرومول فوتون بر سانتی‌متر مربع بر ثانیه) انجام شد. ابتدا بذرهاى همیشه‌بهار در گلدان‌های کوچک حاوی کوکوپیت و پرلایت کشت و پس‌ازاینکه گیاهچه‌ها به مرحله ۴ برگى رسیدند بوته‌ها به گلدان‌های پلاستیکی با قطر دهانه ۲۵ سانتی‌متری که حاوی ۲/۵ کیلوگرم خاک لومی شنی بود منتقل شدند. قبل از پر کردن گلدان‌ها جهت کاهش میزان شوری، خاک چندین مرتبه با آب مقطر شسته شد. در هر گلدان ۴ بوته با فاصله یکنواخت قرار گرفت. پس از استقرار کامل بوته‌ها، گلدان‌ها تنک شدند به‌طوری‌که در هر گلدان فقط دو بوته باقی ماند. آزمایش به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۳ تکرار در شرایط کنترل شده گلخانه انجام شد. چهار سطح شوری حاصل از نمک کلروسدیم با هدایت الکتریکی محلول در سطوح ۱، ۳، ۶، ۹ دسی‌زیمنس بر متر به گلدان‌ها در طی چند روز اضافه گردید. نحوه اعمال این تیمار به این صورت بود که ابتدا مقدار نمک موردنظر برای ایجاد سطوح شوری در محیط کشت گلدان‌ها محاسبه و در آب مقطر مصرفی جهت آبیاری گلدان‌ها حل گردید. محلول‌پاشی برگى پوترسین در سه سطح (۱، ۰ و ۲ میلی‌مولار) بعد از اتمام تیمار شوری به‌صورت محلول‌پاشی در سطح برگ انجام شد و ۱۰ روز بعد تکرار شد. در طول دوره‌ی رشد، آبیاری گلدان‌ها به‌وسیله آب مقطر جهت ثابت نگه‌داشتن میزان شوری آن‌ها انجام شد. برای ثابت نگه‌داشتن شوری در سطح معین، گلدان‌ها روزانه توزین شده و با اضافه کردن آب مقطر به وزن اولیه رسانده می‌شد. جهت تأمین عناصر غذایی گیاهان مورد تیمار، محلول غذایی نیمه رقیق‌شده استاندارد هوگلند همراه با آبیاری به گلدان‌ها اضافه گردید.

اندازه‌گیری محتوی آب نسبی یک قطعه ۴ سانتی‌متر مربع از برگ هر بوته را جدا و بلافاصله با استفاده از ترازوی دیجیتال (LIBROR AEL-40SM) با دقت ۰/۰۰۰۱ میلی‌گرم توزین شدند (FW). سپس هر نمونه در داخل پتری دیش حاوی ده میلی‌لیتر آب مقطر قرار گرفته و به مدت چهار ساعت در محل تاریک قرار داده شدند تا کاملاً اشباع شوند. سپس نمونه‌ها از آب مقطر خارج و با کاغذ

خشک‌کن خشک و وزن اشباع آن‌ها اندازه‌گیری شد (SW). پس‌از آن نمونه‌ها در پاکت کاغذی در آون با دمای ۷۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت خشک و توزین شدند (DW). محتوی آب نسبی برگ از رابطه زیر محاسبه شد (Gonzalez and Gonzalez-Vilar, 2003).

$$\%RWC = \frac{FW-DW}{SW-DW} \times 100 \quad [1]$$

که در آن RWC: محتوی آب نسبی، FW: وزن تر برگ، DW: وزن خشک برگ، SW: وزن اشباع برگ.

اندازه‌گیری متوسط طول روزنه‌ها روی نمونه‌های برگى اخذشده برگ بالایی هر بوته لایه‌ای نازک از لاک شفاف رقیق‌شده ناخن کشیده شد، این لایه پس از خشک شدن، با استفاده از نوارچسب شفاف از برگ جدا و روی لام قرار داده شد. این کار موجب شد که تصویر اپیدرم برگ بر روی چسب نواری انتقال یابد. اسلایدهایی آماده‌شده توسط میکروسکوپ نوری با بزرگنمایی 40×10^4 مورد مشاهده قرار گرفت. برای اندازه‌گیری خصوصیات روزنه‌ها به‌طور تصادفی ۵ نقطه سالم از نمونه انتخاب و طول روزنه‌ها در آن اندازه‌گیری گردید. جهت اندازه‌گیری طول روزنه‌ها از یک عدسی چشمی مجهز به میکرومتر استفاده و اندازه روزنه‌ها در مساحت $0/0234$ میلی‌متر مربع از سطح برگ اندازه‌گیری شد. میانگین پنج مشاهده در هر مورد به‌عنوان متوسط اندازه طول روزنه‌ها ثبت شد (Teare et al., 1971).

اندازه‌گیری عملکرد کوانتومی در زمان مناسب بررسی پارامترها ابتدا یک برگ توسط فویل آلومینیومی به مدت ۳۰ دقیقه پوشانده و به تاریکی عادت داده شد. سپس سنسور دستگاه (Junior PAM- Germany) را به آن متصل و با روشن نمودن دستگاه نور در طول موج ۶۹۵ نانومتر از طریق فیبر نوری به برگ تابیده شد. پارامترهای فلورسانس شامل فلورسانس کمینه (F₀)، فلورسانس بیشینه (F_m)، فلورسانس متغیر (F_v)، عملکرد کوانتومی فتوشیمیایی (F_v/F_m)، اندازه‌گیری شدند. سطح نور (PFD) سطح جریان فوتون) ۴۰۰ میکرومول فوتون در مترمربع در ثانیه و زمان تابیدن نور ۵ ثانیه برای تمامی تیمارها انتخاب شد که در مورد هر تیمار ۱۰ بار تکرار شد. عملکرد کوانتومی فتوسیستم نیز از رابطه [۲] محاسبه شد.

$$F_v/F_m = (F_m - F_0) / F_m \quad [2]$$

شاخص کلروفیل نتایج تجزیه واریانس نشان داد که اثرات ساده شوری و پوترسین بر شاخص کلروفیل معنی‌دار بودند ($P < 0.01$) (جدول ۱). همچنین اثر برهمکنش شوری و پوترسین نیز معنی‌دار بود (جدول ۱). پوترسین اثرات متفاوتی بر سطوح مختلف شوری بر شاخص کلروفیل داشت، به‌گونه‌ای که پوترسین ۱ میلی‌مولار نسبت به عدم کاربرد، شاخص کلروفیل را در سطوح شوری ۱ و ۳ دسی‌زیمنس بر متر به ترتیب ۲۲ و ۱۲ درصد افزایش داد. در شوری ۶ دسی‌زیمنس بر متر تأثیر ۲ میلی‌مولار پوترسین در افزایش شاخص کلروفیل بارزتر از غلظت پایین‌تر این ماده بود. در بالاترین سطح شوری بین کاربرد پوترسین و عدم کاربرد آن تفاوت معنی‌داری دیده نشد (شکل ۱). کاهش کلروفیل در اثر شوری قبلاً توسط سلبو و همکاران (Slabu et al., 2009) در گیاه باقلا (*Vicia faba* L.) گزارش شده است. گزارش شده است که تنش باعث تخریب کلروپلاست و کاهش میزان کلروفیل در گندم (*Triticum aestivum* L.) شد که به نظر می‌رسد این کاهش به دلیل عدم سنتز این ماده و افزایش اتیلن در شرایط تنش باشد (Khan, 2003). عموماً مقدار کلروفیل با افزایش شوری کاهش می‌یابد و این کاهش ممکن است به دلیل تشکیل آنزیم‌های پروتئینی همچون کلروفیلاز که واکنشی به کاهش کلروفیل است یا صدمه به دستگاه فتوسنتزی باشد (Dogan, 2011). تایز و زایگر (Taiz and Zeiger, 2001) بیان کردند افزایش مقدار کلروفیل در اثر تنش ملایم به دلیل افزایش وزن مخصوص برگ است. نتایج این پژوهش با نتایج کوهن و همکاران (Cohen et al., 2004) که نشان دادند پلی-آمین‌ها از تخریب کلروفیل در شرایط تنش‌زا جلوگیری می‌کنند همسو است. این اثرات می‌تواند به اثرات آنتی‌اکسیدانی پلی‌آمین‌ها نیز مرتبط باشد.

میانگین طول روزنه در سطح روی و زیر برگ اثر تیمار شوری، پوترسین و برهمکنش آن‌ها بر متوسط طول روزنه در سطح رویی برگ معنی‌دار بود ($P < 0.01$) (جدول ۱). کاربرد ۱ و ۲ میلی‌مولار پوترسین نسبت به عدم کاربرد آن، متوسط طول روزنه در سطح رویی برگ را به ترتیب در شوری ۱ و ۳ دسی‌زیمنس بر متر به میزان ۷ و ۸ درصد کاهش داد (شکل ۲). کاربرد پوترسین در سطوح ۶ و ۹ دسی‌زیمنس بر متر تأثیر معنی‌داری بر متوسط طول روزنه در سطح رویی برگ نداشت.

برای تجزیه و تحلیل داده‌ها از نرم‌افزار SAS 9/1 استفاده و مقایسه میانگین تیمارها برای صفات مورد بررسی توسط آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۵ درصد انجام گرفت. برای رسم نمودارها از نرم‌افزار Excel استفاده گردید.

نتایج و بحث

محتوای نسبی آب برگ اثر تیمار شوری بر محتوای نسبی آب برگ معنی‌دار بود ($P < 0.01$) (جدول ۱). نتایج تجزیه واریانس نشان دادند که با افزایش شوری محتوای نسبی آب کاهش یافت. به طوری که مقدار محتوای نسبی آب برگ در بالاترین سطح شوری نسبت به پایین‌ترین سطح شوری به میزان ۳۰٪ کاهش یافت (جدول ۲). اثر تیمار پوترسین نیز بر محتوای نسبی آب برگ معنی‌دار بود ($P < 0.05$) (جدول ۱). کاربرد پوترسین ۲ میلی‌مولار نسبت به عدم مصرف آن، موجب افزایش ۱۲ درصدی محتوای نسبی آب گردید (جدول ۲)، اما اثرات متقابل شوری و پوترسین بر محتوای نسبی آب برگ معنی‌دار نبود (جدول ۱). در اثر شوری مقدار آب جذب‌شده توسط گیاه کاهش می‌یابد که می‌تواند مربوط به کاهش پتانسیل آب محیط ریشه و کاهش آب قابل جذب باشد (Levitt, 2001). کاهش محتوای نسبی آب تحت تنش شوری در گیاهان دیگر مثل زنبق (*Iris lactea*) نیز گزارش شده است (Wang et al., 2012). کاهش محتوای رطوبت نسبی برگ در اثر شوری منجر به بسته شدن روزنه‌ها، کاهش فتوسنتز و در مقادیر شدید منجر به توقف انتقال الکترون، ممانعت نوری و تخریب غشا می‌شود و در نتیجه می‌توان انتظار داشت که رشد گیاه کاهش یابد (Ben-Asher et al., 2006). از طرفی روبینسکا و همکاران (Rubinowska et al., 2012) نشان دادند که پلی‌آمین‌ها باعث افزایش محتوای نسبی آب در گل رز (*Rosa* 'Red Berlin') می‌شوند. آن‌ها عنوان کردند که پلی‌آمین‌ها ممکن است کانال‌های یونی خاصی را تعدیل و نفوذپذیری غشاء به کلسیم افزایش و مقدار این عنصر در سیتوپلاسم بالا رفته که منجر به غیرفعال شدن ورود یک‌سویه پتاسیم در غشاء پلازما گردیده که نتیجه آن تحریک انسداد روزنه و کاهش خروج آب از آن خواهد بود. افزایش محتوای نسبی آب با پلی‌آمین ممکن است به تنظیم اسمزی گیاه با افزایش پرولین نیز نسبت داده شود (Duan et al., 2008).

جدول ۱. تجزیه واریانس برخی شاخص‌های فیزیولوژیک همیشه‌بهار تحت تأثیر تیمارهای شوری و پوترسین

Table 1. ANOVA of some physiological characters of calendula as effected by salinity and putrescine

S.O.V	df	محتوای آب نسبی آزادی	شاخص کلروفیل	میانگین مربعات MS		فلورسانس کمینه (F ₀) Initial fluorescence	فلورسانس بیشینه (F _m) Maximum fluorescence	عملکرد کوانتومی فتوسیستم (II) (F _v /F _m)
				میانگین طول روزنه روی برگ Mean stomatal length on abaxial side of leaf	میانگین طول روزنه زیر برگ Mean stomatal length on adaxial side of leaf			
شوری Salinity	3	1043.43**	127.65**	9.98**	8.92**	20992.91**	262507.29**	0.0034**
پوترسین Putrescine	2	295.75*	16.45**	0.40*	1.36**	1300.75**	4742.11 ^{ns}	0.0014**
شوری × پوترسین Salinity × Putrescine	6	33.82 ^{ns}	9.131**	0.36*	0.063 ^{ns}	299.41 ^{ns}	1603.96 ^{ns}	0.00059*
خطا Error	24	83.41	1.00	0.14	0.11	228.75	7472.16	0.00013

* و ** به ترتیب اختلاف معنی‌دار در سطح ۵ درصد و ۱ درصد و ^{ns} عدم اختلاف معنی‌دار را نشان می‌دهند.

* and ** indicate a significant difference at 0.05 and 0.01 probability levels, respectively; ^{ns} means non-significant difference.

تنش شوری اقدام به افزایش مقاومت روزنه‌ای می‌کنند. بسته شدن روزنه‌ها توسط پلی‌آمین‌ها تنظیم می‌شود که این باعث بهبود فتوسنتز می‌شود. در این صورت ممکن است مقدار بیشتری از CO₂ در دسترس به‌وسیله آنزیم‌های فتوسنتزی تثبیت شود. با توجه باینکه بیشترین نقش پلی-آمین‌ها در کاهش تنش‌های محیطی است، ولی مکانیسم‌های خاص آن‌ها در تنظیم روزنه‌ها هنوز واضح نیستند.

فلورسانس کلروفیل (عملکرد کوانتومی) اثرات ساده شوری و پوترسین در ارتباط با فلورسانس کمینه (F₀) معنی‌دار بود (P<0.01) (جدول ۱). مقایسه میانگین‌ها نشان داد که با افزایش سطوح شوری میزان فلورسانس کمینه افزایش و در مقابل با افزایش سطوح پوترسین میزان (F₀) کاهش یافت (جدول ۲). برهمکنش شوری و پوترسین بر فلورسانس کمینه معنی‌دار نبود (جدول ۱). در این آزمایش بیشترین مقدار (F₀) در شوری ۹ دسی‌زیمنس بر متر و کمترین مقدار (F₀) در پایین‌ترین سطح شوری دیده شد (جدول ۲). عموماً در شرایط تنش در اثر تخریب مراکز واکنش PSII مقدار (F₀) با افزایش شدت تنش، نسبت به شرایط عادی افزایش می‌یابد (Liang et al., 1997). اگرچه زئیر و همکاران (Zair et al., 2003) بیان کردند که تنش

اثر تیمار شوری بر متوسط طول روزنه زیر برگ نیز معنی‌دار بود (P<0.01) (جدول ۱). نتایج مقایسه میانگین نشان دادند که با افزایش شوری میانگین طول روزنه زیر برگ همانند سطح روی کاهش یافت به‌طوری‌که طول روزنه در بالاترین سطح شوری نسبت به پایین‌ترین سطح شوری به میزان ۲۲/۳٪ کاهش یافت (جدول ۲). اثر پوترسین بر میانگین طول روزنه زیر برگ نیز معنی‌دار بود (P<0.01) (جدول ۱). نتایج مقایسه میانگین نشان دادند که با افزایش غلظت پوترسین طول روزنه در سطح زیرین برگ کاهش بیشتری نسبت به سطح رویی برگ داشت به‌طوری‌که میانگین طول روزنه در سطح زیر برگ به مقدار ۷٪ کاهش یافت (جدول ۲). از طرف دیگر اثر متقابل شوری و پوترسین بر متوسط طول روزنه در سطح زیرین برگ معنی‌دار نبود (جدول ۱). کوسگلو و همکاران (Çavuşoğlu et al., 2007) نشان دادند که کاربرد ترکیبات مختلفی از تنظیم‌کننده‌های رشد مانند کینتین، اسید جیبرلیک، براسینوستروئید و پلی-آمین تحت شرایط شوری موجب تغییراتی در طول و عرض روزنه در سطح رویی و زیرین برگ جو می‌گردد. تنش شوری به دلیل برهم زدن تعادل متابولیکی، کمبود مواد معدنی و تنش اسمزی موجب بستن روزنه‌ها می‌شود (Pardia and Das, 2005). مانوس (Munns, 2002) گزارش کرد گیاهان برای حفظ وضعیت آبی خود در شرایط

به‌تنهایی تغییرات معنی‌داری در (F₀) ایجاد نمی‌کند. از سوی دیگر بهرا و همکاران (Behera et al., 2002) نشان دادند به علت دگرگونی ساختار و تغییر در رنگ‌دانه‌های فتوسیستم II، فلورسانس اولیه F₀ توسط تنش‌های محیطی دچار تغییراتی می‌شود.

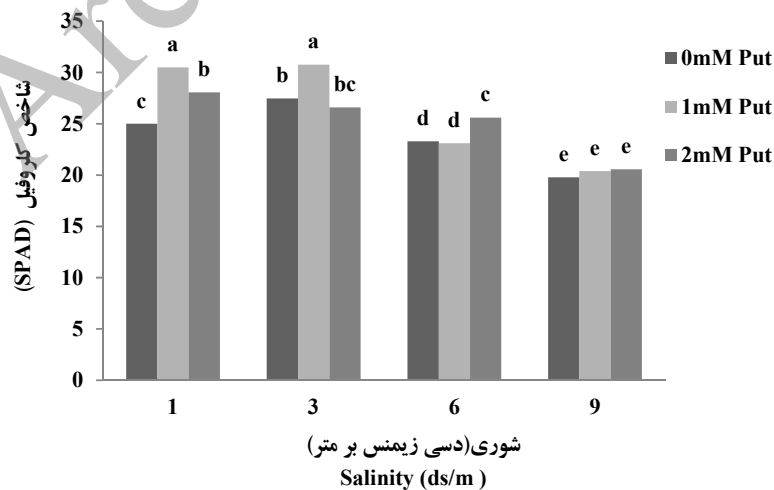
جدول ۲. مقایسه میانگین‌های برخی صفات فیزیولوژیکی گیاه همیشه‌بهار تحت تأثیر تیمارهای شوری و پوترسین

Table 2. Means comparisons of some physiological characters of calendula as effected by salinity and putrescine

تیمارها	محتوای آب نسبی	میانگین طول روزنه زیر	فلورسانس بیشینه	فلورسانس کمینه
	(درصد)	برگ (میکرومتر)	(F _m)	(F ₀)
Treatments	RWC (%)	Mean stomatal length on adaxial side of leaf (μm)	Maximum fluorescence (F _m)	Initial fluorescence (F ₀)
شوری (دسی زیمنس بر متر)				
Salinity (ds/m)				
1	88.00 ^a	10.43 ^a	589.78 ^d	110.00 ^d
3	82.77 ^a	8.99 ^b	727.22 ^c	136.33 ^c
6	72.33 ^b	8.66 ^c	849.33 ^b	180.66 ^b
9	61.00 ^c	8.10 ^d	989.89 ^a	219.33 ^a
پوترسین (میلی مولار)				
Putrescine (mM)				
0	70.58 ^b	9.41 ^a	809.67 ^a	173.50 ^a
1	78.41 ^a	8.99 ^b	787.50 ^b	157.00 ^b
2	79.08 ^a	8.74 ^b	770.00 ^c	154.25 ^b

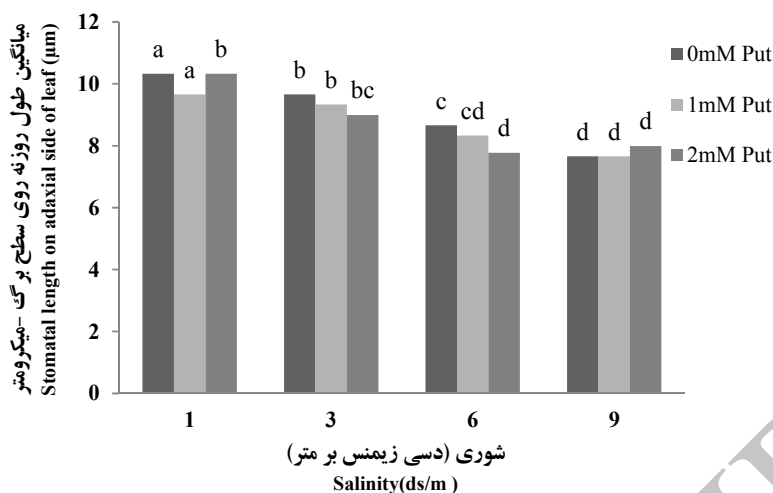
در هر ستون اعدادی که دارای حداقل یک حرف مشترک هستند، فاقد تفاوت آماری بر اساس آزمون دانکن در سطح ۵ درصد می‌باشند.

In each column, similar letters have no statistical difference based on Duncan test at (p≤0.05).



شکل ۱. اثر متقابل شوری و پوترسین بر شاخص کلروفیل گیاه همیشه‌بهار

Fig. 1. Interactions between salinity and putrescine on spad of pot marigold



شکل ۲. اثر متقابل شوری و پوترسین بر متوسط طول روزنه سطح روی برگ گیاه همیشه بهار
Figure 2. Interactions between salinity and putrescine on mean of length man stomatal length on abaxial side of leaf of pot marigold

شد. پوترسین ۲ میلی مولار در سطوح شوری ۶ و ۹ دسی- زیمنس بر متر عملکرد کوانتومی را به ترتیب به مقدار ۴۲ و ۵۲ درصد نسبت به عدم مصرف آن افزایش داد (شکل ۳). این نتایج با نتایج نتندو و همکاران (Netendo et al., 2004) که نشان دادند عملکرد کوانتومی فتوسیستم II در سورگم تحت تنش شوری کاهش می یابد همسو بود. ولی ژانگ و همکاران (Zhang et al., 2009) نشان دادند که این شاخص فیزیولوژیک در گیاه کدو تحت تأثیر شوری و پوترسین قرار نمی گیرد. نسبت F_v/F_m نشان دهنده ظرفیت انتقال الکترون فتوسیستم II است و با عملکرد کوانتوم فتوستنزت خالص همبستگی دارد که در نتیجه باعث بهبود انتقال الکترون از فتوسیستم II می شود و عملکرد کوانتوم فتوستنزت خالص بالا را افزایش می دهد (Paknejad et al., 2007). در این آزمایش با توجه به نتایج به دست آمده می توان چنین استنباط نمود که کاهش F_v/F_m عمدتاً به علت اختلال در ساخت کلروفیل بوده است و کاهش عدد کلروفیل متر نیز این موضوع را تأیید می کند، زیرا فلورسانس کلروفیل به طور مستقیم به فعالیت کلروفیل در مرکز واکنش فتوسیستمها ارتباط داشته و می توان از آن به عنوان معیاری برای اندازه گیری کارایی فتوسیستم نام برد. اخیراً برخی مطالعات نشان داده اند سطوح داخلی پلی آمین ها با محلول پاشی خارجی افزایش می یابد که موجب می گردد

تجزیه واریانس داده ها حاکی از اثرات معنی دار شوری بر فلورسانس بیشینه (F_m) بود ($P < 0.01$) (جدول ۱). اما اثرات ساده پوترسین و شوری همراه با کاربرد پوترسین معنی دار نبود (جدول ۱). با افزایش شوری مقدار F_m افزایش یافت به طوری که بیشترین مقدار F_m در شوری ۹ دسی زیمنس بر متر و کمترین آن در شوری ۱ دسی زیمنس بر متر دیده شد (جدول ۲). مقدار F_v زمانی زیاد می شود که اولین پذیرنده الکترون Q_A در حالت احیاء باشد و این باعث می شود که مقدار فلورسانس کلروفیل افزایش یابد اما زمانی که Q_A در حالت اکسیداسیون است، مقدار فلورسانس کلروفیل کم است. در این حالت میزان F_v کاهش می یابد (Ali Dib et al., 1994). گزارش های دیگر بیان کردند که تنش های محیطی مقدار F_v را به علت ممانعت از فتواکسیداسیون PSII کاهش می دهند (Ali Dib et al., 1994).

نتایج تجزیه واریانس نشان دادند که اثرات ساده شوری و پوترسین بر پارامتر عملکرد کوانتومی (F_v/F_m) معنی دار بود ($P < 0.01$) (جدول ۱). برهمکنش شوری و پوترسین بر عملکرد کوانتومی معنی دار بود ($P < 0.05$) (جدول ۱). نتایج مقایسه میانگین نشان داد که بیشترین مقدار عملکرد کوانتومی در سطوح پایین شوری بدون توجه به مصرف و عدم مصرف پوترسین بود و کمترین مقدار این شاخص در شوری ۹ دسی زیمنس بر متر بدون کاربرد پوترسین دیده

کارایی فتوسنتز در برابر تنش‌های محیطی افزایش یابد. ثابت‌شده است که کاربرد خارجی پلی‌آمین‌ها می‌تواند گیاه را در برابر صدمات اکسیداتیو و پروکسیداسیون لیپیدها محافظت کند (Tang and Newton, 2005). همچنین گزارش شده است که پلی‌آمین‌ها از طریق تحریک سنتز ATP انرژی سلول را تأمین کرده و ظرفیت فتوسنتزی با افزایش کارایی فتوشیمیایی فتوسیستم II در شرایط شوری بهبود می‌یابد (Zhang et al., 2009). این موضوع به اثبات رسیده که تنش شوری تغییرات در دستگاه فتوسنتزی را تحریک می‌کند (مرکز واکنش فعال کاهش می‌یابد) (Dernetriou et al, 2007). از طرفی گزارش شده است که پوترسین باعث افزایش مرکز واکنش فعال در گیاه خیار (*Cucumis sativus*) شده است (Zhang et al., 2009). کاربرد خارجی پوترسین می‌تواند این تغییرات را با تحریک سازمان‌دهی مجدد سیستم فتوسنتزی جبران کند. بنابراین پوترسین می‌تواند عاملی برای افزایش مقاومت نسبی در مقابل تنش شوری باشد. همچنین ثابت‌شده است که پوترسین سنتز ATP را در گیاه تنباکو بیش از ۷۰٪ افزایش می‌دهد (Ioannidis et al, 2006).

عملکرد کوانتومی

Salinity (ds/m)	0mM Put	1mM Put	2mM Put
1	0.81 (ab)	0.82 (a)	0.81 (ab)
3	0.80 (abc)	0.81 (ab)	0.81 (ab)
6	0.77 (e)	0.78 (de)	0.81 (ab)
9	0.74 (f)	0.79 (bcd)	0.78 (cde)

سَطوح شوری (دسی زمینس بر متر)
Salinity(ds/m)

■ 0mM Put
■ 1mM Put
■ 2mM Put

شکل ۳. اثر متقابل شوری و پوترسین بر عملکرد کوانتومی گیاه همیشه‌بهار

Figure 3. Interactions between salinity and putrescine on (ΦPSII) pot marigold

احتمالاً پوترسین آسیب‌های ایجادشده در اثر شوری را با افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدان کاهش داده و باعث افزایش نسبی مقاومت گیاه به شوری می‌شود. تحقیقات جامع‌تری در این گیاه و گیاهان مشابه در مورد نقش پوترسین در کاهش تنش شوری موردنیاز است.

نتیجه‌گیری نهایی

به‌طورکلی نتایج این آزمایش نشان داد در شرایط تنش شوری، روزنه‌ها و محتوای نسبی آب برگ گیاه همیشه‌بهار تحت تأثیر قرار می‌گیرد. همچنین شاخص کلروفیل و عملکرد کوانتومی با افزایش شوری کاهش که با کاربرد پوترسین این اثرات نامطلوب به‌طور نسبی تعدیل یافت.

منابع

Ali Dib, T., Monneveux, P. H., Acevedo, J., Nachil, M. M., 1994. Evaluation of proline analysis and chlorophyll fluorescence

quenching measurements as drought tolerance indicator in durum wheat (*Triticum turgidum* L.). Euphytica. 79, 65-73.

- Ashraf, M., Athar, H. R., Harris, P. J. C, Kwon, T. R., 2008. Some prospective strategies for improving crop salt tolerance. *Advance in Agronomy*. 97, 45–110.
- Baker, N. R., Rosenqvist, E., 2004. Applications of chlorophyll fluorescence can improve crop production strategies: an examination of future possibilities. *Journal of Experimental Botany*. 55(403), 1607-1621.
- Behera, R. K., Mishra, P. C., Choudhury, N. K., 2002. High irradiance and water stress induce alterations in pigment composition and chloroplast activities of primary wheat leaves. *Journal of Plant Physiology*. 159(9), 967-973 .
- Ben-Asher, J., Tsuyuki, I., Bravdo, B. A., Sagih, M., 2006. Irrigation of grapevines with saline water, I. leaf area index, stomatal conductance, transpiration and photosynthesis. *Agricultural Water Management*. 83(1-2), 13–21.
- Çavuşoğlu, K., Kılıç, S., Kabar., 2007. Effects of pretreatments of some growth regulators on the stomata movements of barley seedlings grown under saline (NaCl) conditions. *Plant Soil and Environment*. 53(12), 524–528.
- Çiçek, N., Çakırlar, H., 2002. The effect of salinity on some physiological parameters in wo maize cultivar. *Bulgaria Journal of Plant Physiology*. 28(1-2), 66–74.
- Cohen, A. S., Popovic, R. B., Zalik, S., 2004. Effects of polyamines on chlorophyll and protein content, photochemical activity, and chloroplast ultrastructure of barley leaf discs during senescence. *Plant Physiology*. 64(5), 717-720.
- Dernetriou, G., Neonaki, C., Navakoudis, E., Kotzabasis, K., 2007. Salt stress impact on the molecular structure and function of the photosynthetic apparatus the protective role of polyamines. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*. 1767(4), 272–280.
- Digdem, K., Mehmet, Y., 2008. Germination, seedling growth and relative water content of shoot in different seed sizes of triticale under osmotic stress of water and NaCl. *African Journal of Biotechnology*. 7(16), 2862-2868.
- Dogan, M., 2011. Antioxidative and proline potential as a protective mechanism in soybean plants under salinity stress. *African Journal of Biotechnology*. 10(32), 5972-5978.
- Duan, J., Li, J., Guo, Sh., Kang, Y., 2008. Exogenous spermidine affects polyamine metabolism in salinity-stressed *Cucumis sativus* roots and enhances short-term salinity tolerance. *Journal of Plant Physiology*. 165, 1620- 1635.
- Gonzalez L., Gonzalez-Vilar, M., 2003. Determination of relative water content, p.207-212. In: Manuel, J., Goger, R. (Eds), *Handbook of Plant Ecophysiology Techniques*. Kluwer Academic Publishers, London
- Hetherington, A. M., Woodward, F. I., 2003. The role of stomata in sensing and driving environmental change. *Nature*. 424, 901-908.
- Hussein, M. M., Nadia, EL-Geready, H. M., EL-Desuki, M., 2006. Role of putrescine in resistance to salinity of pea plants (*Pisum sativum* L.). *Applied Science Research*. 2, 598- 604.
- Ioannidis, N. E., Sfichi, L., Kotzabasis, K. 2006. Putrescine stimulates chemiosmotic ATP synthesis. *Biochim et Biophysica Acta*. 1757(7), 821– 828.
- Khan, N.A., 2003. NaCl inhibited chlorophyll synthesis and associated changes in ethylene evolution and antioxidative enzyme activities in wheat. *Plant Biology*. 47(3), 437-440.
- Levitt, J., 2001. *Responses of Plants to Environmental Stresses*. Water, radiation, salt, and other stresses. Academic Press, New York. 607 P .
- Liang, J., Zhang, J., Woog, M., 1997. Can stomatal closure caused by xylem ABA explain the inhibition of leaf photosynthesis under soil drying? *Photosynthesis Research*, 51(2),149-159.
- Liu, J. H., Kitashiba, H., Wang, J., Ban, Y., Moriguchi, T., 2007. Polyamines and their ability to provide environmental stress tolerance to plants. *Plant Biotechnology*. 24(1), 117-126 .
- Maxwell, K., Johnson, G. N., 2000. Chlorophyll fluorescence- A practical guide. *Journal of Experimental Botany*. 51(345), 659–668.
- Munns, R., Tester, M., 2008. Mechanisms of salinity tolerance. *Annual Review of Plant Biology*. 59, 651–681
- Netondo, G.W., Onyango, W.J.C., Beck, E., 2004. Growth and gas exchange

- characteristics Avocado plants under salinity stress. *Crop Science*. 44, 806-811
- Paknejad, F., Nasri, M., Tohidi Moghadam, H. R., Zahedi, H., Jami Alahmad, M., 2007. Effects of drought stress on chlorophyll fluorescence parameters chlorophyll content and grain yield of wheat cultivars. *Journal of Biological Sciences*. 7(6), 841-847 .
- Parida, A.K., Das, A.B., 2005. Salt tolerance and salinity effects on plants: Review. *Ecotoxicology and Environment Safety*. 60, 324-349.
- Re, T. A., Mooney, D., Antignac, E., Dufour, E., Bark, I., Srinivasan, V., Nohynek, G., 2009. Application of the threshold of toxicological concern approach for the safety evaluation of calendula flower (*Calendula officinalis*) petals and extracts used in cosmetic and personal care products. *Food and Chemical Toxicology*, 47(6), 1246-1254.
- Rouhi, V., Samson, R., Lemeur, R., Van Damme, P., 2007. Photosynthesis gas exchange characteristics in three different almond species during drought stress and subsequent recovery. *Environmental and Experimental Botany*. 59, 117-129.
- Rubinowska, K., Pogroszewska, E., Michalek W., 2012. The effect of polyamines on physiological parameters of post-harvest quality of cut stems of Rosa 'Red Berlin'. *Acta Scientiarum Polonorum Hortorum Cultus*. 11, 81-93.
- Sayed, O.H., 2003. Chlorophyll fluorescence as a tool in cereal crop research. *Photosynthetica*. 41, 321-330.
- Shi, J., Fu, X.Z., Peng, T., Huang, X.S., Fan, Q.J., Liu, J.H., 2010. Spermine pretreatment confers dehydration tolerance of citrus in vitro plants via modulation of antioxidative capacity and stomatal response. *Tree Physiology*. 30, 914-922.
- Slabu, C., Zörb, C., Steffens, D., Schubert, S., 2009. Is salt stress fo faba bean (*Vicia faba* L.) caused by Na⁺ or Cl⁻ toxicity?, *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*. 172, 644-650.
- Tang, W., Newton, R.J., 2005. Polyamines reduce salt-induced oxidative damage by increasing the activities of antioxidant enzymes and decreasing lipid peroxidation in Virginia pine. *Plant Growth Regulation*. 46, 31-43.
- Taiz J., Zeiger, E., 2001. *Plant Physiology*. Benjamin/Cummings Publication. Company-Hardback.Vol.2. PP379 .
- Teare, I.D., Peterson, C.J., Law, A.G., 1971. Size and frequency of leaf stomata in cultivars at *Triticum aestivum* and other *Triticum* species. *Crop Science*. 11, 496-498.
- Wang, W-Y., Yan, X-Fe., Jiang, Y., Qu, B., Xu Yu-Fe., 2012. Effects of Salt Stress on Water Content and Photosynthetic Characteristics in *Iris lactea* Var. *Chinensis* Seedlings. *Middle-East Journal of Scientific Research*. 12(1), 70-74 .
- Zair, A., Chlyah, K., Sabounji, M., Tittahsen, M., Chlyah, H., 2003. Salt tolerance improvement in some wheat cultivars after application of in vitro selection pressure. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 73, 244-273.
- Zhang, R.H., Li, J., Guo., S.R., Tezuka, T., 2009. Effects of exogenous putrescine on gas-exchange characteristics and chlorophyll fluorescence of NaCl-stressed cucumber seedlings. *Photosynthesis Research*. 100, 155-162.