

بررسی روابط برخی از صفات مهم مورفولوژیک و زراعی با عملکرد و زودرسی و ش در ارقام مختلف پنبه

محمد رضا داداشی^۱ و * برزو کازرانی^۲

۱. گروه کشاورزی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد گرگان، گرگان
۲. گروه زیست‌شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد گرگان، گرگان

چکیده

این تحقیق به منظور بررسی ارتباط عملکرد و زودرسی با ۱۰ صفت اندازه‌گیری شده در ۸ ژنوتیپ پنبه انجام شده است. آزمایش در سال زراعی ۱۳۸۳ در ایستگاه تحقیقات پنبه هاشم‌آباد گرگان در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی (RCBD) با ۴ تکرار اجرا شد. تجزیه واریانس صفات نشان داد که بین ارقام از نظر عملکرد، صفات وزن و ش، ارتفاع بوته، طول بلندترین شاخه رویا، طول شاخه‌زایی پنجم در چین اول در سطح ۵٪ و وزن و ش و زودرسی بین ارقام در چین دوم اختلاف معنی‌دار در سطح ۱٪ وجود دارد، اما در مورد صفات میانگین وزن ۲۰ قوزه در چین اول، تعداد قوزه در کرت در چین اول و دوم، تعداد شاخه رویا و تعداد شاخه‌زایا اختلافی مشاهده نشد. با استفاده از آزمون دانکن مشخص شد که بیشترین عملکرد مربوط به ارقام سای اکرا، سوپر اکرا و H.A.R می‌باشد. بقیه ارقام نیز در یک دسته قرار می‌گیرند. سه رقم به عنوان زودرس‌ترین ارقام شناخته شدند که شامل ارقام سای اکرا، براکت فریگو و برگ دفرمه بود. دیرس‌ترین ارقام نیز شامل ساحل، سوپر اکرا، اکرا برگ قرمز و اسموشالیف بودند. در عین حال رقم شماره H.A.R به عنوان یک رقم میان‌رس شناسایی شد. نتایج آزمایش نشان داد که بین عملکرد با وزن و ش در چین اول همبستگی مثبت و معنی‌داری وجود دارد. ارتفاع و تعداد شاخه‌زایا با عملکرد همبستگی منفی و معنی‌داری داشت. نتایج آنالیز همبستگی نشان داد که ارتفاع، تعداد شاخه‌زایا، وزن و ش در چین دوم، طول شاخه‌زایی پنجم، طول شاخه رویا با زودرسی همبستگی منفی و معنی‌داری داشت. صفت عملکرد در چین اول بالاترین همبستگی مثبت را با زودرسی داشت.

کلمات کلیدی: پنبه، زودرسی، عملکرد، وزن و ش.

مقدمه

است که در بین آنها دو گونه تتراپلوئید ($2n=52$) به نام‌های *G. hirsutum* و *G. barbadense* و نیز دو گونه دیپلوئید ($2n=26$) به نام‌های *G. arboreum* و *G. herbaceum* زراعی هستند. در حال حاضر بیش از ۸۵ درصد از سطح کشت و

پنبه (*Gossypium spp.*) مهمترین گیاه لیفی دنیاست. همچنین این گیاه بعد از سویا دومین گیاه مهم از لحاظ تولید روغن می‌باشد (ارزانی، ۱۳۸۰). پنبه متشکل از ۵۰ گونه مختلف

طرفین و نیم متر از دو انتهای خطوط به عنوان حاشیه در نظر گرفته شدند. در این آزمایش به منظور انجام تجزیه واریانس، مقایسه میانگین‌ها و همبستگی صفات اندازه گیری شده با عملکرد و زودرسی، صفات تعداد قوزه در چین اول، ارتفاع بوته، طول بلندترین شاخه رویا، طول شاخه زایای پنجم، تعداد شاخه رویا، تعداد شاخه زایا، وزن وش در چین اول، وزن متوسط ۲۰ قوزه در چین اول، وزن وش در چین دوم، تعداد قوزه در چین دوم پیش از هر نوع تجزیه، آزمون جمع‌ناپذیری و تست نرمال بودن توزیع انحرافات انجام شد. در مرحله بعدی تجزیه واریانس صفات سپس با استفاده از آزمون دانکن مقایسات میانگین صفات به دست آمد. نهایتاً از طریق ضرایب همبستگی ساده صفات، روابط بین صفات مشخص شد که در این تحقیق سعی شده ارقام مختلف از لحاظ صفات مذکور بررسی شوند. برای مطالعه همبستگی صفات با عملکرد و زودرسی تعداد ۱۰ صفت مورد توجه قرار گرفت. بنابراین شناسایی صفاتی از ۱۰ صفت اندازه‌گیری شده که دارای همبستگی بالایی با عملکرد و زودرسی هستند در یک برنامه‌گزینش ضروری است. لذا هدف از این مطالعه مقایسه عملکرد و زودرسی در ارقام مختلف پنبه اعم از وارداتی و هیبرید می باشد. برای تجزیه داده‌ها از نرم‌افزارهای MSTATC و SPSS استفاده گردید.

جدول ۱. شماره و نام ژنوتیپهای مورد استفاده

شماره	رقم پنبه
۱	سای اکرا
۲	ساحل
۳	سوپر اکرا
۴	براکته فریگو
۵	اکرا برگ قرمز
۶	اسموشالیف
۷	برگ دفرمه
۸	H.A.R

تولید جهانی پنبه به دو گونه *G. hirsutum* (پنبه آپلند یا پنبه‌های طول تار متوسط) و حدود ۸ درصد آن به گونه *G. barbadense* (پنبه مصری یا پنبه الیاف بلند) اختصاص دارد (Zhang et al. 2000). دو هدف اصلاحی مهم افزایش عملکرد و زودرسی می باشد، زودرسی به عنوان یک عامل مهم در گزینش واریته‌های مطلوب برای مناطقی نظیر گرگان و گنبد که با مشکل بارندگی‌های اواخر فصل رشد در کشت پنبه مواجه هستند، باید مورد توجه قرار گیرد. عملکرد و زودرسی جزء صفات پیچیده و پلی ژنیک هستند. در صفات کمی و کیفی، عمل ژن‌ها بررسی شده (Godoy et al., 1999; Subhan et al., 2002)، اما در این تحقیق سعی شده اثرات صفات کمی بر عملکرد و زودرسی پنبه بررسی گردد. در ضمن تلاش‌هایی در جهت اصلاح وزن قوزه، عملکرد وش، درصد کیل، طول الیاف، استحکام الیاف و مقاومت به استرس زنده (آفات و امراض) و غیر زنده (خشکی و سرما و...) در پنبه انجام شده است (Singh, 1998; Aslamkhan et al. 2002). Sang Wan and Yadawa (1987); Alam and Islam (1991) and Carvalho et al. (1994) همبستگی مثبت و معنی دار دو صفت تعداد بذر در قوزه و وزن قوزه با عملکرد را گزارش کرد. در این تحقیق صفت تعداد شاخه زایا همبستگی منفی و معنی‌داری را با عملکرد تک بوته نشان داد که این نتیجه با تحقیقات قبلی محققین از جمله: Sang Wan and Yadawa (1987); Al-Rawi et al. (1987) and Arshad et al. (1993) تطابق نشان نداد. Zhu (1994) با مطالعه ۱۰ صفت در ۳۲ تیپ گلاندلس نشان داد که افزایش شاخص الیاف و کاهش شاخص بذر برای افزایش درصد الیاف و تعداد قوزه در گیاه موثر می‌باشد، ولی در افزایش وزن قوزه اثر منفی نشان داد.

مواد و روش‌ها

در بهار سال ۱۳۸۳، هشت رقم پنبه در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی با چهار تکرار در ایستگاه تحقیقات پنبه هاشم آباد گرگان کاشته شدند (جدول ۱). هر تکرار شامل ۸ کرت بود. در هر کرت، یک رقم در ۱۰ خط ۱۱ متری و با الگوی ۸۰×۲۰ سانتیمتر کاشته شد و دو خط

جدول ۲ - تجزیه واریانس صفات مختلف زراعی در ارقام پنبه مورد بررسی

منبع تغییر	درجه آزادی	وزن وش (چین اول)	میانگین وزن ۲۰ قوزه (چین اول)	وزن وش (چین دوم)	تعداد قوزه در کرت (چین دوم)	تعداد قوزه در کرت (چین اول)	ارتفاع بوته	طول بلندترین شاخه رویا	طول بلندترین شاخه رویا پنجم	تعداد شاخه رویا	تعداد شاخه زایا	عملکرد (گرم در کرت)	زودرسی
بلوک	۳	۵۴۱/۵۳۳	۲۹/۵۲۳	۰/۶۲۹	۱۵/۷۸۷	۱۵/۵۱۲	۰/۰۶	۰/۰۲۱	۴۷/۲۰۵	۰/۰۹	۳۸/۴۶۶	۱۲۱۶۳۲۰۰	۰/۳۲
رقم	۷	۱۶۰/۴۱۶	۸۲/۵۶۹	۰/۳۳۴	۱۲/۷۶۲	۱۲/۵۲۲	۰/۰۰۷	۰/۰۵۸	۶۱/۰۸۹	۰/۴۶۶	۱۲/۳۸۷	۴۲۷۱۲۸۳/۸۱۷	۰/۰۳۹
خطا	۲۱	۴۹/۵۷	۷۴/۸۰۷	۰/۰۳۹	۹/۲۵۹	۶/۰۲۷	۰/۰۰۲	۰/۰۰۲	۱۹/۱۱۹	۰/۲۶۸	۵/۲۴۴	۱۵۶۴۳۳۴/۴۱۲	۰/۰۰۵
ضریب تغییرات		۷/۵	۷/۴۸	۶/۸۸	۲۱/۵۲	۱۷/۸	۲/۱۱	۸/۶۷	۱۵/۰۲	۳۹/۱۸	۱۲/۴۵	۱۲/۴۹	۵/۸۳

ns. * و ** به ترتیب غیرمعنی دار، معنی دار در سطح احتمال ۵٪ و ۱٪

نتایج و بحث

تجزیه واریانس صفات نشان داد که بین ارقام از نظر صفات عملکرد، وزن وش، ارتفاع بوته، طول بلندترین شاخه رویا، طول شاخه زایای پنجم در چین اول در سطح ۵٪ زودرسی و وزن وش در چین دوم بین ارقام اختلاف معنی دار در سطح ۱٪ وجود دارد، اما در مورد صفات میانگین وزن ۲۰ قوزه در چین اول، تعداد قوزه در کرت در چین اول و دوم، تعداد شاخه رویا و تعداد شاخه زایا اختلافی مشاهده نشد (جدول شماره ۲). در تجزیه واریانس صفات مورد بررسی در ارقام برای اکثر صفات تفاوت معنی داری به دست آمد که ناشی از وجود تنوع ژنتیکی بین ارقام بود. با استفاده از آزمون دانکن مشخص شد که بیشترین عملکرد مربوط به ارقام ۱،۳ و ۸ می باشد. بقیه ارقام نیز در یک گروه قرار می گیرند. سه رقم به عنوان زودرس ترین ارقام شناخته شدند که شامل ارقام ۱،۴ و ۷ و دیرس ترین ارقام نیز شامل ۲،۳،۵ و ۶ بودند. در عین حال رقم شماره ۸ به عنوان یک رقم میانرس شناسایی شد. ارقام شماره ۲، ۳، ۴، ۵، ۶ و ۸ بلندترین و ارقام شماره ۱ و ۷ به عنوان پاکوتاه ترین ارقام موجود در این آزمایش شناخته شدند. از نظر طول بلندترین شاخه رویا، رقم شماره ۷ کمترین مقدار را نشان داد. بقیه ارقام نیز در یک دسته قرار گرفتند. شاخه زایای پنجم رقم شماره ۵ بلندترین طول را داشت و بقیه ارقام در یک دسته قرار گرفتند. وش ارقام شماره ۱، ۳، ۴، ۵ و ۷ بیشترین را در چین اول داشتند. بقیه ارقام هم با داشتن وزن وش کمتر در یک دسته قرار گرفتند. وزن وش در ارقام شماره ۲، ۳، ۵، ۶ و ۸ در چین دوم بالاترین میزان را داشتند. ارقام ۴ و ۷ نیز کمترین وش را در چین دوم به خود اختصاص دادند. رقم شماره یک نیز به عنوان یک محصول با وزن متوسط وش در چین دوم معرفی گردید (جدول شماره ۳). گیاه پنبه تحمل نگهداری قوزه های

درشت و سنگین را ندارد، زیرا در شرایط نامساعد محیطی این قوزه های درشت و سنگین ریزش می کنند، قوزه های کوچکتر در عوض با تعداد بیشتر اثر جبران کننده بر روی عملکرد خواهند داشت. لذا با وجود آنکه رقم ساحل درشت ترین قوزه را دارد اما کمترین عملکرد را تولید کرد. رقم دیررس ساحل، با وجود داشتن بالاترین تعداد و سنگین ترین قوزه در چین اول و دوم، به علت ریزش قوزه در اثر بارندگی آخر فصل ریزش کرده و عملکرد پایین تری تولید می کند این نتایج با نتایج قرنجیکی (۱۳۸۰) تطابق دارد. با استفاده از جدول شماره ۴ و بررسی ضرایب همبستگی صفات مورد مطالعه مشخص شد که بین عملکرد و ارتفاع بوته همبستگی منفی در سطح ۱٪ وجود دارد. رابطه منفی ارتفاع بوته با عملکرد نشانگر این است که واریته های کوتاhter بیشتر باید مورد توجه قرار گیرند و این کوتاهی بوته از مشخصات واریته های زودرس می باشد.

در شرایط کمبود آب رابطه بین ارتفاع گیاه و عملکرد مثبت است ولی در شرایطی که آب به اندازه کافی وجود داشته باشد، رابطه بین عملکرد و ارتفاع منفی است (Peng and Krieg, 1991). درباره رابطه بین ارتفاع ساقه و عملکرد نظرات مختلفی ارائه شده است. Briggs and Aytendisu (1980) رابطه بین ارتفاع بوته و محصول دانه را در تراکم های مختلف کاشت مثبت گزارش کرده اند، در حالی که Walton (1971) همبستگی قوی منفی بین طول ساقه و عملکرد دانه را مطرح نموده است که با تحقیق سال ۱۹۶۹ وی که همبستگی را مثبت گزارش کرده بود، مغایر است (Walton, 1971).

جدول ۳. مقایسه میانگین ارقام مورد آزمایش از نظر صفات مختلف با آزمون دانکن

نام رقم	زودرسی	عملکرد	ارتفاع بوته	طول بلندترین شاخه رویا	طول شاخه زایا پنجم	وزن و وزن در چین اول
سای اکرا	ABC	A	BC	A	B	A
	۱/۳۱۹	۱۱۷۳۰	۲/۰۸۳	۱/۷۰۹	۲۹/۳۸	۱۰۲/۷
ساحل	E	C	A	AB	B	C
	۱/۱۶۳	۸۷۰۹	۲/۱۵۶	۱/۵۶۳	۲۵/۰۶	۸۵/۰۳
سوپر اکرا	CDE	AB	ABC	A	B	AB
	۱/۲۳۴	۱۱۰۹۰	۲/۱۱	۱/۶۵	۲۷/۱۹	۹۸/۳
براکته فیگو	A	BC	ABC	A	B	ABC
	۱/۴۰۱	۹۱۲۵	۲/۱۲۴	۱/۶۲	۲۸/۶۹	۹۳/۶۹
اکرا برگ قرمز	E	BC	A	A	A	C
	۱/۱۲۳	۹۵۳۵	۲/۱۸	۱/۷۸۲	۳۷/۳۱	۸۶/۵۹
اسموشالیف	DE	BC	A	A	B	BC
	۱/۱۸۳	۹۶۳۳	۲/۱۶۲	۱/۷۳۳	۳۱/۶۳	۹۰/۳۷
برگ دفرمه	AB	BC	C	B	B	ABC
	۱/۳۵۸	۹۶۲۳	۲/۰۵۶	۱/۳۹۳	۲۷/۸۱	۹۵/۵۴
H.A.R	BCD	ABC	AB	A	B	AB
	۱/۲۸۴	۱۰۶۴۰	۲/۱۳۹	۱/۶۴۹	۲۵/۷۵	۹۸/۱۲

حروف متفاوت در هر ستون نشانگر اختلاف معنی دار در سطح احتمال ۵٪ می باشد.

Arshad et al., (1993) نتیجه گرفتند بین عملکرد وش و ارتفاع گیاه همبستگی مثبت و معنی داری وجود دارد. همان طوری که قبلاً نیز اشاره شد، ساقه ها علاوه بر اینکه محلی به عنوان ذخایر مواد فتوسنتزی قبل از گلدهی به شمار می روند، در استحکام و مقاومت به خوابیدن نیز نقش دارند و به علت داشتن کلروفیل نیز سهمی در کل فتوسنتز گیاه داشته و باعث پیچیده تر شدن نقش آن در عملکرد می شود. بین عملکرد و تعداد شاخه زایا نیز در سطح ۱٪ همبستگی منفی وجود دارد. دلیل این مطلب آن است که با افزایش تعداد شاخه زایا، افزایش تعداد قوزه داریم به نظر می رسد باید عملکرد افزایش یابد اما از آنجا که اندازه قوزه کوچکتر می گردد و میزان وش افت می کند. پس تعداد شاخه زایا در حد مطلوب، مورد نظر است نه آنکه تعداد آن بیش از حد زیاد باشد. ناصری (۱۳۷۴) به نقل از کر بیان کرد در مورد عملکرد، برای اجزای قوزه بخصوص اندازه آن یک میزان مطلوب وجود دارد و این میزان مطلوب در ارقام مختلف یا گروهی از ارقام بر حسب شرایط زراعی و میزان عملکرد متفاوت است. Sang Wan and Yadawa, (1987) اعلام کردند بین عملکرد وش و تعداد شاخه زایا همبستگی مثبت و معنی داری وجود دارد. Arshad et al., (1993) این مورد را تأیید کردند. لازم به ذکر است هر دو این نتایج با نتیجه حاصله این آزمایش تناقض دارد.

جدول ۴. ضریب همبستگی ساده بین صفات مختلف در ارقام پنبه مورد بررسی

عملکرد	زودرسی	تعداد قوزه	ارتفاع بوته	طول شاخه رویا	طول شاخه زایا پنجم	تعداد شاخه رویا	تعداد شاخه زایا	وزن وش در چین اول	میانگین وزن ۲۰ قوزه در چین اول	وزن وش در چین دوم	تعداد قوزه در چین دوم
عملکرد	۱**										
زودرسی	۰/۲۴۴	۱**									
تعداد قوزه	۰/۰۷۸	-۰/۲۲۴	۱**								
ارتفاع بوته	-۰/۵۳۴**	-۰/۶۶**	-۰/۰۸۱	۱**							
طول شاخه رویا	۰/۰۱۶	-۰/۳۸۱*	۰/۱۸۳	-۰/۲۸۱	۱**						
طول شاخه زایا پنجم	-۰/۱۲۵	-۰/۴۶۳**	۰/۱۱۸	-۰/۵۲۲**	-۰/۴۶۳**	۱**					
تعداد شاخه رویا	۰/۱۲۱	-۰/۰۳۵	۰/۱۹۸	-۰/۰۲۶	۰/۷۱۴**	-۰/۰۱۱	۱**				
تعداد شاخه زایا	-۰/۵۲۱**	-۰/۴۹**	-۰/۱۸۷	۰/۳۰۶	۰/۸۹۵**	-۰/۰۳۹	-۰/۰۱۱	۱**			
وزن وش در چین اول	۰/۸۸۶**	۰/۶۵۸**	-۰/۰۳	-۰/۳۲۸	-۰/۱۹۲	-۰/۰۳۹	-۰/۰۳۹	۱**			
میانگین وزن ۲۰ قوزه	-۰/۲۲۶	-۰/۰۲۷	۰/۲۸۶	-۰/۸۹	۰/۲۴۱	-۰/۰۸۹	۰/۰۲	-۰/۱۸۱	۱**		
وزن وش در چین دوم	-۰/۰۲۸	-۰/۹۴۳**	۰/۲۷۴	۰/۳۰۲	۰/۳۷۶*	-۰/۰۵۵	۰/۳۸۸*	-۰/۴۴۴*	-۰/۰۰۲	۱**	
تعداد قوزه در چین دوم	-۰/۱۶۶	-۰/۲۷۱	۰/۸۴**	۰/۰۳۵	۰/۲۶۶	۰/۰۱۷	۰/۰۲۷	-۰/۲۳۷	۰/۲۷۱	۱**	

علت این موضوع را می‌توان بدین صورت توجیه کرد که بین تعداد شاخه زایا و تعداد قوزه همبستگی کمی وجود دارد (Ray and Richmond, 1966). لذا از آنجائیکه تعداد و اندازه قوزه از اجزای عملکرد است (اونر و شالوت، ۱۹۸۳) و بین تعداد شاخه زایا با تعداد و اندازه قوزه همبستگی معنی داری وجود ندارد، بنابراین بین عملکرد و تعداد شاخه زایا ارتباطی وجود ندارد. (Kohel 1974) نشان داد که بین عملکرد پنبه با وزن قوزه رابطه معنی داری وجود دارد. (Donald et al., 1994) نیز ارتباط مثبت و معنی دار بین عملکرد و وزن قوزه را تأیید کرد (Donald et al. 1994; Kohel, 1974; Rolf, 1987). این مورد با نتایج این آزمایش تناقض دارد. Sang Wan and Yadawa, (1987) با بررسی ضرایب همبستگی در ۱۵ رقم پنبه گلاند دار نشان دادند که عملکرد و ش دارای همبستگی مثبت و معنی داری با صفات تعداد قوزه در گیاه، وزن قوزه، ارتفاع گیاه و تعداد شاخه زایا می باشد. بین عملکرد و تعداد قوزه در گیاه همبستگی وجود نداشت که با نتایج Arshad et al., (1993) تناقض دارد. لازم به ذکر است چون صفت تعداد قوزه در دو چین بررسی شده است بنابراین همبستگی دو چین به صورت جدا را نمی توان با صفت عملکرد مقایسه کرد. بررسی ضریب همبستگی صفات مورد مطالعه نشان می دهد که زودرسی با وزن و ش در چین اول همبستگی مثبت در سطح ۱٪ دارد. عالیشاه (۱۳۷۴) بیان کرد که زودرسی با وزن قوزه همبستگی منفی و معنی داری دارد. بین زودرسی با ارتفاع بوته همبستگی منفی در سطح ۱٪ وجود دارد. این نتیجه با نتایج عالیشاه (۱۳۷۴) مطابقت دارد. ناصری (۱۳۷۴) به نقل از نامکن و همکارانش نشان داد که با کوتاه کردن فاصله گلدهی ساقه عمودی یا اصلی، زودرسی افزایش می یابد یعنی طبق نظر آنها پنبه کوتاه، زودرس تر است. همبستگی بین زودرسی با طول بلندترین شاخه رویا در سطح ۵٪ منفی است. این نتیجه نیز با نتایج عالیشاه (۱۳۷۴) همخوانی دارد. ناصری (۱۳۷۴) به نقل از ورهالان و همکاران اذعان داشت که تولید پنبه های زودرس تر ممکن است ناشی از افزایش تعداد غنچه های زودرس یا نتیجه وسیع تر شدن دامنه حداکثر تشکیل قوزه باشند. یادآوری می کند که زودرسی با ارتفاع بوته، طول شاخه رویا و تعداد شاخه رویا همبستگی منفی از خود نشان داد. این بدان معنی است که وارسته های زودرس ارتفاع کوتاهتری داشته و شاخه های فرعی کمتری دارند. زودرسی با طول شاخه زایای پنجم

همبستگی منفی در سطح ۱٪ دارد. ناصری (۱۳۷۴) به نقل از ری و ریچموند بیان کرد که بین زودرسی با تعداد شاخه زایا در یک گره پایین روی جوانه اصلی ارتباط وجود دارد. ناصری (۱۳۷۴) اظهار داشت که لو و همکاران نتیجه فوق را تأکید کردند. ناصری (۱۳۷۴) به نقل از هسکت و همکاران ثابت کرد که بین زودرسی با تعداد نقاط گل دهنده در هر شاخه زایا ارتباط وجود دارد. در ضمن بین زودرسی و تعداد شاخه زایا روی شاخه رویا ارتباط وجود دارد. آنها نشان دادند که هر دوی همبستگی های فوق به صورت مثبت می باشند. بین زودرسی با طول شاخه زایای پنجم همبستگی منفی در سطح ۱٪ داریم. این ارتفاع با تعداد شاخه زایا همبستگی مثبت در سطح ۱٪ داریم که با نتایج عالیشاه (۱۳۷۴) مطابقت دارد (Donald et al., 1994; Kohel, 1974; Rolf, 1987)، اما بین ارتفاع با طول شاخه رویا همبستگی مشاهده نشده که با نتایج عالیشاه (۱۳۷۴) تناقض دارد. بین عملکرد و زودرسی نیز همبستگی مشاهده نشده است، اما طلعت (۱۳۸۰) نتایج متفاوتی بدست آورد. بین وزن و ش در چین اول و دوم همبستگی منفی وجود دارد بنابراین با توجه به فرمول زیر ملاحظه می شود که با افزایش وزن و ش در چین اول و کاهش وزن و ش در چین دوم زودرسی افزایش می یابد. پس طبیعی است که بین زودرسی با وزن و ش در چین دوم در سطح ۱٪ همبستگی منفی داشته باشیم. بهترین روش زودرسی، پیدا کردن نسبت وزن و ش در چین اول بر وزن و ش در چین اول و دوم می باشد (یزدی صمدی، ۱۳۷۳).

$$\text{وزن و ش در چین اول} = \frac{\text{وزن و ش در چین اول}}{\text{وزن و ش در چین اول} + \text{وزن و ش در چین دوم}}$$

ناصری (۱۳۷۴) به نقل از هیرن نشان داد که بین زودرسی و گلدهی یا غنچه دهی همبستگی وجود دارد. ناصری (۱۳۷۴) به نقل از گیپسون و ری بیان کرد که بین زودرسی و دوره های کوتاهتر قوزه دهی ارتباط وجود دارد. Marsha and Stewart (1994) نشان دادند که تعداد شاخه های رویا تحت تأثیر عوامل توارثی و محیط قرار می گیرد و با هیچیک از صفات مورفولوژیکی همبستگی و رابطه ای ندارد. تعداد شاخه های زایا از سوی دیگر همبستگی نزدیکی با ارتفاع گیاه نشان می دهد. همچنین بین تعداد شاخه های زایا و تعداد قوزه همبستگی پائین گزارش شده است (جدول شماره ۴).

یزدی صمدی، ب. و عبدمیثانی، س. (۱۳۷۳) اصلاح نباتات زراعی. چاپ سوم. مرکز نشر دانشگاهی. صفحات ۷۵-۸۱.

ناصری، ف. (ترجمه). (۱۳۷۴) پنبه، چاپ اول، معاونت فرهنگی آستان قدس رضوی. صفحات ۱۱۹-۱۰۸.

Alam, A. K. and H. Islam. (1991) Correlation and path coefficient analysis of yield and yield contributing character in upland cotton. Annals of Bangladesh Agri, 1 (2): 87-90.

Al-Rawi, K. M., H. M. Al-Bayat, and M. J. Al-Layla. (1986) Heritabilities and path coefficient analysis for some characters in upland cotton. Mesopotamia J. of Agri, 18 (1): 23-39.

Arshad, M., M. Hanif, I. Noor, and S.M. Shah. (1993) Correlation studies on some commercial cotton varieties of *G. hirsutum*. Sarhad. J. of Agri, 9 (1): 9-53.

Aslam Khan, M., A. Sattar Larik and S. Zahoor Ahmad. (2002) Study of gene action for yield and yield components in *G. hirsutum* L. Asian J. of plant Sci. Vol (1). 2: 130-131.

Avnar, C., and J. Shalhevet. 1983. Root effect on cotton growth and yield. Sci. 23: 875-878.

Briggs, K. G., and A. Aytenfis. (1980) Relationships between morphological characters above the flag leaf node and grain yield in spring wheat. Crop. Sci. 20: 350-354.

Carvalho, L.P. DE., C.D. Cruz and C.F. D.E. Moraes. (1994) Genotypic, phenotypic and environmental correlation in cotton. Revista Ceres, 41 (236): 407 - 418.

Donald, J. B., E.B. Moser, and G.A. Breitenbeck. 1994. Boll weight and within plant yield distribution in field grown cotton given different levels of nitrogen. Agron. J. 86: 20-26.

Godoy, A. S. and G. A. Palomo. (1999) Genetic analysis of earliness in upland cotton (*Gossypium hirsutum* L.) II. Yield and lint percentage. Euphytica 105: 161 - 166.

Kohel, R.J. (1974) Influence of certain morphological characters on yield of cotton. Grow. Rev. 51:281-292.

Marsha, A. S., and M. Stewart. (1994) Morphological diversity and relationship in the A-genome cotton, *G. arboreum* and *G. herbaceum*. Crop. Sci. 34: 519-527.

Peng, S., and D.R. Krieg. (1991) Single leaf and canopy photosynthesis response to plant age in cotton. Agron. J. 83: 704-708.

Ray, L.L., and T.R. Richmond. (1966) Morphological measures of earliness of crop maturity in cotton. Crop. Sci. 6: 527-531.

Rolf, F.J. (1987) Numerical taxonomy and multivariate analysis system for the IBM PC micro computer, Ver 1.40 Applied Biostatistics Inc.

موارد مورد اشاره با نتایج این آزمایش همخوانی دارد. در پایان به دو کاربرد مهم این تحقیق به صورت اجمالی اشاره می شود:

۱ - صفت وزن وش در چین اول بیشترین تأثیر را در افزایش عملکرد داشت و انتخاب مستقیم بر مبنای این صفت می تواند مفید واقع شود، پس برای تقویت عملکرد بایستی شرایط رشدی مناسب در اوایل دوره رشد فراهم کرد چون شکل گیری این صفت در این دوره تعیین می گردد. در ضمن باید ارقامی را انتخاب نمود که پوشش فتوسنتزی بالایی داشته باشند.

۲ - برای سرعت بخشیدن به زودرسی بالا بردن عملکرد در چین اول و طبیعتاً کاهش عملکرد در چین دوم مؤثر است. در واقع منظور آن است که اکثر توان گیاه در تولید چین اول بکار برود، که این مورد هم با تقویت شرایط رشدی مناسب در اوایل دوره رشد و نیز انتخاب ارقام با پوشش فتوسنتزی بالا تحقق می یابد. پس ملاحظه می شود که با تقویت این دو شرط گیاه پنبه با عملکرد بالا و زودرس حاصل می گردد.

منابع

- ارزانی، ا. (۱۳۸۰) اصلاح گیاهان زراعی (ترجمه)، چاپ دوم، دانشگاه صنعتی اصفهان. صفحات ۴۶۳-۴۶۱.
- طلعت، ف.م. رضایی مقدم، م.ر. هادی اقدم، ر.و. مهاجرعباسی، ا. (۱۳۸۰) بررسی و مقایسه خصوصیات کمی و کیفی ارقام پنبه وارداتی. چکیده مقالات هفتمین کنگره علوم زراعت و اصلاح نباتات ایران. موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر کرج. صفحه ۲۰۷.
- عالیشاه، ع. (۱۳۷۴) مطالعه مورفولوژیکی و سیتولوژیکی ارقام دیپلوئید پنبه. پایان نامه کارشناسی ارشد، دانشگاه تربیت مدرس. ۱۱۷ صفحه.
- قرنجیکی، ع. و رضایی، ج. (۱۳۸۰) بررسی تأثیر ۳ نوع کود فسفره بر عملکرد و اجزای عملکرد دو رقم پنبه. چکیده مقالات هفتمین کنگره علوم زراعت و اصلاح نباتات ایران. موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر کرج. صفحه ۳۰۶.

- Walton, J. A. (1971)** The use of factor analysis in determining characters for yield selection in wheat. *Euphytica*. 20: 416-421.
- Zhang, B.H., F. Lin, C.B. Yao and K.B. Wang. (2000)** Recent progress in cotton biotechnology and genetic engineering in China. *Current Sci.* Vol. 79, No, 10 July 2000.
- Zhu, Qh. (1994)** Genetic analysis of yield components and fiber quality characters in glandless cotton. *Acta-Agronomica-Sinica*, 20 (4): 621-628.
- Singh, P. 1998.** Cotton Breeding, Kalyani publishes New Delhi. PP: 125-135.
- Songwan, A. S., and J. S. Yadava. (1987)** Association analysis for some economic traits in upland cotton (*G. hirsutum L.*). *Annals of Agri. Rec.*, 8 (1): 156-158.
- Subhan, M., M. Qasim, R. D. Ahmad, and H. Niazi. (2002)** Genetics of yield and its components in upland cotton (*Gossypium hirsutum L.*) *Asian J. of Plant Sci.* 1 (3): 250-253.
- Walton, J. A. (1969)** Inheritance of morphological characters associated with yield of spring wheat. *Can. J. Plant Sci.* 49:587-596.

A study on relationship between morphological and agronomic traits, and seed cotton yield and early-maturity in different cultivars

Dadashi, M.¹, Kazerani, B.²

1. Department of agronomy, Islamic Azad University-Gorgan branch, Gorgan, Iran

2. Department of biology, Islamic Azad University-Gorgan branch, Gorgan, Iran

Abstract

The relationships between the seed cotton yield and early maturity with to traits of 8 cotton cultivars were studied at plant Institute, Gorgan, Iran in 2004. The experimental design was randomized complete block design with four replications. The results of simple analysis Variance showed that; yield, weight of yield in first harvest, height, length of the highest monopodial branch, sympodial branch length had significant differences at minimum probability level (0.05) and traits of weight of yield in second harvest and early-maturity showed significantly difference ($p < 0.01$) within cultivars, but, there were no significant in trait of mean of weight of 20-boll in first harvest, number of boll in plot for first and second harvest, monopodial branch number, sympodial branch number. The means were compared with duncan method showed that cultivars Sub okra, Super okra & H.A.R produced highest yield, and other cultivars in the B group. Cultivars of Sub okra, Bract frygo & Deforme leaf the highest early maturity and cultivars of Sahel, Super okra, okra's red leaf & Smoshaleaf highest late maturity and cultivar of H.A.R in middle maturity. The results of the experiment revealed that improvement in yield were associated with yield in first harvest. Height and sympodial branch length a negative correlation with yield. The correlation shows that height, monopodial branch length, number of simpodial, yield in second harvest and 5 sympodial branch length a negative correlation with early maturity. Traits yield in first harvest was high significantly related to early maturity.

Key words: Cotton, Early maturity, Yield, Yield in harvest

بررسی اثر مقادیر گوناگون نیتрат آمونیوم و نیترات پتاسیم بر تغییرات سلولی - تکوینی ریزغده‌های گیاه سیب‌زمینی (*Solanum tuberosum* L.) رقم آگریا در شرایط درون شیشه‌ای

زهرا زارع^۱، علیرضا ایران‌بخش^۲، مصطفی عبادی^۳

۱. گروه زیست‌شناسی، واحد علوم تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران

۲. گروه زیست‌شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد گرمسار، گرمسار

۳. گروه زیست‌شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد دامغان، دامغان

چکیده

ریزغده‌های سیب‌زمینی حاصل از کشت بافت جایگزین مناسبی برای غده‌های بذری است. هدف از این پژوهش بررسی اثر غلظت‌های مختلف NH_4NO_3 ، KNO_3 در محیط‌های کشت در شیشه بر تغییرات سلولی تکوینی ریزغده‌های حاصل از کشت بافت این گیاه در شرایط مذکور می‌باشد. در این پژوهش از محیط‌های کشت آزمایشگاهی جامدومایع به منظور تهیه گیاهچه استریل و القای ریزغده زایی استفاده شد. در محیط‌های القاء ریزغده‌زایی غلظت‌های یک از ترکیبات NH_4NO_3 ، KNO_3 ، ۰، ۰/۵، ۱، ۱/۵ و ۲ برابر حد تعیین شده در محیط کشت در نظر گرفته شد. ریزغده‌زایی رقم آگریا در تناوب نوری صورت پذیرفت. تاریکی دائمی اثر بازدارنده بر ریزغده‌زایی دارد. به منظور بررسی‌های تکوینی و تشریحی ریزغده‌ها در پایان مدت القاء، ابعاد آنها در محور طولی و عرضی و پس از مقطع‌گیری میکروسکوپی از آنها، تغییرات تعداد سلول‌ها و تغییرات ابعاد سلول‌ها و محتوای نشاسته بر مبنای سلول‌های بافت پارانشیم پوست و مغز سنجیده شد. بر همین مبنای نتایج آماری معنی دار مشخص شد در غلظت‌های مختلف NH_4NO_3 بیشترین تعداد ردیف‌های سلولی متعلق به غلظت نیم تا برابر استاندارد محیط کشت بود. و از نظر تعداد دانه‌های نشاسته غلظت برابر استاندارد تا ۱/۵ برابر آن بیشترین مقدار را نشان دادند. غلظت‌های مختلف این ترکیب بر تغییر ابعاد سلول‌ها اختلافات معنی داری نشان ندادند. در گروه KNO_3 ، با نتایج آماری معنی دار غلظت ۱/۵ برابر استاندارد بیشترین تعداد ردیف‌های سلولی، ابعاد سلول و همچنین بیشترین محتوی نشاسته را نشان دادند.

واژه‌های کلیدی: درون شیشه، ریزغده‌زایی، سیب‌زمینی، کشت بافت، نیترات آمونیوم، نیترات پتاسیم

مقدمه

سیب‌زمینی متداول است، اما تولید تجاری عمدتاً از طریق تکثیررویشی است. روش‌های سنتی در تکثیر این گیاه بسیاری از بیماری‌ها را از نسلی به نسل دیگر انتقال می‌دهد و با افت شدید محصول روبروست و از طرفی انبارداری و نگاهداری غده‌های بذری با هزینه بالا و مشکلاتی مواجه است. از این رو در سراسر دنیا توجه ویژه‌ای به تولید ریزغده‌ها در شیشه متمرکز شده است.

از آن‌جا که گیاه سیب‌زمینی نقش مهمی در تغذیه مردم جهان و سبذغذایی خانواده ایرانی دارد. در این مطالعه مورد توجه قرار گرفته است. این گیاه به دو روش جنسی (تولید بذر حقیقی) و غیرجنسی یا رویشی تکثیر می‌شود. استفاده از روش جنسی و تولید بذر حقیقی اغلب در مطالعات ژنتیکی و برنامه‌های اصلاح نژاد

بافت‌شناسی و سلولی تکوینی ریز غده‌های حاصل از کشت در شیشه‌ای پرداخته شود. تاکنون تحقیقات اندکی در زمینه بافت‌شناختی ریزغده‌ها انجام شده است. Cutter, 1978; Xu, 1998; Liu, 2002 تحقیقاتی در این زمینه انجام داده‌اند.

عبادی (۱۳۸۰)، با طراحی بیوراکتورهای پیوسته و نیمه‌پیوسته به تولید آزمایشگاهی ریز غده‌ها پرداختند. همچنین روند تکوینی و سلولی ریزغده‌ها را از دید میکروسکوپ‌نوری و الکترونی مورد بررسی قرار دادند.

مواد و روش‌ها

این تحقیق در سال ۸۵-۱۳۸۴ در مجتمع آزمایشگاهی دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات انجام شد. رقم مورد بررسی رقم اگریا (*Agria*) بود که از موسسه اصلاح بذر کرج تهیه گردید. این رقم در کشت خاک از ارقام دیررس می‌باشد. مراحل کار در سه مرحله، الف) تهیه گیاهچه استریل، ب) شاخه زایی و ج) القای ریزغده در شیشه انجام شد. نمونه گیاهی مورد استفاده در کشت بافت، جوانه‌های چشم‌های غده‌های سیب‌زمینی بذری تهیه شده و همچنین تک‌گره‌های ساقه‌های گیاه سیب‌زمینی که از کاشت غده‌های سیب‌زمینی بذری در گلدان پس از یک ماه بدست آمده بودند. این نمونه‌های گیاهی پس از استریل شدن با هیپوکلریت سدیم ۲٪ و الکل ۷۰٪ در محیط کشت جامد MS، به اضافه ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر NAA، ۰/۵ میلی‌گرم GA3 و مقدار ۳۰ گرم بر لیتر ساکاروز در شرایط ۱۶ ساعت تاریکی و ۸ ساعت روشنایی استریل کشت داده شدند. پس از ۶ هفته گیاهچه‌های استریل قابل استفاده برای مراحل بعدی بدست آمدند. در مرحله بعدی شاخه‌های این گیاهچه‌های استریل در محیط کشت مایع MS حاوی ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر BAP، ۰/۴ میلی‌گرم بر لیتر GA3 و ۳۰ گرم در لیتر ساکاروز، به منظور شاخه‌زایی واکشت شدند، به طوری که هر قسمت ساقه برای واکشت شامل ۲-۳ گره در ارلن‌های محتوی کشت مایع و بر روی شیکر (GFL) با تعداد ۱۰۰ دور در دقیقه در شرایط ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی قرار داده شدند. پس از چهار هفته گیاهچه‌هایی با شاخه‌های فراوان ایجاد شد که این شاخه‌ها نمونه‌های کشت بافتی مورد نیاز برای القای ریزغده بودند.

ریزغده‌ها، غده‌های بسیار کوچک هستند که در شرایط القای غده‌دهی در شیشه از گیاهچه‌های عاری از ویروس تولید می‌شوند. ریزغده‌های تولید شده قابل کشت در گلدان و نهایتاً در مزرعه هستند و از این طریق می‌توان به گیاه‌هانی با غده مطلوب دست یافت. ریزغده‌های تولید شده ابتدا در حالت خواب هستند و از این رو قبل از کاشت در مزرعه و یا گلخانه باید آنها را به مدت ۳ تا ۴ ماه در دمای ۶-۵ درجه نگهداری نمود.

امروزه این محصول در جهان از نظر اهمیت غذایی مقام چهارم را بعد از گندم، برنج و ذرت دارد. از نظر محتوی مواد، شامل ماکرومولکول‌های اصلی چون پروتئین، چربی و کربوهیدرات است و علاوه بر آن دارای موادی مثل آب، فیبر، عناصر معدنی مثل کلسیم، فسفر، آهن، سدیم، پتاسیم و گروهی از ویتامین‌ها مثل بتاکاروتن، تیامین، ریوفلاوین، نیاسین و اسید آسکوربیک است.

سیب‌زمینی تقریباً در تمام استان‌های ایران از مناطق بیابانی تا مناطق مرطوب کرانه دریای خزر کشت می‌شود. گیاه سیب‌زمینی دارای ارقام زراعی زیادی است.

رقم اگریا رقمی متوسط تا دیررس و از تلاقی بین ارقام کوآرتا و سملو در سال ۱۹۸۵ در کشور آلمان به بوجود آمده است و رشد ساقه‌ها بصورت ایستا می‌باشد. رنگ گل آن سفید، میوه حاصل از آن بدون دانه است و عملکرد آن بسته به شرایط محیطی بسیار متغیر است. اندازه غده‌ها متغیر است غده‌های آن تخم‌مرغی شکل، رنگ پوست زرد و بخش گوشتی زرد تیره است. عمق چشم‌های غده‌ها نیز کم دارای دوره خواب بلند تا بسیار بلند هستند. وزن خشک غده‌های آن بسته به شرایط محیطی رشد، متغیر است. میزان نشاسته و قندهای احیایی در آن پایین است و از این رو در صنایع تبدیلی بسیار مناسب است.

امروزه در دنیا البته و در ایران تحقیقات زیادی بر روند ریزغده‌زایی و بهبود کیفیت آن صورت گرفته است (Kawakami, 2004; Seabrook et al. 2004; Gopal, 1997; Wang, 1982؛ عبادی و همکاران، ۱۳۸۰، احمدیان و همکاران، ۱۳۷۴ و ارجمندی، ۱۳۷۶) از جمله محققینی هستند که بر روند ریزغده‌زایی سیب‌زمینی تحقیقات موثری انجام داده‌اند. در این تحقیق سعی بر این است که به بررسی

در آغاز از غده‌های بذری سالم (عاری از ویروس) سببزمینی تهیه شده، جوانه‌های چشم‌ها، جدا شدند و به منظور تهیه گیاهچه‌های استریل، به محیط‌های کشت MS جامد حاوی $0.1 \text{ mg l}^{-1} \text{ NNA} + 0.5 \text{ mg l}^{-1} \text{ GA}_3$ + ساکارز 1 g l^{-1} + 30 g l^{-1} + آگار ۸٪ انتقال داده شد. بعد از گذشت حدود ۸-۶ هفته از رشد جوانه‌های جدا کشت، شاخه‌های باریک با چندین گره بوجود آمد (شکل ۱).

روش دیگر تهیه گیاهچه‌های استریل که در این تجربه نیز مورد استفاده قرار گرفت، کاشت غده‌های بذری سببزمینی در گلدان‌هایی که خاک آن‌ها استریل شده بود و نهایتاً از گیاه سببزمینی حاصل در این گلدان، تک‌گره‌هایی از قسمت‌های ساقه‌های هوایی به صورت جدا کشت در محیط‌های جامد MS حاوی $0.1 \text{ mg l}^{-1} \text{ NNA} + 0.5 \text{ mg l}^{-1} \text{ GA}_3$ + ساکارز 1 g l^{-1} + آگار ۸٪، انتقال داده شدند، پس از حدود ۶-۴ هفته از رشد جدا کشت‌های تک‌گره‌ای، گیاهچه‌های استریل شامل شاخه‌هایی با چندین گره بوجود آمد (شکل ۲).

این گیاهچه‌های پایه، جهت تکثیر و بررسی مراحل بعدی استفاده شد. به منظور تکثیر شاخه‌های گیاه، شاخه‌های چند گره‌ای گیاهچه‌ها به قطعات ۳-۲ گره‌ای، تقسیم و در محیط‌های مایع MS حاوی $0.5 \text{ mg l}^{-1} \text{ BAP} + 0.4 \text{ mg l}^{-1} \text{ GA}_3$ + ساکارز 1 g l^{-1} + 30 g l^{-1} بر روی شیکر با تعداد ۹۰ الی ۱۰۰ دور در دقیقه به مدت یک ماه قرار داده شد (شکل ۳).

در مرحله بعد شاخه‌های تکثیر یافته برای القای ریز غده زایی در محیط مایع MS حاوی $2 \text{ mg l}^{-1} \text{ BAP}$ ، ساکارز 1 g l^{-1} + 60 g l^{-1} ، به عنوان محیط‌های القایی بر روی شیکر با تعداد ۹۰ الی ۱۰۰ دور در دقیقه به مدت دو ماه انتقال داده شد.

بر همین مبنا اثرات نور و تاریکی بر این روند بررسی و با توجه به نتایج بهتر اثرات تناوب نور و تاریکی (۸ ساعت نور ۱۶ ساعت تاریکی)، این عامل نوری به عنوان شرایط نوری مناسب برای القای ریزغده‌زایی انتخاب شد. با برقراری تمامی شرایط فوق، محیط‌های القایی ریزغده‌زایی با غلظت‌های ۰، ۰/۵، ۱، ۱/۵ و ۲ برابر هر یک از ترکیبات NH_4NO_3 ، KNO_3 ساخته و اثرات هر یک از آن‌ها به طور جداگانه بررسی شد (شکل ۴ و ۵).

در ادامه، محیط‌های کشت MS حاوی ۲ میلی‌گرم در لیتر BAP و ۶۰ گرم در لیتر ساکاروز به منظور شرایط بهینه ریز غده‌زایی ساخته شد. سپس در شرایط استریل و استفاده از دستگاه لامینار ایرفلو گیاهچه‌های پر شاخه مرحله قبلی را از محیط مایع MS خارج و محیط‌های MS مایع فوق را به عنوان گروه شاهد به آنها افزودیم و در شرایط فتوپریود ۸ ساعت نور ۱۶ ساعت تاریکی و دمای ۲۲-۲۰ درجه سانتیگراد بر روی شیکر به مدت ۲ ماه و تعداد ۱۰۰ دور دقیقه قرار داده، زمان و کیفیت ریزغده‌دهی آنها را سنجیدیم. سپس تیمارهای مختلف شیمیایی را بنابر غلظت‌های مختلف هر یک از ترکیبات KNO_3 ، NH_4NO_3 محیط MS به صورت (۲MS، ۳/۲MS، ۱MS، ۲MS و ۰) ساخته و بر ارلن‌های محتوی شاخه‌های تکثیر شده اثر دادیم و نتایج مختلف متفاوتی را بدست آوریم

در ادامه به منظور بررسی تغییرات تکوینی و تشریحی ریزغده‌ها در پایان مدت القا، ابعاد ریز غده‌ها در محور طولی و محور عرضی تغییرات تعداد سلول‌ها و تغییرات ابعاد سلول‌های سنجیده شد.

برای این منظور ابعاد ریزغده‌ها با خط‌کش و ابعاد سلول‌های آنها با گراتیکول و میکروسکوپ نوری (NIKON) مدل فوتو آلفا بر روی مقاطع تهیه شده با میکروتوم (Laica) و برش‌های دستی بر روی هر تیمار مورد مطالعه قرار گرفت.

به منظور بررسی‌های آماری از طرح کاملاً تصادفی (CRD) (Complete Randomized Design) که مخصوص طرح‌های آزمایشگاهی و گلخانه‌ای است، استفاده گردید. محاسبات آماری با استفاده از نرم افزار SPSS و MSTATC صورت پذیرفت.

نتایج

نتایج بررسی‌های کشت بافت و مطالعات

ماکروسکوپی و میکروسکوپی

هدف از این تحقیق بررسی روند ریزغده زایی گیاه سبب زمینی رقم آگریا (*Solanum tuberosum* L. var. agria) در محیط‌های کشت در شیشه در غلظت‌های مختلف KNO_3 ، NH_4NO_3 از عناصر پر مصرف محیط MS از دیدگاه سلولی تکوینی می‌باشد.

(شکل ۸). همچنین نتایج آماری نشان داد که غلظت‌های مختلف NH_4NO_3 طول و عرض سلول‌های پارانیشیم پوست و مغز اثر معنی‌داری به جای نگذاشته است. شکل ظاهری ریزغده‌ها در این گروه‌ها از گرد تا تخم‌مرغی و رنگهای مایل به تیره دیده شد میانگین ابعاد غده‌ها در تیمارها به ترتیب ۰، $\frac{1}{2}$ ، ۱، $\frac{3}{4}$ و ۲ بر حسب میلی‌متر ($5/2$ و $5/8$)، ($6/1$ و 7)، (6 و $7/5$)، ($4/5$ و $5/2$) و ($5/9$ و $5/5$) بودند نتایج حاصل از شمارش دانه‌های نشاسته نشان داد که در غلظت‌های $1/5$ و 1 برابر مقدار استاندارد بیشترین مقدار نشاسته وجود دارد و در غلظت‌های کمتر و بیشتر از این حد اثر کاهشی بر تعداد دانه‌های نشاسته دیده می‌شود (شکل ۶، ۷ و ۹).

نتایج اثر غلظت‌های مختلف KNO_3 بر تکوین ریزغده‌ها

ریزغده‌هایی که در مرحله قبل از محیط‌های القایی ریزغده در غلظت‌های مختلف KNO_3 به دست آمدند. برای بررسی‌های میکروسکوپی، آماده و برش‌گیری شدند، در برش‌های میکروسکوپی، پارانیشیم‌های مغزی و پوست از نظر تعداد ردیف‌های سلولی، ابعاد سلول‌ها و محتوای دانه‌های نشاسته، آنالیز شدند و نتایج آنالیزها در شکل‌های ۱۱ و ۱۲ و ۱۳ و ۱۴ آمده است. بررسی آماری نتایج نشان داد که غلظت‌های مختلف KNO_3 بر تعداد ردیف‌های سلولی پارانیشیم‌های مغزی و پوست اثرات معنی‌داری دارد و در غلظت $1/5$ برابر غلظت KNO_3 از مقدار استاندارد بیشترین تعداد لایه‌های سلولی مشهود است (شکل ۵) و در غلظت‌های کمتر از آن شبیه ردیف‌های سلولی شاهد است. در بررسی اثر غلظت‌های مختلف KNO_3 بر ابعاد سلول‌های پارانیشیم مغزی و پوست شاهد تأثیر معنی‌دار غلظت‌ها بر اندازه‌ی سلول‌ها بودیم، به طوری که در غلظت KNO_3 ، در حد ۲ برابر مقدار استاندارد، کاهش ابعاد سلولی را در هر دو مورد پارانیشیم پوست و مغز شاهد بودیم. در بررسی محتوای نشاسته برش‌های میکروسکوپی هر غلظت شاهد افزایش تعداد دانه‌های نشاسته در غلظت $1/5$ برابر مقدار KNO_3 از حد استاندارد بودیم. ویژگی‌های ظاهری ریزغده‌ها در این گروه تیماری نیز از گرد تا کمی کشیده و تخم‌مرغی با رنگ‌های زرد تا تیره بودند که بیشتر به نوع رقم آن‌ها

تغییرات تکوینی ریزغده‌ها تحت تأثیر غلظت‌های مختلف برخی عناصر پرمصرف

در این قسمت به ارائه نتایج حاصل از اثر غلظت‌های مختلف عناصر پرمصرف بر روند ریزغده‌زایی و ریزغده‌های تشکیل یافته می‌پردازیم. هدف از انجام این بخش از پژوهش بررسی‌های سلولی-تکوینی ریزغده‌های حاصل از هر تیمار است و اینکه آیا عناصر پرمصرف می‌توانند بر تغییر برخی ساختار بافت‌ها، اثری داشته باشند یا خیر؟ و در صورت ایجاد تغییر، این تمایز چگونه است؟ از آنجا که عمده بافت غده سیب‌زمینی متشکل از بافت پارانیشیم‌های پوست و مغز است، بنابراین سلول‌های این دو بافت از نظر تغییرات تکوینی مورد پژوهش قرار گرفتند. ویژگی‌هایی از سلول‌ها که برای این‌گونه بررسی‌های تمایزی انتخاب شدند عبارت بودند از: اندازه ابعاد سلول‌های پارانیشیم پوست و مغز، تعداد ردیف‌های سلولی بافت پارانیشیم پوست و مغز و تعداد دانه‌های نشاسته در سلول‌های پارانیشیم پوست و مغز.

پس از انجام ریزغده‌زایی از هر تیمار غده‌ها جدا شدند ابعاد آنها اندازه‌گیری شد و از هر تیمار بزرگترین غده‌ها که نشان‌دهنده‌ی پایان تمایزات هریک بود، برای انجام بررسی‌های تکوینی انتخاب شد، نتایج هریک از گروه‌های تیماری در ادامه آمده است.

نتایج اثر غلظت‌های مختلف NH_4NO_3 بر تکوین ریزغده‌ها

پس از برش‌گیری از ریزغده‌های تشکیل شده در غلظت‌های مختلف ۰، $\frac{1}{2}$ ، ۱، $\frac{3}{4}$ و ۲ برابر غلظت استاندارد NH_4NO_3 هر یک از نظر ابعاد سلول‌های پارانیشیم پوست و مغز و تعداد در ردیف‌های سلولی هریک آنالیز شدند و تعداد دانه‌های نشاسته هریک شمارش شدند. نتایج آماری حاصل نشان داد که غلظت‌های مختلف NH_4NO_3 بر تعداد ردیف‌های سلولی پارانیشیم پوست و مغز اثر معنی‌داری داشته است، بطوریکه در غلظت‌های برابر استاندارد از NH_4NO_3 (IMS) و $\frac{1}{2}$ آن بیشترین تعداد ردیف‌های سلولی را داشته‌ایم و در غلظت‌های کمتر و بیشتر از آن بر تعداد ردیف‌های سلولی کاهش خواهیم داشت

می‌شود. تغییرات بیوشیمیایی طی سال‌های گذشته مورد مطالعه زیادی قرار گرفته است، اما تغییرات ریخت شناسی تاکنون کمتر مورد مطالعه بوده است. تکوین و ساختار غده سیب زمینی توسط پژوهشگران مختلف از جمله Cutter, 1978; Xu, 1998 مورد بررسی قرار گرفته است.

یافته‌های بیوشیمیایی طی فرایند غده زایی نشان داده است که ساخت نشاسته قبل از حجیم شدن ریزغده‌ها آغاز می‌گردد. مطالعه حجیم شدن سلول‌ها و تقسیمات میتوزی سلول‌ها، کلیدی برای روشن شدن چگونگی تبدیل رشد طولی استولون به رشد شعاعی است. اولین علائم ریزغده‌زایی که تا حد زیادی هم زمان در مریستم‌های القاء شده دیده می‌شود، حجیم شدن سلول‌های پارانشیم پوستی در اثر توسعه واکوئل‌های آنها می‌باشد.

تقسیم سلولی و حجیم شدن سلول‌ها، هر دو در نمو غده‌ها دخالت دارند (شکل ۱۵). روشن نیست که آیا توسعه اولیه استولون نتیجه تقسیم سلولی است یا حجیم شدن سلول‌ها. شماری از پژوهشگران، گزارش کرده‌اند که قبل از افزایش ابعاد سلول‌ها، فعالیت میتوزی رخ می‌دهد. سایر مشاهدات نشانگر آن است که توسعه شعاعی اولیه ناشی از افزایش قطر سلول‌ها است.

عبادی (۱۳۸۰) طی مطالعه سلول‌های اپیدرمی در برش‌های طولی نشان دادند که درفاصله میانگره‌های در حال حجیم شدن در ردیف سلول‌های اپیدرمی بافت پریدرمی به سرعت تمایز می‌یابد. فلورژن با منشأ اپیدرمی فعالیت خود را به صورت تقسیمات پری کلینال نامتقارن آغاز می‌کند که منجر به تشکیل دو ردیف سلولی می‌گردد. لایه خارجی از سلول‌های کوچک و لایه داخلی از سلول‌های بزرگتر تشکیل شده‌اند. سلول‌های لایه خارجی ضمن حجیم شدن به فعالیت تکثیر خود ادامه می‌دهد و سلول‌های ردیف خارجی تر را می‌سازد. دیواره‌های سلولی در این بافت به سرعت به چوب پنبه آغشته می‌شوند و می‌میرند. پارانشیم پسین بسیار محدودی از فعالیت فلورژن شکل می‌گیرد. مجموعه فلم، فلورژن و فلودرم آرایش منظم، ردیفی و شعاعی دارند. پریدرم به صورت پوششی محافظ از تبخیر آب بافت‌های

بستگی داشت میانگین ابعاد ریزغده‌ها در این تیمارها به ترتیب مقدار غلظت ۰، $\frac{1}{2}$ ، ۱، $\frac{3}{2}$ و ۲ به ترتیب برحسب میلی‌متر (۸ / ۵، ۷/۳، ۶، ۹، ۷)، (۶/۵ و ۷/۵)، (۶/۵ و ۸/۵) و (۶ و ۶/۵) موجود بودند. نتیجه این که در این گروه در غلظت ۱/۵ برابر استاندارد از KNO_3 بهترین غلظت از نظر ویژگی‌های تکوینی ریزغده‌هاست، چرا که بزرگترین و پرمحتواترین ریزغده را از نظر دانه‌های نشاسته خواهیم داشت که این مسأله با میانگین ابعاد ریزغده‌ها مطابقت دارد (شکل ۱۰).

نتایج کلی مطالعات بافت‌شناسی

۱ - در مطالعات بافت شناختی - تکوینی ریزغده‌ها، تغییرات غلظت‌های مختلف KNO_3 ، NH_4NO_3 بر ویژگی‌های سلولی - بافتی ریزغده‌ها تأثیرات معنی‌داری می‌گذارد.

۲- در غلظت‌های مختلف عناصر پر مصرف مقدار KNO_3 برابر ۱/۵ بیشترین تعداد ردیف‌های سلولی و همچنین بیشترین مقدار محتوای نشاسته را دارد.

۳- KNO_3 ، NH_4NO_3 در غلظت‌های شاهد (۱ MS) و تا نصف مقدار آن نتایج، بهینه در مقایسه با دیگر غلظت‌ها، از نظر ردیف‌های سلولی، ابعاد سلولی و محتوای نشاسته‌ای نشان دادند.

۴ - تغییرات غلظت‌های مختلف عناصر بر شکل ظاهری ریزغده‌ها تأثیر ویژه ای ندارد و شکل ریزغده‌ها بیشتر تابع رقم انتخابی آنهاست.

بحث

در این تحقیق گیاه سیب‌زمینی رقم اگریا از دیدگاه بررسی مقاطع میکروسکوپی نوری از ریز غده‌های بدست آمده از تیمارهای غلظت‌های مختلف KNO_3 ، NH_4NO_3 به منظور بررسی روند سلولی تکوینی غده‌های هر تیمار مورد بررسی قرار گرفت.

دیدگاه‌های کلی در تکوین ریزغده‌ها

تشکیل غده‌های سیب‌زمینی از دو نظر مورد توجه است: یکی نمو ریخت شناختی غده‌ها و دیگری تغییرات بیوشیمیایی که منجر به تشکیل و ذخیره نشاسته

ردیف‌های سلولی و ابعاد و محتوای نشاسته‌ای آن‌ها دارد که با ابعاد ریزغده‌ها مطابقت دارد. از آنجا که نقش ازت در بافت‌ها بستگی زیادی با فعالیت فتوسنتزی گیاه دارد، تغذیه ازتی را به شرایطی وابسته می‌کند، زیرا از طریق گلوئیدهای محلول حاصل از فتوسنتز، اسیدهای ستونی ساخته می‌شوند که داخل شدن ازت در اسیدهای آمینه را ممکن می‌سازد واز سمیت آن می‌کاهد. با این حال، کافی نبودن قندها در تغذیه آمونیاکی نسبت به نیتریک نتایج بسیار نامطلوبی به بار می‌آورد در نتیجه زیادی یون‌های NH_4^+ دریاخته‌ها نسبت به یون‌های NO_3^- سمیت خیلی بیشتری تولید می‌کند و موجب ایجاد اختلالاتی در تراوایی آن‌ها می‌شود که هنوز به خوبی مشخص نشده‌اند. بدین سان مشاهدات کشاورزی در مورد رابطه بین فتوسنتز و تغذیه آمونیاکی چنین بیان می‌شود: وقتی فتوسنتز ضعیف است، سمیت یون‌های NH_4^+ به مراتب مشخص است.

شاید بتوان از این مسئله در مورد ریزغده‌زایی در شیشه الهام گرفت، از آنجا که بافت ریزغده یک بافت مصرفی و غیرفتوسنتزی است. به علت کمبود اسیدهای ستونی در نتیجه تجمع ازت، اثرهای سمیت و کاهش رشد تقسیمات سلولی و ابعاد سلول‌ها را به دنبال داشته باشد. چرا که در غلظت برابر استاندارد (MS) (۱MS) و حتی کمتر از آن، رشد بهبود می‌یابد.

نقش پتاسیم

در بررسی‌های بافت شناختی ریزغده‌ها به این نتیجه رسیدیم که پتاسیم در غلظت ۱/۵ برابر حالت استاندارد اثر مطلوبی بر رشد سلول‌ها و تقسیمات آن و تجمع دانه‌های نشاسته می‌گذارد. در بررسی این نتایج بهتر است به نقش پتاسیم در سلول‌ها بپردازیم. مطالعات مختلف پژوهشگران نشان می‌دهد که پتاسیم به صورت یون k^+ باقی می‌ماند و تحرک بسیار بالایی دارد (Westermann, 2005). این عنصر به مقدار بالا در گیاه سیب زمینی (in vivo) یافت می‌شود به طوری که مقدار آن نسبت به سایر یون‌ها خصوصاً Ca خیلی بیشتر است. بیشتر مواد معدنی که در فلئوم در حال حرکت هستند سرانجام در غده‌ها ذخیره خواهند شد و همچنین بیان دارد محدوده ی کافی از عناصر معدنی

درونی جلوگیری می‌کند. در بخش‌های مسن بافت‌های پریدرمی عدسک‌ها شکل می‌گیرد.

میزان فعالیت فلورژن، تعیین کننده ضخامت فلم است و بستگی به رقم سیب زمینی و شرایط محیطی دارد ظاهراً بافت فلودرمی (پوست پسین) از فلورژن نمو می‌یابد (Lyshede, 1977). این دیدگاه در تضاد با نتایج پژوهش عبادی (۱۳۸۰) است که می‌تواند خود نتیجه تفاوت‌های ژنوتیپی رقم‌ها یا تفاوت در شرایط کشت در شیشه و موجود زنده باشد.

روند افزایش تعداد سلول‌ها در محور طولی و عرضی ریزغده‌ها مشابه با تغییرات ابعاد ریزغده‌هاست. نتایج بدست آمده در این پژوهش نیز از نظر هم راستا بودن ابعاد ریزغده‌ها با افزایش تعداد ردیف‌های سلولی پارانشیم‌های پوست و مغز و همچنین با ابعاد سلول‌ها، با مطالعات عبادی (۱۳۸۰) همخوانی دارد.

پژوهش‌ها در این زمینه که افزایش اندازه سلول‌ها همگام با افزایش اندازه غده‌ها می‌باشد، از سوی Reeve et al. (1973) نیز مورد تأیید قرار گرفته و نشانگر اهمیت زیاد حجیم شدن سلول‌ها در رشد غده‌ها می‌باشد.

نقش عناصر پرمصرف در تکوین و تغییرات

ریزغده‌ها

هرچند تاکنون به مسأله نقش عناصر پرمصرف در ریزغده‌زایی گیاه سیب‌زمینی در شیشه پرداخته نشده است و نتایج و بررسی پژوهشگران در این زمینه در دسترس نیست، شاید با دلایل مشابه و نقش عناصر در روند تقسیمات سلولی و رشد بتوان به بحث و بررسی این نتایج دست یافت.

نقش ازت

در مورد نتایج نقش ازت در مطالعات بافت‌شناختی ریزغده‌ها به این نتیجه رسیدیم که با وجود اینکه ازت در غلظت‌های بالای استاندارد (۱/۵ برابر) در تعداد ریزغده‌ها افزایش معنی داری می‌گذارد یعنی به عبارتی ریزغده‌زایی را تحریک می‌کند، اما غلظت مقدار ازت در مقادیر بیشتر از حد استاندارد آن از نظر ویژگی‌های بافت شناختی ریزغده‌های حاصل سبب کاهش در تعداد

کنترل شده آزمایشگاهی. دانشگاه ابوعلی سینای همدان.

ضرغامی، ر. بلندی، ا. (۱۳۸۳) تکثیر گیاهچه‌های سالم از طریق کشت بافت در سیب‌زمینی. سازمان تحقیقات و آموزش کشاورزی. گزارش نهایی طرح تحقیقاتی. موسسه تحقیقات و آموزش کشاورزی. صفحه ۱۵ تا ۳۰.

عبادی، م. (۱۳۸۰) بررسی روند تکوینی - سلولی گیاه سیب‌زمینی *Solanum tuberosum* در کشت بافت، سلول و بیوراکتورهای نیمه پیوسته و پیوسته. رساله دکتری. دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات.

Cutter, E. G (1978) Structure and development of the potato plant. 70 – 152. Chapman & Hall

Dobranszki, J. Iabori, KM. Ferenczy, A. (1999) Light and genotype effects on invitro tuberization of potato plantlets. *Potato Research*. 42: 3- 4, 483-488.

Gopal, J. Minocha, J.L., (1997) Effectiveness of Selection at Microtuber crop level in Potato. plant breeding. 115: 293 - 295.

IslamKawakami, J. Hasegawa, T. Jituyama, Y. (2004) Growth and yield of Potato Plants grown from microtubers in fields. *American Journal of Potato Research*. 80: 6, 371-378.

Liu, Jun. Song, Botato. Et al. (2002) Total RNA variation during microtuber induction of potato (*Solanum tuberosum*. L).

Lyshede O. B. (1977) Studies on the periderm and epidermis of the potato tuber *solanum tuberosum* L.cv. <binjt>, PP68-74 "yearbook of the royal veterinary and Agricultural University, Copenhagen, Denmark.

Reeve, R.M, et al. (1973) parenchyma cell growth in Potato tubers. I. Different tuber regions. *American potato Journal*. 50, 49-57.

Seabrook, J.E.A. Douglass, L.K. Arnold, DA. (2004) Effect of leaves on microtubers produced from potato single-node cuttings invitro. *American Journal of Potato Research*. 81: 1, 1-5.

Wang, P.J, C.Y. Hu. (1982) In vitro mass tuberization and virus-free seed-potato production in Taiwan. *Am. Potato J.* 59: 33-37.

Westermann, DT. (2005) Nutritional Requirements of potato. *American Journal Potato Research*. Online.

Xu, X., et al. (1998) Cell division and cell enlargement during poyato tuber formation. *Journal of Experimental botany*. 573-582; 24.

تا حد تشکیل و رشد غده‌ها نیاز است و مقادیر بیشتر از آن در طی بلوغ غده‌ها مؤثر است (Westermann, 2005).

پتاسیم در مایعات درون یاخته‌ای، بخصوص در واکوئل، محلول است و در آنجا غالباً باغلظتی ده‌ها برابر غلظت محیط جمع می‌شود. فراوانی و تحرک آن را به صورت مهمترین کاتیونی در می‌آورد که باعث ایجاد فشار اسمزی و در نتیجه واکوئلی است.

در پژوهش انجام شده با رشد پارانیشیم مغزی از نظر ابعاد، در غلظت بالای پتاسیم مواجه بودیم که با توسعه واکوئلی در سلول‌های پارانیشیم مغز که همسو با بالاترین ابعاد سلول‌ها در قیاس با سلول‌های پارانیشیم پوست است، قابل توجیه است.

پتاسیم در سنتز پروتئین‌ها از اسیدهای آمینه دخالت می‌کند چنانکه هنگام کمبود پتاسیم، تجمع اسیدهای آمینه مشاهده می‌شود (آنزیمی که آمینو اسیدها را بر روی tRNA منتقل می‌کند به پتاسیم نیاز دارد) و در نتیجه پروتئین‌ها در رشد و افزایش حجم سلول و همچنین تقسیم آن دخالت دارند. نقش دیگر پتاسیم در سلول‌ها، دخالت در سنتز پلی‌اوزیدها، از اوزها است، چنانکه در کمبود پتاسیم تجمع اوزها مشاهده می‌شود. این مسئله نیز در این تحقیق با تجمع دانه‌های نشاسته که مربوط به ساخته شدن نشاسته است، با افزایش میزان پتاسیم مطابقت دارد و بالاخره پتاسیم در فعال کردن بعضی کینازها و در نتیجه در مصرف فسفات‌ها و انتقال انرژی دخالت می‌کند.

منابع

احمدیان، ش. عبدمیثانی، س. زرغامی، ر. (۱۳۷۴)

تولید ریزغده‌های عاری از ویروس سیب‌زمینی از طریق کشت بافت. پایان‌نامه کارشناسی ارشد. دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج.

ارجمندی قهستانی، ا. زرغامی، ا. (۱۳۷۶) بررسی امکان غده‌زایی در دو رقم دراگا و اگریای سیب‌زمینی با استفاده از روش کشت مریستم انتهایی در شرایط



شکل ۱. کشت جوانه‌های غده بذری شش هفته پس از کشت



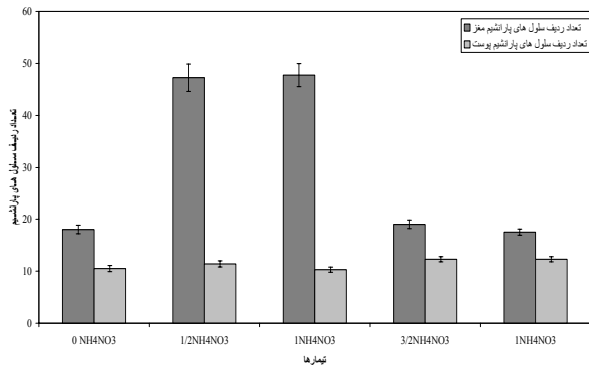
شکل ۴. ریز غده‌زایی در تیمار NH_4NO_3



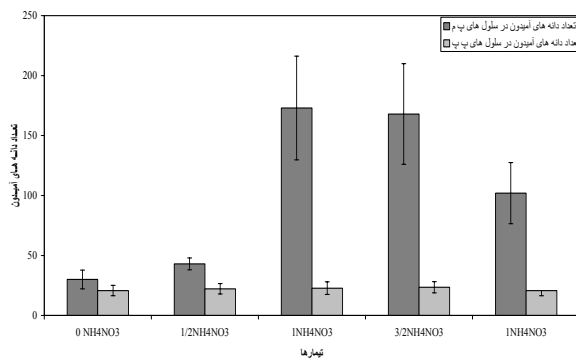
شکل ۲. کشت تک گره‌های ساقه‌های هوایی دو هفته پس از کشت



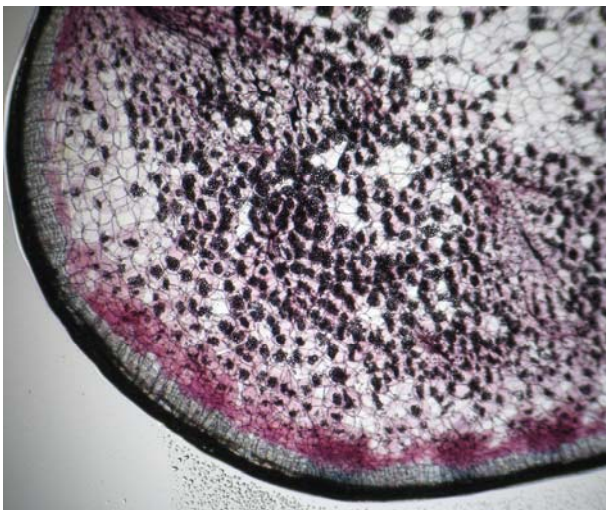
شکل ۳. شاخه‌زایی از قطعات ساقه‌ای ۲-۳ گره‌ای از گیاهچه‌های استریل



شکل ۸. اثرات غلظت‌های مختلف NH_4NO_3 بر تعداد ردیف‌های سلول‌های پارانشیم پوست و مغز



شکل ۹. اثرات غلظت‌های مختلف NH_4NO_3 بر تعداد دانه‌های نشاسته در پارانشیم مغز



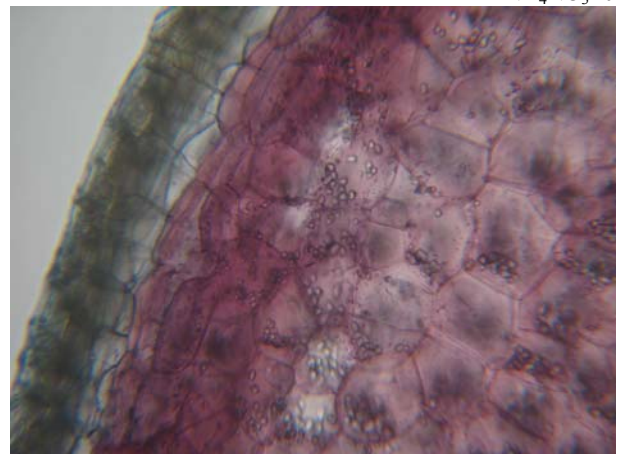
شکل ۱۰. افزایش ردیف‌های سلولی و میزان دانه‌های نشاسته در تیمار $\text{KNO}_3=3/2$



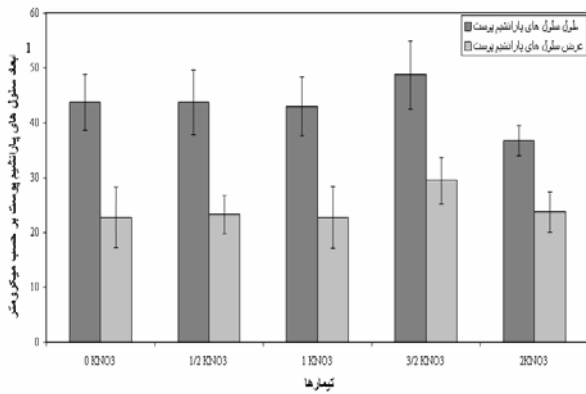
شکل ۵. ریز غده‌زایی در تیمار $\text{KN0}_3=3/2$



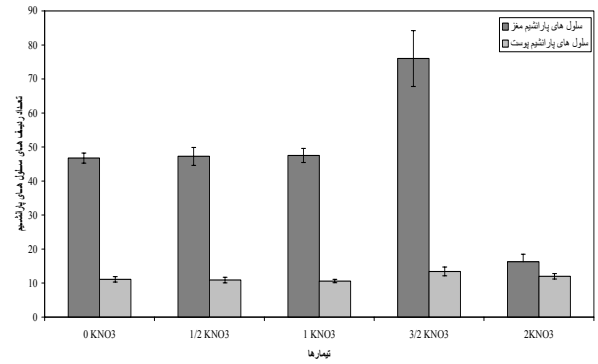
شکل ۶. کاهش تعداد دانه‌های نشاسته در تیماری با غلظت $\text{NH}_4\text{NO}_3=0$



شکل ۷. کاهش در ردیف‌های سلولی در تیماری با غلظت $\text{NH}_4\text{NO}_3=2$



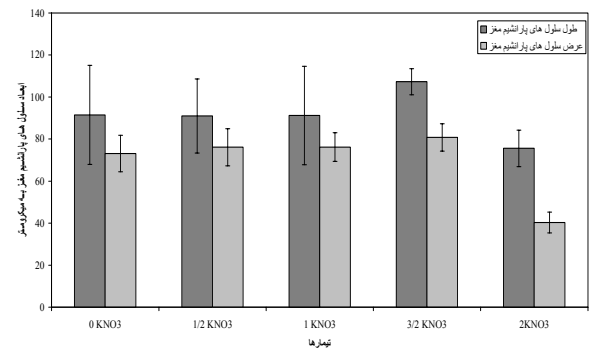
شکل ۱۴. اثرات غلظت‌های مختلف KNO₃ بر تعداد دانه‌های نشاسته در پاراننشیم مغز و پوست



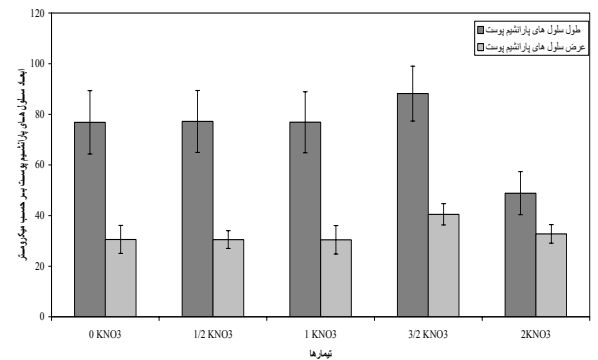
شکل ۱۱. اثرات غلظت‌های مختلف KNO₃ بر تعداد ردیف‌های سلول‌های پاراننشیم پوست و مغز



شکل ۱۵. در برش عرضی ریز غده‌ها بخش‌های عمده پاراننشیم مغز و پوست هستند.



شکل ۱۲. اثرات غلظت‌های مختلف KNO₃ بر ابعاد سلول‌های پاراننشیم مغز



شکل ۱۳. اثرات غلظت‌های مختلف KNO₃ بر ابعاد سلول‌های پاراننشیم پوست

The effects of different concentrations of NH_4NO_3 and KNO_3 on developmental-cellular variation of microtubers in *Solanum tuberosum* L. var *agria* *In vitro* conditions.

Zare, Z.¹, Iranbakhsh, A.², Ebadi, M.³

1. Department of biology Islamic Azad University, Science and research Branch, Iran

2. Department of biology Islamic Azad University-Garmsar branch, Garmsar, Iran

3. Department of biology Islamic Azad University-Damghan branch, Damghan, Iran

Abstract:

The potato (*Solanum tuberosum* L.) is one of the most important agricultural plants in the world. Today, potato is the fourth most important food crop in the world after wheat, rice and corn. It is propagated predominantly by asexual method (tubers and microtubers). However, propagation by true seed is primarily used for breeding purposes (enhancement of breeding populations) and genetic studies. The traditional methods for asexual propagation of the plant face important problems including contamination of tubers and plants and decreased crops. Therefore, the seed tubers can be replaced by microtubers produced by tissue culture. In this study solid and culture media used for produce of sterile plantlets and microtuberization. The aim of this study is search about effect of different concentrations of NH_4NO_3 and KNO_3 in media culture *In vitro* in histological/cellular variations of the microtubers. The concentrations of 0, 1/2, 1, 3/2 and 2 times more than standard concentrations of the above mentioned compounds in MS medium were used in separate induction media. The results showed that the alternating light and darkness is more suitable for the variety *Agria* and the samples kept in absolute darkness demonstrated no microtuberization in this study. Sections for light microscopy were prepared from microtubers in each sample after their dimensions were measured and morphological studies carried out. The aim was to study the histological aspects of samples. The number of cell rows, the dimensions of the cells and the starch content of the parenchymal tissues of microtuber's pulp and the cortex were analyzed. The results again showed significant variations in histological features of the microtubers developed in media containing different concentrations of macronutrients. In this study, KNO_3 with concentrations of 1.5 times more than standard concentration in MS medium yielded maximum number of cell rows and maximum starch granules content which were proportional to the average dimensions of microtubers. NH_4NO_3 , with concentrations of 1/2 to 1 time more than standard concentrations in MS medium yielded a better differentiation of parenchymal tissues than other concentrations.

Key words: *In vitro*, KNO_3 , Microtuberization, NH_4NO_3 , *Solanum tuberosum*, Tissue culture

Etude de la végétation de la Région Protégée de Sefid-Kuh à l'ouest de l'Iran

Asri, Y.¹, *Ghorbanli, M.², Mehrnia, M.³

1- Research Institute of Forests and Rangelands, Tehran, Iran

2- Biology Department, Islamic Azad University, Gorgan Branch, Gorgan, Iran

3- Animal Affairs Natural Research Center of Lorestan Province, Khorram-Abad, Iran

Résumé

La Région Protégée de Sefid-Kuh est située à l'ouest de l'Iran. Cette Région est l'un des écosystèmes inconnus des chaînes de montagnes du Zagros. La végétation d'une partie de cette Région a été étudiée par la méthode Braun-Blanquet. 86 relevés ont été faites dans les diverses associations. Les données de phytosociologiques ont été analysées à l'aide du programme d'Anaphyto par deux méthodes d'Analyse Factorielle des Correspondances (AFC) et de Classification Ascendante Hiérarchique (CAH). Par cette base, 18 associations et 6 sous-associations ont été distinguées. Ces communautés des forêts steppiques appartiennent au *Quercetea persicae* et *Quercetalia persicae*. La zonation de végétation de la Région est influencée principalement par les facteurs topographiques et edaphiques. Parmi les facteurs étudiés l'altitude par rapport à la surface de la mer, la direction et l'importance de la pente, la teneur en gravier, l'humidité, la texture et la profondeur du sol ont un rôle important dans l'installation des associations dans les zones des différentes altitudes de la Région.

Mot Clés: Braun-Blanquet, Forêt-steppique des chênes, Garrique, Iran, Phytosociologie, Région Protégée de Sefid-Kuh.

Introduction

Parmi les pays du sud-ouest de l'Asie, l'Iran a la végétation la plus diversifiée: des forêts humides dans les parties plates de la côte sud de la mer Caspienne et sur les pentes du nord des montagnes de l'Alburz. Des arbustes adaptés à la sécheresse dans les chaînes de montagnes du Zagros et du nord du Khorassan, des formations d'épineux en forme de coussin et des communautés halophiles dans les régions salées, des arbres et des arbustes dans les régions côtières du Golf Persique. Tous concourent à la diversité de la végétation de l'Iran. Cette diversité de la végétation correspond des différences de climat, de l'histoire de la flore et du potentiel de l'évolution (Frey & Probst, 1986).

La différence du climat cause la création d'intéressants écosystèmes dont chacun est riche de différentes plantes l'un de ces

intéressants écosystèmes est celui rencontré dans la Région Protégée de Sefid-Kuh. Cette Région est située dans la chaîne de montagnes de Zagros. C'est là que prend sa source l'un des plus grands fleuves d'Asie: Le Karoun. L'ordonnement de ces chaînes est tel qu'elles peuvent bénéficier au maximum des précipitations venant de la mer méditerranéenne. C'est ainsi qu'une grande partie de la plaine Iranienne échappe à la désertification.

Parmi les plus importantes études sur la végétation du secteur Kurdo-Zagrossien on peut citer les travaux de Tabatabai & Javanshir (1966) et de Zohary (1973) qui ont fait quelques transects des chaînes de montagnes du Zagros et qui ont montré les différentes zones de végétation. Mobayen & Javanshir (1971) ont également effectué une classification générale des forêts ouvertes de l'ouest Iran.

* e.mail: ghorbanli@yahoo.com

Vegetation of the Sefid-Kuh ...

Dans cette recherche nous avons étudié la phytosociologie d'une partie de cette Région Protégée du Sefid-Kuh, et nous avons présenté les associations et les sous-associations.

La région étudiée

La Région Protégée du Sefid-Kuh est située à 67 Km au nord-ouest de Khorram-Abad à 47°43', 48°18' de longitude Est et à 33°29', 33°49' latitude Nord. La superficie de cette région est de 69500 hectares. Elle appartient aux chaînes de montagnes du Zagros. La Région de Sefid-Kuh est située au Nord de Sarab-Doreh, au nord est de Kuh-Dasht, sud de Nour-Abad, au sud-ouest de Alashtar dans la province du Lurestan. Grâce à sa superficie, et à la diversité de l'habitat qui est favorable à la croissance et au développement des plantes. Grâce aussi aux animaux sauvages, cette Région est Protégée depuis 1990.

Nous nous sommes limité à une superficie de 10000 hectares pour cette recherche. La Région étudiée avec 48°2', 48°8' E et 33°40', 33°42' N est limitée au nord par les villages de Sarab-Sagha, Sarab-Chenar et Cham-Talkeh et à l'ouest par les villages de Zashat et Shineh, au nord par la montagne Korboy et à l'est par le village de Ghavareh. Une grande partie de cette Région est formée par des montagnes dont la plus élevée est la cime du Korboy, 2854 m d'altitude. La plus basse a une altitude de 1500 m au dessus de la surface de la mer.

Selon les données météorologiques de (1970-1998) la moyenne des précipitations annuelles de la Région est de 650 mm. Les précipitations les plus fortes se produisent en Janvier, Février et Mars. La courbe ombrothermique montre que l'année se divise en deux saisons sèche et humide, ce qui est la caractéristique du climat méditerranéen. La température de la Région varie entre respectivement 35.1°C et -5.9°C.

L'humidité relative de l'air à l'altitude est en moyenne 50.8 %. Les montagnes de la Région sont couvertes de neige pendant 3 mois de l'année (décembre, Janvier et Février).

Méthodes

La végétation de la Région a été étudiée entre les années 1998 et 1999 par la méthode

Braun-Blanquet (1932). L'échantillonnage des communautés de plantes a été faite par la sélection des unités de végétation (stands). La localisation des relevés a été faite sous forme accidentelle-selective dans des sites homogènes. Après détermination de formation principale et secondaire de végétation à la base physiologique et la distinction des individus d'associations par les critères floristique-écologique. Dans ces formations on a effectué quelques relevés.

La taille des relevés a été déterminée par la méthode des plots hélicoïdaux et par le tracé de courbe aire minimum (Mueller-Dombois & Ellenberg, 1974). Dans chaque relevé deux coefficients abondance-dominance et sociabilité pour toutes les espèces ont été enregistrés. En plus les caractéristiques de milieu comme l'altitude l'importance et la direction de pente ont été notés.

Les plantes collectées ont été déterminées à l'aide des flores Komarov & Shishkin (1963-1974), Rechinger (1963-1998), Davis (1965-1985), Townsend & Guest (1966-1985), Maassoumi (1986-1995) et Assadi *et al.* (1988-2000).

Les données phytosociologiques ont été analysées par la méthode d'Analyse Factorielle Correspondances (AFC) et de Classification Ascendante Hiérarchique (CAH) à l'aide de programme d'Anaphyto (Briane, 1995). Ensuite on a préparé les tableaux de phytosociologie. Après détermination de degré de fidélité des espèces dans chaque groupe, sont présentés les espèces caractéristiques, compagnes et accidentelles de chaque syntaxon. A l'aide de détermination du niveau de ces syntaxons à la base de mise en code de phytosociologie (Barkman *et al.*, 1986), a été effectué sous forme d'association et sous-association.

Résultats

La figure 1 montre les résultats obtenus de l'analyse des relevés par la méthode de AFC sur les axes de coordonnées 1 et 2. Sur ces axes en tenant compte des autres axes de coordonnées et en se référant aux résultats de la méthode CAH on peut distinguer 5 groupes. Dans un deuxième stade, pour obtenir des groupements plus complets, les relevés ou le groupement des relevés qui étaient loin de l'origine des coordonnées ont été supprimés. Ainsi les de plus grands

groupements de relevés à cause des espèces communes étaient regroupés à côté du centre des axes des coordonnées et ils ne montrent pas un groupement distingué ont été partiellement analysés.

A l'aide des résultats de la méthode CAH 5 groupes de relevés et espèces ont été dissociés sur les 5 axes des coordonnées (Fig. 2). Ensuite deux de ces grands groupes de relevés ont été analysés séparément et dans l'ensemble 11 autres groupes ont été dissociés (Figs. 3 et 4). Comme la figure 4 le montre, le groupe central peut être dissocié en d'autres groupes. Pour cette raison par la suite les 3 groupes de relevés du pourtour ont été supprimés et l'analyse a été faite sur les données phytosociologique centraux.

Au cours de deux stades de l'analyse partielle de ces données nous avons distingué un ensemble de 7 groupes. Enfin 24 groupes de 6 stades d'analyse principale et partielle des données phytosociologique ont été créés. Selon les groupes obtenus par la méthode AFC et les résultats de la méthode CAH le tableau phytosociologique a été construit (Tab. 1). 18 associations et 6 sous-associations ont été distinguées. Il s'agit de:

1. *Quercetum persicae*, 1a. *smyrniopsidetosum aucheri*, 2. *Amygdaletum orientalis*, 3. *Lonicero nummulariifoliae*-*Amygdaletum orientalis*, 4. *Polygono luzuloidis*-*Astragaletum strictifolii*, 5. *Astragalo microphysae*-*Acantholimetum aspadani*, 6. *Phlomidio Olivieri*-*Ferulaginetum angulatae*, 6a. *colchico szovitsii*-*smyrnietosum cardifolii*, 7. *Astragalo nervistipuli*-*Daphnetum mucronatae*, 8. *Astragalo nervistipuli*-*Amygdaletum orientalis*, 9. *Pyro glabrae*-*Quercetum persicae*, 9a. *eremostachyetosum pulvinaris*, 9b. *geranietosum pyrenacii*, 10. *Ceraso microcarpae*-*Daphnetum mucronatae*, 11. *Lonicero nummulariifoliae*-*Cerasetum mahaleb*, 11a. *rheetosum ribis*, 12. *Aceri cinerascens*-*Loniceretum nummulariifoliae*, 13. *Alhagietum persari*, 14. *Astragaletum nervistipuli*, 15. *Aceri cinerascens*-*Quercetum persicae*, 15a. *phleo boissieri*-*poetosum bulbosae*, 16. *Aceretum cinerascens*, 17. *Amygdalo orientalis*-*Daphnetum mucronatae*, 18. *Juncetum inflexi*.

Discussion

Les zones de végétation relativement large du secteur Kurdo-Zagrossien forment des forêts ouvertes ou des garrigues en Iran, en Iraq et en Turquie. Selon Zohary (1973) cette végétation de la forêt-steppique des chênes (oak steppe-forest) représente la classe

Quercetea brantii. Cette classe comprend des communautés qui du nord à sud au point de vue densité et du nombre des arbres devient de plus en plus pauvre. La limite inférieure des communautés arbustives de cette classe est environ à 700 m d'altitude tandis que la limite supérieure se situe à environ 2000 m ou plus.

En Iran ce secteur comprend des forêts ressemblant à des parcs qui commencent au nord-ouest du pays, ouest d'Orumieh et s'étendent vers le sud le long des chaînes de montagnes irrégulières de Zagros et se terminent aux alentours de Firouz-Abad en province de Fars. La superficie de ces forêts de chênes en Iran a été estimée à environ 5 millions d'hectares qui occupent les bandes altitudinales entre 1000 et 2100 jusqu'à 2300m.

Mobayen & Javanshir (1971) ont mis ces forêts dans le *Quercetea persicae* et ont présenté deux ordres de *Quercetalia infectoriae* et *Quercetalia persicae*. Le premier ordre s'est étendu des forêts du nord de Kermanschah jusqu'aux forêts de Orumieh et les espèces caractéristiques sont *Quercus infectoria*, *Prunus mahaleb* et *Sorbus luristanica*. Le deuxième ordre s'étend des forêts de Kermanschah jusqu'aux environs de Shiraz et ses espèces caractéristiques sont *Amygdalus orientalis* et *Quercus brantii* var. *persica*. Il y a une différence importante du climat entre ces deux ordres. Le premier est presque méditerranéen et est installé dans les endroits relativement tempérés et forme la plupart des forêts ouest d'Iran. Cet ordre est étendu dans les pentes vers le nord qui sont moins chaudes. Tandis que le deuxième ordre est installé à une plus faible altitude sur les sols fortement calcaires et il a des espèces résistantes à la sécheresse.

Les résultats obtenus montrent que les associations forestières existant dans la région protégées de Sefid-Kuh appartiennent à *Quercetea persicae* et *Quercetalia persicae*. La distribution de ces associations est influencée par les facteurs topographiques (l'altitude, la direction et l'importance de la pente et les facteurs édaphiques (la profondeur, la teneur en graviers, la texture et l'humidité). Avec l'augmentation de l'altitude la profondeur du sol diminue, le taux de gravier augmente et la texture du sol devient plus légère. Dans les plus hautes montagnes à cause de la neige présente quelques mois et

fondent progressivement mettant de l'eau la disposition des plantes. L'ensemble de ces facteurs est la cause de l'installation des communautés de plantes dans les zones des différentes altitudes et orientation géographique. La présence des sources dans les vallées en produisant des microclimat à l'humidité relative plus élevée a causé l'installation des communautés de plantes qui aiment l'humidité.

La zonation de la végétation de cette Région montre que *Quercetum persicae* forme une ceinture entre 1500-1800 m et est la plus basse des bandes des forêts-steppiques. Dans quelques sites *Pyrus glabra* et *Acer monspessulanum* ssp. *cinerascens* accompagnés de *Quercus brantii* var. *persica* ont créé des communautés de plantes bien caractéristiques. A la partie supérieure de cette bande à environ 1800-2000 m, *Amygdaletum orientalis* s. installée. Dans cette région en haute montagne (2200-2400 m) on voit des *Daphne mucronata* accompagnés *Astragalus nervistipulus*, *Cerasus microcarpa*, *Amygdalus orientalis*. A l'altitude plus élevée de 2200 m *Lonicera nummulariifolia* forme des communautés de plantes séparées accompagnées de *Amygdalus orientalis*, *Acer monspessulanum* ssp. *cinerascens*. Enfin aux plus hautes altitudes de la Région on voit des bandes larges de *Phlomidio olivieri-Ferulaginetum angulatae*.

Dans beaucoup de habitats les espèces ligneuses arborescentes ont été détruites et les formations en coussins et épineuses ont été remplacées. Dans ces régions les associations secondaires sont des arbustes et des coussins épineux comme *Amygdalus*, *Astragalus*, *Acantholimon* et *Crataegus*. Dans une partie de cette Région la forêt-steppique est complètement détruite et est remplacée par des terrains cultivés, seulement quelques arbres sont restés pour créer des ombres, et à la marge de ces endroits l'association transgressive de *Alhagietum persari* est remplacée les associations naturelles.

Références

- Assadi, M., Maassoumi, A.A., Khatamsaz, M. & Moaffarian, V. (eds.) (1988-2000) Flora of Iran, vols. 1-31. Research Institute of Forests & Rangelands Publishers, Tehran (In Persian).
- Barkman, J.J. MORAVEC, J. & RAUSCHERTS, S. (1986) Code of phytosociological nomenclature. *Vegetatio*, 67: 145-195.
- Braun-Blanquet, J. (1932) Plant sociology, the study of plant communities (Translation of *Pflanzensoziologie* by Fuller, G.D. & Conard, H.S. 1983). Mc Graw Hill Book Company, Inc. New York. 439 p.
- Briane, J. (1995) A computer software for data-processing in phytosociology, *Anaphyto*. Laboratoire de Systématique & Ecologie Végétales, Université Orsay, Paris.
- Davis, P.H. (ed.) (1965-1985) Flora of Turkey, vols. 1-9. Edinburgh University Press, Edinburgh.
- Frey, W. & Probst, W. (1986) A synopsis of the vegetation of Iran. In: Kürschner, H. (ed.), contributions of the vegetation of southwest Asia. Dr. Ludwig Reichert Verlag, Wiesbaden, pp. 9-43.
- Komarov, V.L. & Shishkin, B.K. (eds.) (1963-1974). Flora of the U.S.S.R., vols. 1-24 (Translated by Landau, N., Lavrovt, R., Blake, Z. & Behrman, L.). Keter and IPST Press, Jerusalem.
- Maassoumi, A.A. (1986-1995) The genus *Astragalus* in Iran, vols. 1-3. Research Institute of Forests & Rangelands Publishers, Tehran (In Persian).
- Mobayen, S. & Javanshir, K. (1971) Yasuj forests. *Journal of Forestry* (Tehran University), 24: 51-73 (In Persian).
- MUELLER-DOMBOIS, D. & ELLENBERG, H. (1974) Aims and methods of vegetation ecology. John Wiley & Sons Inc., New York. 547p.
- Rechinger, K. H. (ed.) (1963-1998) Flora Iranica, nos. 1-173. Akademische Druck-u. Verlagsanstalt, Graz.
- Tabatabai, M. & Javanshir, K. (1966) Iranian western oak forests, I. Kermanshah and Kurdistan forests. Forestry Service Publishers, Tehran. 234 p. (In Persian).
- Townsend, C.C. & Guest, E. (eds.) (1966-1985) Flora of Iraq, vols. 1-9. Ministry of Agriculture and Agrarian Reform, Baghdad.
- Zohary, M. (1973) Geobotanical foundations of the Middle East, 2 vols. Stuttgart. 739p.

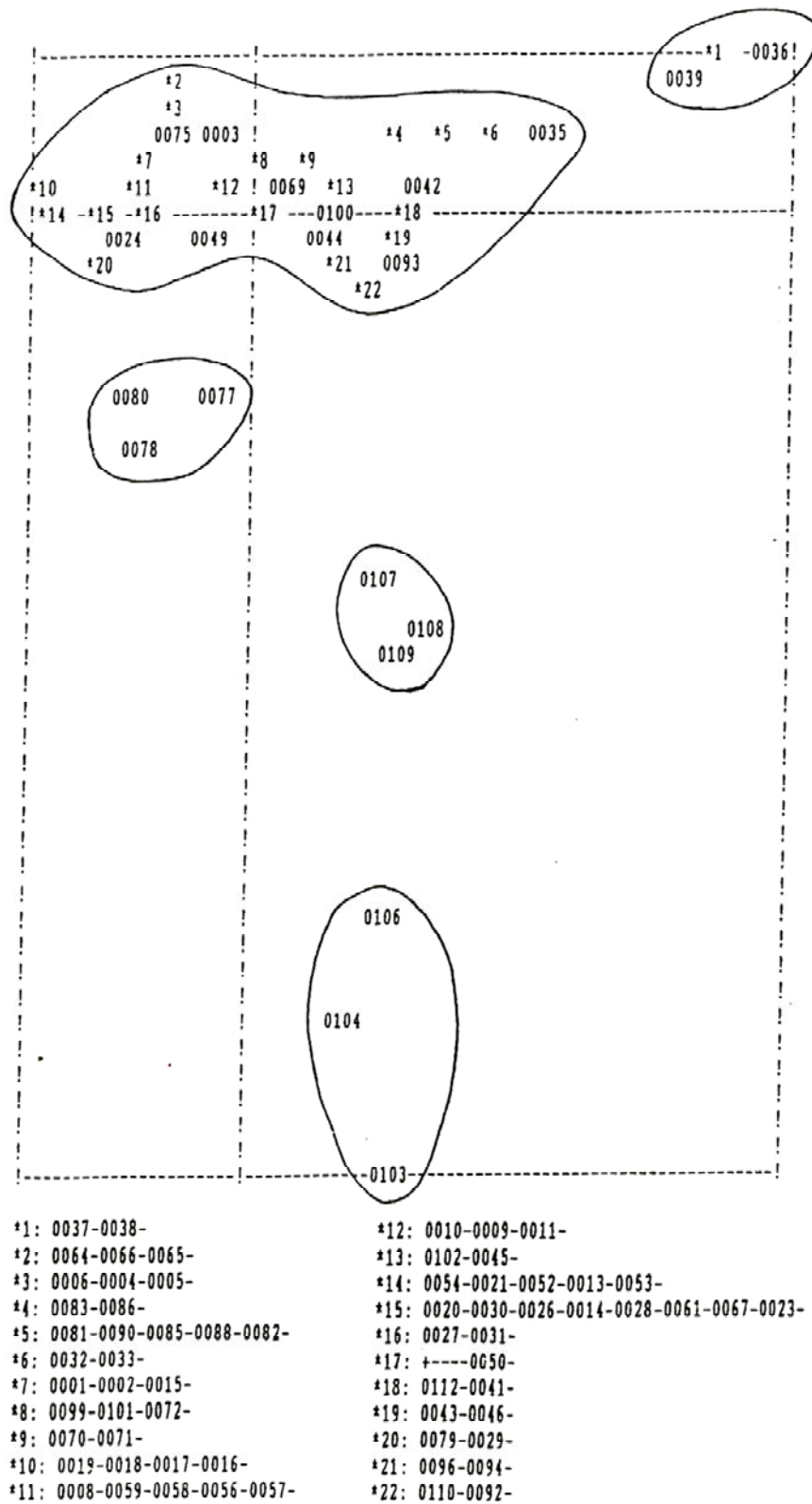


Fig. 1: Résultats de l'analyse préliminaire des relevés par la méthode AFC sur les axes coordonnés 1 et 2.

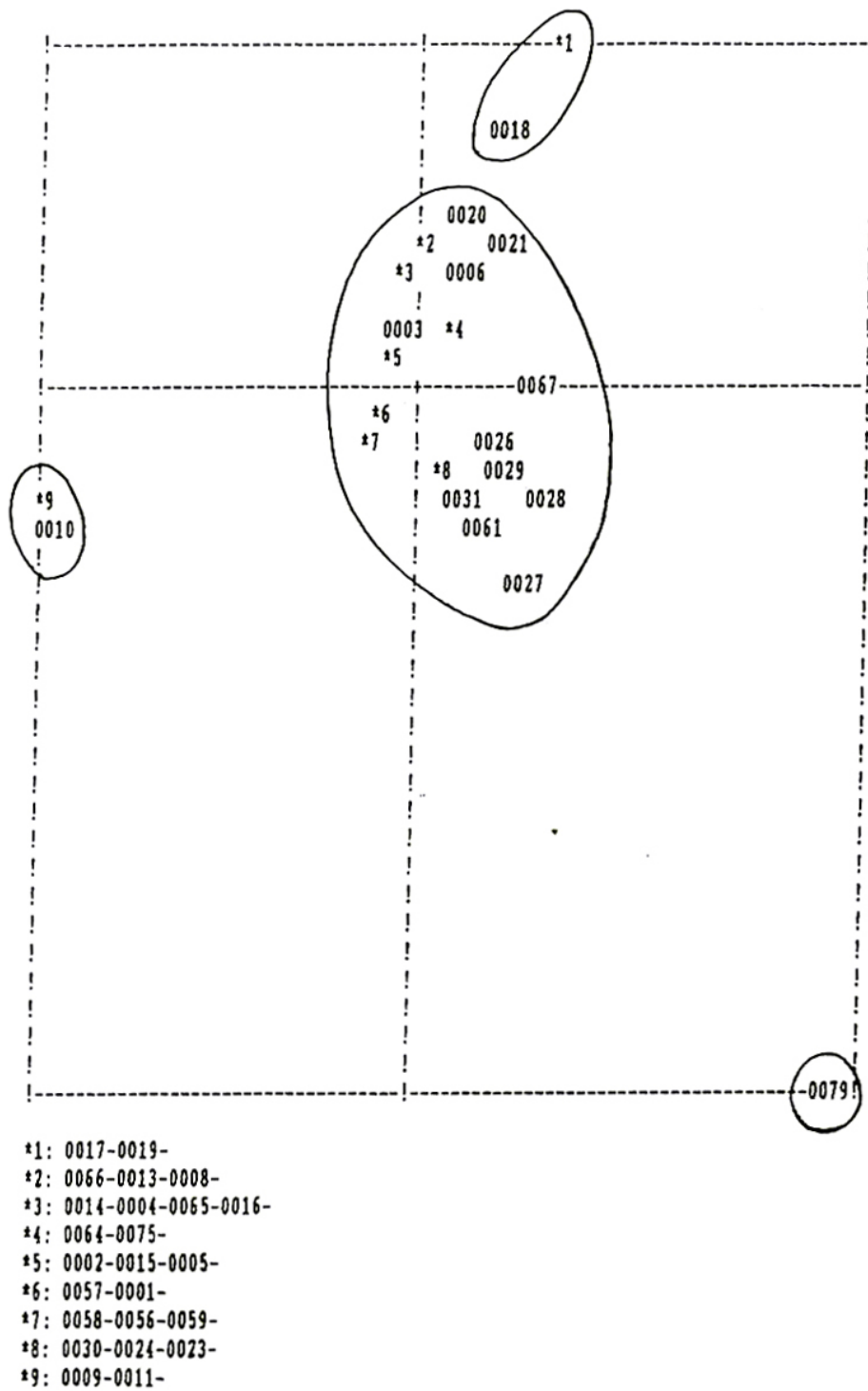


Fig.3: Résultats de deuxième d'analyse partielle des relevés par la méthode de AFC sur les axes des coordonnées 2 et 3.

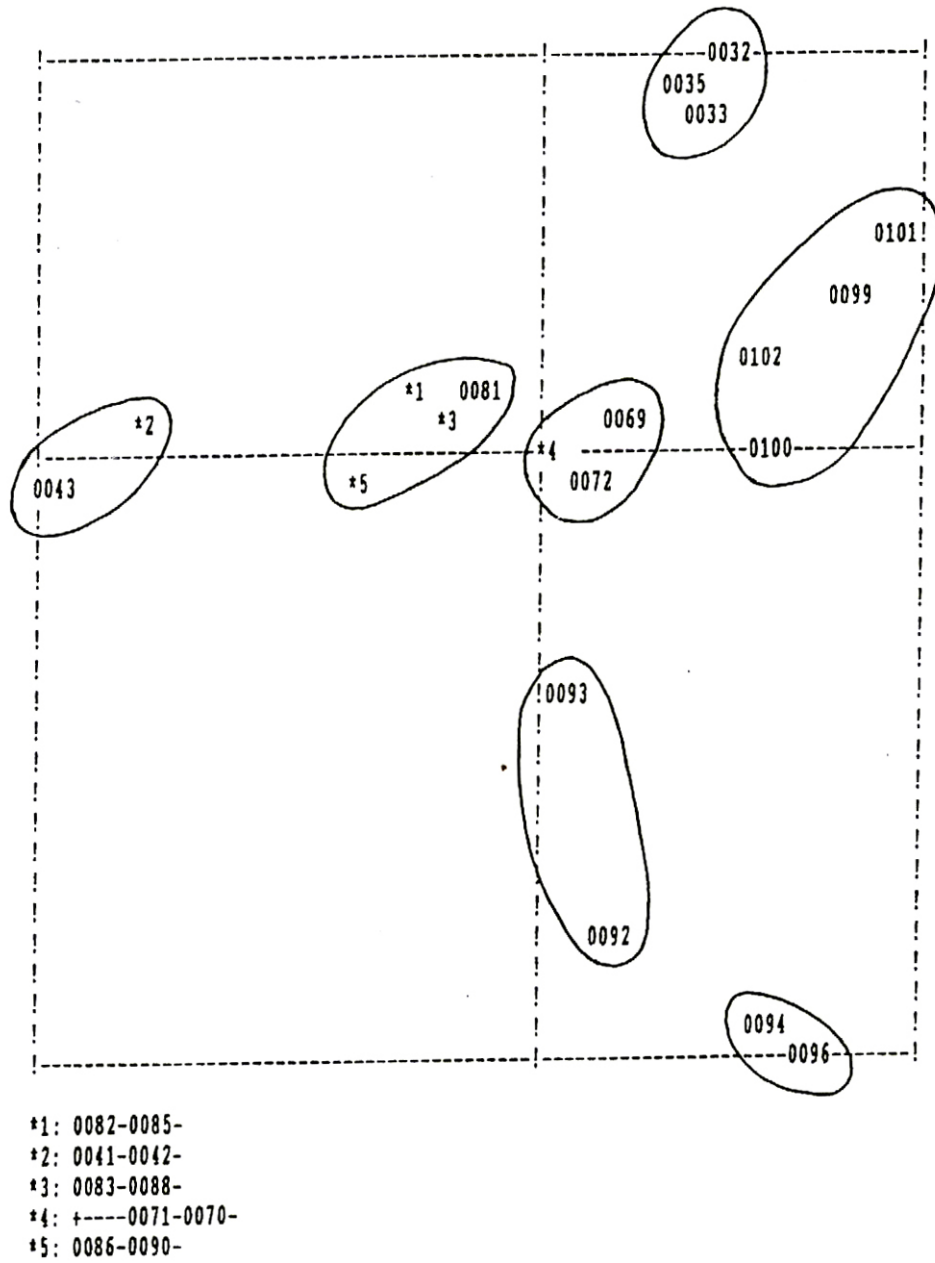


Fig.4: Résultats de troisième d'analyse partielle des relevés par la méthode de AFC sur les axes des coordonnées 2 et 3.

Vegetation of the Sefid-Kuh ...

Tableau 1.

<i>Centaurea phlomoides</i> Boiss. & Hausskn.111.....t..1..1.....+.+
<i>Tanacetum chiliophyllum</i> (Fisch. & C.A.Mey.) Schultz Bip.1.....+1..+.....2..+...+.....t.....+
<i>Cotoneaster luristanicus</i> Klotz1.....1.....2.....11.....+...1.....
<i>Ferula ovina</i> (Boiss.) Boiss.1..1.....2..1+.....
<i>Crataegus sakranensis</i> Hadac & Chrték+11.....+.....
<i>Astragalus fasciculifolius</i> ssp. <i>arbusculus</i> (Bornm. & Gauba) Tietz+.....+.....+.....+.....
<i>Eupleurum falcatum</i> L.+1.....+.....+.....
<i>Gundelia tournefortii</i> L.+1.....+.....+.....
<i>Onosma stenosisiphon</i> Boiss.+.....1+.....+.....
<i>Silene ampullata</i> Boiss.+.....+.....+.....
<i>Lactuca scarioloides</i> Boiss.11.....+1.....
<i>Alcea koelzii</i> Riedl1.....+.....+.....
<i>Mentha longifolia</i> (L.) Huds.+1.....1.....
<i>Arum giganteum</i> Ghahreman1.....+.....+.....
<i>Campanula reuterana</i> Boiss. & Bal.+.....+.....+.....
<i>Orobanche coelestis</i> (Reuter) G.Beck+.....+.....+.....
<i>Cruciata taurica</i> (Pallas ex Willd.) Ehrend.1.....+.....+.....
<i>Dionysia gaubae</i> Bornm.1.....+.....+.....
<i>Dianthus libanotis</i> Labill.+.....+.....1.....
<i>Stachys kurdica</i> Boiss. & Hohen.+.....+.....1.....
<i>Sedum hispanicum</i> L.+.....+.....+.....
<i>Allium olivieri</i> Boiss.+.....+.....+.....
Jtres especies:	
<i>Geranium tuberosum</i> L.+.1+...+1..1...1..1.....11.....+++.....+1.....
<i>Carthamus oxyacantha</i> M.B.+.....+.....1+.....+++.....++.....+.....
<i>Bromus tectorum</i> L.1..+...+121.....+...1.....2+.....
<i>Euphorbia myrsinites</i> L.+.....+1.....+1.....+1.....++
<i>Hordeum bulbosum</i> L.+11...1..1+.....1.....+.....
<i>Allium longisepalum</i> Bertol.1.....+.....+1..1.....11.....
<i>Bromus danthoniae</i> Trin.+.....+.....1.....1.....
<i>Euphorbia pepus</i> L.+1.....+.....+.....
<i>Neslia apiculata</i> Fisch., C.A.Mey. & Ave-Lall.+.....+.....
<i>Anthemis altissima</i> L.11.....
<i>Atriplex hastata</i> L.+.....+.....
<i>Salvia sclarea</i> L.+.....+.....
<i>Ixiolirion tataricum</i> (Pallas) Herb.+.....+.....
<i>Cynosurus elegans</i> Desf.+.....+.....
1.Pyro glabrae - Quercetum persicae, 1a. eremostachyetosum pulvinaris, 1b. geranietosum pyrenacii, 2. Quercetum persicae, 2a. smyrniopsidetosum acheri, 3. Ceraso microcarpa - Daphnetum mucronatae, 4. Amygdalo orientalis - Daphnetum mucronatae, 5. Amygdaletum orientalis, 6. Lonicero nummulariifoliae - Amygdaletum orientalis, 7. Lonicero nummulariifoliae - Cerasetum mahaleb, 7a. rheetosum ribis, 8. Aceri cinerascens - Loniceretum nummulariifoliae, 9. Aceri cinerascens - Quercetum persicae, 9a. phleo boissieri - postosum bulbosae, 10. Aceretum cinerascens 11. Astragalo nervistipuli - Daphnetum mucronatae, 12. Astragalo nervistipuli - Amygdaletum orientalis, 13. Astragaletum nervistipuli, 14. Polygono luzuloidis - Astragaletum strictifolii, 15. Astragalo microphysae - Acantholimetum aspadani, 16. Phlomido olivieri - Ferulaginetum angulatae, 16a. colchico szovitsii - smyrnietosum cardifolii, 17. Juncetum inflexi, 18. Alhagietum persari	

Vegetation of the Sefid-Kuh Protected Area, W. Iran

Asri, Y.¹, Ghorbanli, M.², Mehrnia, M.³

1- Research Institute of Forests and Rangelands, Tehran, Iran

2- Biology Department, Islamic Azad University, Gorgan Branch, Gorgan, Iran

3- Animal Affairs Natural Research Center of Lorestan Province, Khorram-Abad, Iran

Abstract

Sefid-Kuh Protected Area is situated in the west of Iran. The Area is one of the unknown ecosystems of Zagros mountain system. The vegetation of part of the Area was studied by Braun-Blanquet method. Phytosociological data analyzed with Factorial Correspondence Analysis (FCA) and the Hierarchical Ascendant Classification (HAC) methods by means of Anaphyto software. 18 associations and 6 subassociations were distinguished in the Area. These steppe-forest communities belong to *Quercetea persicae* and *Quercetalia persica*. The zonation of vegetation is mainly affected by topographic and edaphic factors. Altitude, slope, exposure, percent of gravel and moisture, texture and depth of the soil are the important factors to establishment of associations in the different elevation zones.

Key words: Braun-Blanquet, Oak steppe-forest, Phytosociology, Sefid-Kuh Protected Area, Woodland

بررسی پوشش گیاهی منطقه حفاظت شده سفیدکوه در غرب ایران

عصری، ی. ا.، قربانلی، م. ۲، مهرنیا، م. ۳

۱. مرکز تحقیقات جنگل‌ها و مراتع، تهران، ایران
۲. گروه زیست‌شناسی دانشگاه آزاد اسلامی واحد گرگان
۳. مرکز تحقیقات کشاورزی، خرم‌آباد، لرستان

چکیده

منطقه حفاظت شده سفیدکوه در غرب ایران قرار دارد. این منطقه یکی از اکوسیستم‌های ناشناخته رشته کوه‌های زاگرس است. پوشش گیاهی بخشی از این منطقه به روش براون بلانکه مورد مطالعه قرار گرفته است. در جوامع مختلف این منطقه ۸۶ رولوه صورت گرفته است. داده‌های جامعه‌شناسی گیاهی به کمک برنامه آنافیتو به دو روش تجزیه و تحلیل ارتباط‌های عاملی (AFC) و رده‌بندی سلسله مراتب بالارونده (CAH) مورد بررسی قرار گرفته است. بر اساس این بررسی، ۱۸ جامعه و ۶ زیرجامعه تشخیص داده شد. این اجتماعات به جنگل‌های استپی *Quercetia persicae* و *Quercetalia persicae* تعلق دارند. نواربندی پوشش گیاهی منطقه اساساً تحت تاثیر عوامل پستی و بلندی و خاکی قرار گرفته است. بین عوامل مطالعه شده ارتفاع نسبت به سطح دریا، جهت و اهمیت شیب، مقدار سنگ‌ریزه، رطوبت، بافت و عمق زمین نقش مهمی در استقرار جوامع در نواحی با ارتفاع مختلف داشته است.

واژه‌های کلیدی: براون بلانکه، جامعه‌شناسی، جنگل استپی، منطقه حفاظت شده سفیدکوه

The effect of aquatic extract of canola (*Brassica napus* L.) on chlorophyll content, nitrate reductase, catalase and peroxidase activities enzymes of soybean (*Glycine max* L.) seedling in hydroponic culture

*Niakan, M., Tajari, M

Department of biology, Islamic Azad University. Gorgan-branch, Gorgan, Iran

Abstract

Canola contains allelochemicals that effect on metabolism of weeds and crop plants. The aim of this research was to study the effect of aquatic extract of canola (*Brassica napus* L. cv Hyola 401) on chlorophyll content in cotyledon, nitrate reductase, catalase and peroxidase activity in root, stem and cotyledon of soybean seedling (*Glycine max* L. cv Gorgan 3) in Hoagland culture. The seeds of canola (*Brassica napus* L. cv Hyola 401) was planted in pot and provided aquatic extract of total plant in 5 leaf stage. This extract was added to Hoagland culture and catalase, peroxidase and nitrate reductase activities in leaf, stem and root and chlorophyll a and b content in cotyledons in soybean seedling (*Glycine max* L. cv Gorgan 3) after 9 days were evaluated. The results showed that chlorophylls (a and b) amounts in cotyledons and catalase and peroxidase in root and stem and cotyledon decreased in comparison with to control (Hoagland only) in while nitrate reductase activity reduced in cotyledon and in root and stem increased.

Key words: Canola, Catalase, Chlorophyll, Extract, Growth, Hydroponic, Nitrate reductase, Peroxidase, Soybean

Introduction

Allelopathy is derived from the Greek words "allelo" and "pathy" meaning reciprocal sufferings of two organisms, also known as biochemical interaction, among plants, describes any direct or indirect (harmful or beneficial) effect of a plant on another plant through the releases of chemical that escape into the environment (Rice, 1984). Allelochemicals are the small molecular weight compounds excreted from plants during the process of secondary metabolism. Allelochemicals may affect different physiological process in plants such as photosynthesis, respiration, cell division and nutrient uptake (Rice, 1984). It has been reported that allelochemicals affected the mineral uptake, pigment synthesis, photosynthesis, protein synthesis, electron transport involving cytochrom (Rice 1984., Rizvi & Rizvi, 1992). Allelochemicals first damage the cytolema and then send the stress information into the cell through the target

point on the cytolema to affect the adsorption of incretions and ions (Khalid et al., 2002).

Many of species of Brassicaceae (as canola) contain a group of secondary metabolites called glucosinolates. The glucosinolates are allelochemicals that may be a sink for nutrients like nitrogen and sulphur and the products of hydrolysis may have important roles in the defence system the myrosinase mediated degradation of glucosinolates gives rise to an unstable thiohydroximate-O-sulphonate which on release of sulphate can result in the production of isothiocyanates, thiocyanates, nitriles and elementary sulphur. These compounds have alleopathic potential (Rice, 1984).

It has been reported reported that allelochemicals effect on growth and photosynthesis by chlorophyll degradation (Ervin & Wetzel 2001, Zeng et al., 2001). Also allelochemicals inhibit activating enzyme such as peroxidase, catalase and amylase (Williams & Hoagland, 1982).

There is a little information about allelopathic effect of canola on growth, chlorophyll, antioxidant enzyme and nitrate reductase activity. The aim of this research was to study the effect of aquatic extract of canola (Hayola 401 cultivar) on chlorophyll a&b amounts, catalase, peroxidase and nitrate reductase activity in soybean seedling (*Glycine max* L. cv Gorgan 3) under hydroponic culture.

Methods & Materials

Canola planted and extracts preparation

Seed of canola (*Brassica nanus* L. cv Hayola 401) was planted in pots. Each pots include Silt-Clay soil tissue. After 65 days in 5 leaf phase total plants harvested and was dried in dark and griaded. 5 g of this dried sample was added to 150 ml distilled water and was shaken to 12 hours. These mixture was passed of Wathman paper (number 2) and micropore filter (0.2 micron) (Narwal & Tauro, 1996). Of this extract (%100 concentrations) solution to %70 concentrations was prepared.

Seed preparation

4 plats sterilles includes 10 seed of soybean (*Glycine max* L. cv Gorgan3) among of two Wathman papers (number 2) was placed in germinator in 24°C and %70 humidity. Seeds daily were irrigation with distilled water. After 5 days seedling was transferred to special dishes includes hydroponic culture. In special dishes 70 ml solution (includes 20 ml Hoagland solution and 50 ml extract of total plant) as treatment and 70 ml Hogland solution as control was added in each of special dishes and 4 soybean seedling were placed in them.

Biochemical assay

Chlorophyll assay

Amounts of chlorophyll a and b in cotyledon of soybean seedling treated and control plants were evaluated by Bruisma (1963). At first cotyledon were weighted and abrade in 5ml acetone. Then in 3000rpm at 15 minute were centrifuged and supernatants were separated and rate of their wave length absorbtion according to method of Bruisma (1963) in 645, 652 and 663 nm with spectrophotometers was used.

Peroxidase activity assay

Peroxidase activity in cotyledons stem and root in soybean seedling was assay to down form:

1-Solution extract

For preparation solution extract 1.2g tris and 2g ascorbate, 3.8borax, 2g EDTANa₂, 50g PEG were mixtured and distilled water was added to them (100 ml volume)

2-Enzyne extract

1g of sample (soybean cotyledon, stem and root) of treated plant and control was placed in 4 ml solution extract for 30 minute. The samples were kepted in 4°C temperature for 24 hours. 2ml acetate buffer (0.2 M concentration, pH=5), 0.4 ml H₂O₂%3, 0.2ml benzedin was mixtured and added to 0.1 ml enzyme extract of samples and their absorption was readed in 530 nm by spectrophotometer (Koroi, 1989).

Catalase activity assay

1 ml of enzyme extract to 5 ml solution includes 3000 μM phosphate buffer (pH8), 100μM H₂O₂ were mixtured. For inhibition of enzyme activity 10 ml sulfuric acid %2 was added. This mixture was titration with potassium permanganate 0.01N. Enzyme activity was assay base on indissolved 1μM of H₂O₂ in minute (Chance & Maehly, 1995).

Nitrate reductase activity assay

Nitrate reductase activity measured according to Sym (1984) method. First samples (soybean cotyledon, stem and root) was weighted and used of solution encubate includes K₂No₃, propanol and phosphate buffer and Gris I and II agent. Sample absorbtion was readed in 520nm. For assay nitrate reductase activity of standard curve of nitrite in different concentrations was used.

Statistic calculation

Statistical analysis were conducted in a completed randomized design (CRD) with four replications and mean values were compared by Duncan test at P<0.05 and P<0.01.

Results and Discussion

Our results showed that soybean growth reduced in water extract of canola. It is reported that the beneficial effects of retained crop residues for erosion control has been well documented, however the yields and growth of crops can be reduced (Fettell and Gill, 1995; Malinda, 1995). Retained wheat residues have been shown to reduce yield and growth in several studies (Purvis, 1990).

Several factors may contribute to the poor growth of canola into wheat residues including (1) nitrogen immobilisation and (2) increased incidence of root disease. According to our results radicle and epicotyle length in soybean seedling in Hoagland solution and aquatic extract of canola decreased to comparison with control (Hoagland only) (table1).It is reported that growth of root to allelochemicals is more sensitive than shoot (Peng and Shao, 2001).

It has been reported that root at first absorb allelochemicals of environment. Some of the hormones such as GA3 and IAA effects on seedling elongation. Inhibition of functional these hormones can reduce elongation of seedling. Allelochemicals such as flavonoides stopes polar transport of IAA and their function and cause growth reduction (Brunn et al, 1992). As it is reported allelochemicals inhibit respiration and decrease of the ATP production those effects on germination and growth (Jimenez & Gliesman, 1987).

Our results showed that amounts of Chla & b in cotyledon of soybean seedling in treated samples to comparison with control decreased (table1).Rice (1984) showed that allelochemicals such as phenolic acid inhibit biosynthesis of chlorophyll precursors.Decreasing of chlorophyll by allelochemicals result of inhibition of chlorophyll biosynthesis or induction of their degradation pathway..There are two pathways for chlorophyll degradation: 1) Chl dephytylation that by chlorophyllase was catalyzed and 2) Mg dechelation that by Mg-dechlatase was catalyzed (Matile et al, 1996). It is thought that allelochemicals such as phenolic acid induce activity of chlorophyllase and Mg-chlatase (Yang et al, 2004).

Aquatic extract of canola caused to decreased peroxidase and catalase activity in cotyledon, stem and root of soybean seedling (fig 1,2).

It is reported that allelochemicals effects on some of the enzyme activity for example enzyme activity such as catalase, peroxidase (POD), polygalactoronase, super oxidedismutase (SOD) and amylase in presence of allelochemicals reduce (Williams & Hoagland, 1982., Rizivi & Rizivi, 1992). Reduction of SOD and POD activity caused the reactive oxygen species (ROS) accumulation in leaf that resulting to lipid peroxidation in membrane and their destruction (Bais et al., 2003) and DNA degradation (Appel, 1993).

Table 1. The effect of aquatic extract of canola (*Brassica napus* L. cvHyola 401) in Hogland solution on length of root and epicotyl, amount of chl a & b, activity catalase and peroxidase in cotyledon, shoot and root of soybean (*Glycine max* L. cv Gorgan3) seedling in comparison with to control (Hoagland only) ($X \pm SE$).

assays	organ	Control (Hoagland)	Treatment (Hoagland+ canola extract)
Length (cm)	root	5.12± 0.075 (a)	2.77 ± 0.085 (b)
Length (cm)	epicotyl	7.07 ± 0.04 (a)	3.15 ± 0.01 (b)
chl a (mg/g FW)	cotyledon	0.136 ± 0.001 (a)	0.122 ± 0.001 (b)
chl b (mg/g FW)	cotyledon	0.0637 ± 0.001 (a)	0.0625 ± 0.0003 (b)

Also ROS chloroplast and mitochondria desintegrate and photosynthesis and respirartion decrease and following ATP production in plant drop (Shiming, 2003).

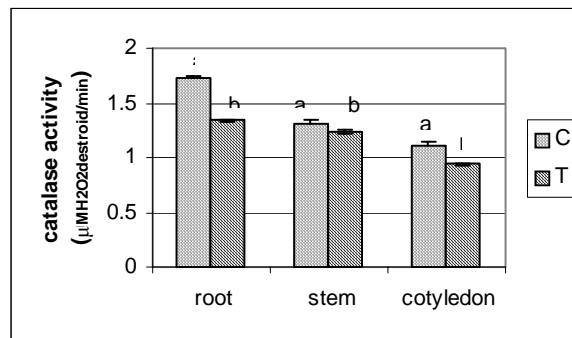


Fig 1. The effect of aquatic extract of canola (*Brassica napus* L. cv Hyola 401) in catalase activity ($\mu\text{.MH}_2\text{O}_2$ destroid/min) in cotyledon, shoot and root of soybean (*Glycine max* L. cv Gorgan3) seedling. C=control (Hoagland), T=treatment (Hoagland+extract) ($X \pm SE$).

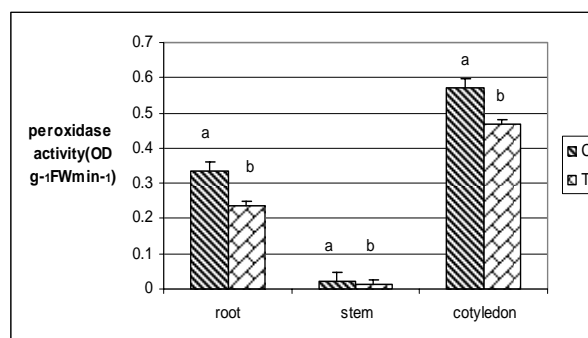


Fig 2. The effect of aquatic extract of canola (*Brassica napus* L. cv Hyola 401) in peroxidase activity ($\text{OD g}^{-1}\text{.FW min}^{-1}$) in cotyledon, shoot and root of soybean (*Glycine max* L. cv Gorgan3) seedling.

Our results showed that nitrate reductase (NR) activity in stem, cotyledon and root in soybean seedling in presence of aquatic extract of canola change. In cotyledon, enzyme activity in

Hoagland solution with canola extract decreased while in root and stem increased (fig3).

It is reported that stress effect on NR activity. Salinity stress increased NR activity in root of *Zea mays* L. while decreased their activity in leaf of *Anacordium occidentale* L. (Katalin et al., 2000).

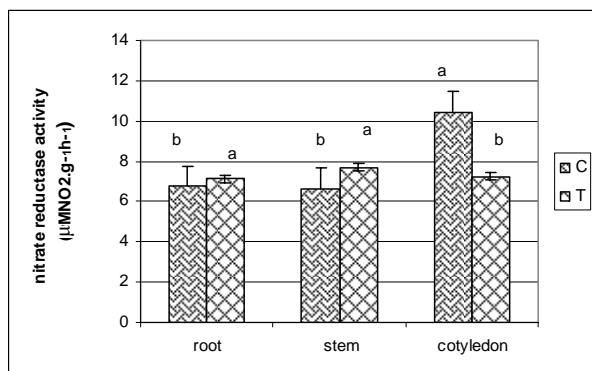


Fig 3. The effect of aquatic extract of canola (*Brassica napus* L. cv Hyola 401) on nitrate reductase activity ($\mu\text{MNO}_2\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$) in cotyledon, shoot and root of soybean (*Glycine max* L. cv Gorgan3) seedling.

References

- Appel, H. M. (1993).** Phenolics in ecological interactions: The importance of oxidation. *Chem. Ecol.* 19: 1521-1552.
- Bais, H.P., Vepechedu, R., Gilroy, S., Callaway, R.M. and vivanco, J.M. (2003)** Allelopathy: From molecules and genes to species interactions. *Science* 301: 1377-1380.
- Bruisma, j. (1963).** The quantitative analysis of chlorophyll a & b in plant extract. *Photochem. Photobiol.* 12: 241-249.
- Brunn, S.A., Muday, G.K. and Haworth, P. (1992).** Auxin transport and the interaction of phytohormones. *Plant Physiol.* 98: 101-107.
- Chance, B., and Maehley, A. (1955).** Assay of catalases and peroxidase, *Methods in Enzymology*, 2, 764-775.
- Ervin, G.N. and Wetzel, R.G. (2000).** Allelochemical autotoxicity in the emergent wetland macrophyte *Juncus effusus* (Juncaceae) *Am. J. Bot.* 87: 853-860.
- Fettell, N.A. and H. S. Gill 1995.** "Long-term effects of tillage, stubble, and nitrogen management on properties of a red-brown earth." *Australian Journal of Experimental Agriculture* 35: 923-928.
- Jimenez-orornio, J.J. and Gliessman, S.R. (1987).** In allelochemicals role in agriculture and forestry. American Chemical Society, Washington, Dc. pp: 262-274.
- Katalin, N. Omarov, R.T., Evdei, L. and Herman lips, S. (2000).** Distribution of the Mo-enzymes. aldehyde oxidase, xanthine dehydrogenase and nitrate reductase in maize (*Zea maize* L.) roots as affected by nitrogen and Salinity. *Plan Sci.* 155: 45-58.
- Khalid, Sh., Ahmad, T. and Shad, R.A. (2002).** Use of allelopathy in agriculture. *Asian Journal of Sciences.* 3: 292-297.
- Koroi, S.A.A. (1989).** Gele electrophores tishe and spectrophoto metrscho unter uchungen zomeinfluss der tem pelature auf straktur der amylase and peroxidose isoenzyme. *Physiol.Veg.* 20: 15-23.
- Malinda, D. K. (1995).** Factors in conservation farming that reduce erosion. *Australian Journal of Experimental Agriculture* 35: 969-978.
- Matile, P. Hortensteiner, S., Thomas, H. and Krautler, B. (1996).** Chlorophyllase in the chloroplast envelope. *Planta.* 201: 96-99.
- Narwal, S.S and Tauro, P. (1996).** Suggested methodology for allelopathy: field observations and Methodology. P. 255-260.
- Purvis, C. E. (1990).** Differential response of wheat to retained crop stubbles. I. Effect of stubble type and degree of decomposition". *Australian Journal of Agricultural Research* 41: 225-242.
- PengS-L and Shao. H. (2001).** Reaserch significance and foreground of allelopathy. *Chin J Appl Ecol*, 12:780-786.
- Rice, E. L. (1984).** Allelopathy. 2nd ed. Academic press, Orland. pp: 226-291
- Rizivi, S. J. H. and Rizivi. V. (1992).** Exploitation of allelochemicals in improving crop productivity. *Cand hall, London.* p: 443-473
- Shiming, L. (2003).** Allelopathy in South china agroecosystems. *Institute of Tropical and Subtropical Ecology.* P: 40-54
- Sym, G.L. (1984).** Optimisation of the *invivo* assay conditions for nitrate reductase in barley. *J. Sci. Food. Agri*, 35: 725-730.
- Williams, R.D. and Hoagland, E. (1982).** The effects of naturally Occurring phenolic compounds on seed germination. *Weed Sci.* 30: 206.
- Yang, C.M., Chang, I.F., Lin, S.J. and C.H. (2004).** Effects of three allelopathic phenolics on chlorophyll accumulation of rice (*Oryza sativa*) seedling: II. stimulation of consumption-Orientation. *Bot. Bull. Acad.* 45: 112-125.
- Zeng, R. S., Luo, S. M., Shi, Y.H., Shi, M.B. and Tu, C.Y. (2001).** Physiological and biochemical mechanism of allelopathy of Secalonic acid F of higher plants. *Agronomy Journal.* 93: 72-79.

بررسی اثر عصاره آبی کلزا بر میزان کلروفیل، فعالیت آنزیم‌های نیتрат ردوکتاز، کاتالاز و پراکسیداز در دانه‌رست سویا تحت شرایط هیدروپونیک

مریم نیاکان، معصومه تجری

گروه زیست‌شناسی دانشگاه آزاد اسلامی واحد گرگان

چکیده

گیاه کلزا حاوی ترکیبات آلوشمیمیایی می‌باشد که این ترکیبات متابولیسم علف‌های هرز و گیاهان زراعی را تحت تاثیر قرار می‌دهد. هدف از این مطالعه بررسی اثر عصاره آبی کلزا بر میزان کلروفیل و نیز فعالیت آنزیم‌های نیترات ردوکتاز کاتالاز و پراکسیداز در ریشه، ساقه و لپه دانه‌رست سویا تحت شرایط هیدروپونیک می‌باشد. در این راستا بذرهای گیاه کلزا رقم هایولا ۴۰۱ تحت شرایط گلدانی کشت و از کل گیاه در مرحله ۵ برگی عصاره آبی تهیه شد. این عصاره به محیط کشت هوگلند افزوده و پس از ۹ روز میزان کلروفیل a و b در لپه و فعالیت آنزیم‌های نیترات ردوکتاز، کاتالاز و پراکسیداز در سه بخش ریشه، ساقه و لپه دانه‌رست سویا رقم گرگان ۳ مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج نشان داد که مقدار کلروفیل a و b در لپه‌ها و نیز فعالیت آنزیم‌های کاتالاز و پراکسیداز در ریشه، ساقه و لپه‌دانه رست‌های سویا تحت تیمار در مقایسه با شاهد (هوجلند) کاهش یافت، در حالی که فعالیت نیترات ردوکتاز در لپه کاهش و در ریشه و ساقه این گیاهان افزایش یافت.

واژه‌های کلیدی: پراکسیداز، سویا، کاتالاز، کلروفیل، کلزا، نیترات ردوکتاز، هیدروپونیک

***In vitro* culture of carnation and acclimatization of the plantlet to *ex vitro* condition**

*Ghorbanli, M.¹, Nouri-Cootanai, F.¹, Allahverdi Mamaghani, B.²

1. Biology Department, Islamic Azad University, Tehran North Branch, Iran
2. Research Institute of Forest and Rangeland, Tehran, Iran

Abstract

Dianthus caryophyllus is one of the most important species in *Dianthus* genus. In order to propagation virus-free plant material, *in vitro* culture of this species var cerise royallette were studied. Explants were cultured in Anderson medium containing 1 mg l⁻¹ 6-benzylaminopurine. 6-benzylaminopurine alone induced callus in nodes and internodes explants. To achieve organogenesis, calli subcultured onto Anderson medium with or without plant growth regulator. The highest shoot length was obtained in medium without any hormone. The most suitable adventitious shoot regeneration medium was Anderson medium supplement with 4 mg l⁻¹ Kin and 0.1 mg l⁻¹ NAA. Root regeneration was observed in medium with 0.5 and 1 mg l⁻¹ naphthalenacetic acid. Rooted plantlet transferred into pot with perlite and irrigated by different nutrient solution. The effect of different nutrient solution (An, OM, MS, MC) on growth and development of plantlet were compared. The results showed Anderson medium was more effective than the others. Acclimatized plants were transferred to soil. All plants were survived in field condition and produced flower after 4 months.

Key words: *Dianthus caryophyllus* var cerise royallette, Micropropagation, Nutrient solution, Plant growth regulator

Abbreviation: BAP: 6-benzylaminopurine, 2iP: 2-Amino purine, IBA: indol-3-butyric acid, IAA: indol acetic acid, Kin: kinetin, OM: Olive Medium, NAA: naphthalenacetic acid, An: Anderson (1975), MS: Murashige & Skoog (1962), MC: Misra & Chaturvedi (1984), min: minute, PGR: plant growth regulator.

Introduction

Carnation is one of the three important cut flower in the world. Conventional propagation of this plant is cutting of auxillary shoot and seed. These methods are not only practical in all carnation cultivar but also plant material have viral and fungal contamination. Micropropagation provides much more rapid cloning from selected cultivar than would be expected from seasonally limited conventional propagation (Hammatt et al., 1997). However its more widespread use is restricted by the often high percentage of plants lost or damaged when transferred to *ex vitro* condition (Pospislova, 1999). Nugent et al. (1991)

reported plant regeneration of four cultivar in carnation from petal explant. Miller et al. (1991) used MS basal medium supplement with 4-8 μM naphthalenacetic acid and 6-benzylaminopurine for adventitious shoot regeneration of carnation. Miller et al. (1991) showed adventitious shoot regeneration from auxillary buds explants of 15 carnation cultivar. They indicated that auxillary bud size and the type between subcultures of source material influenced the production of adventitious shoots. Jethwani et al (1996) demonstrated that phenylacetic acid in combination with 6-benzylaminopurine was essential to trigger shoot regeneration from

cultured leaf callus of *Dianthus chinensis*. Fal et al., (1999) showed ethylene improved the quality of cv. BarbaretTanga explants, decreasing hyperhydricity and increasing the number of shoots, the length of the main shoot and the multiplication coefficient. Majada et al. (2000) concluded vessel ventilation promoted *in vitro* hardening of micropropagated carnation shoots and pushed the culture-induced phenotype closer to that of *ex vitro* acclimatized plants. Nontaswatsri et al. (2002) Reported shoot regeneration of leaf and nod explant of 38 cultivar in carnation. They indicated correlation coefficient between shoot regeneration percentage of nod and leaf explant was significantly positive.

There is no published protocol on *in vitro* culture of *Dianthus caryophyllus* var cerise royallette. One aim of these experiments was to investigate the effect of PGR on organogenesis of carnation var cerise royallette. Another aim was to assess whether the effect of nutrient solution on growth and acclimatization of plantlet in green house condition.

Materials and methods

Explants were taken from plants without bud dormancy, bacterial symptoms and water stress. Leaves, nodes and internodes segment, 5-10 cm long, rinsed in tap water for 30 min and washed with water and detergent. Then, explants were surface sterilized by dipping them in benomile solution (0.5%) for 20-30min, ethanol (70%) for 20-30 S followed with immersion them in hypochlorite solution (5%) for 20-30 min. Then explants transferred to laminar air flow cabinet and rinsed three times with sterile distilled water. The resulting explants were cultured on An Medium (Anderson, 1978-1980) containing 1mg l^{-1} BAP, 30g l^{-1} sucrose at PH 5.7 ± 0.1 and solidified with 8g l^{-1} Agar. After callus induction, Calli transferred on An Medium supplement with different concentration of BAP, 2iP and kin (0, 1, 2, 3, 4, 5mg l^{-1}) with combination to NAA (0, 0.1, 0.5, 1mg l^{-1}). After six weeks shoot length, shoot number, internodes number, Root number and root length were recorded. Cultures were subcultured at six weeks interval. They maintained at 25 ± 2 with 16 photoperiod provided by Double cool fluorescent tube with 1000 lux intensity.

Plantlet with normal and healthy roots was carefully washed by water. Then, plantlet immersed in 0.5% benomile solution for 20 min to

avoid fungal infection. Rooted plantlet inserted in pot containing sterile Perlite. Pots were kept in the shade and high relative humidity. Plantlet were irrigated by nutrient solution containing macro and micro nutrient of An, OM (Olive Medium), MS (Murashig and Skoog, 1962), MC (Misra and chatuvedi, 1984) and water (control). Irrigation was done 3 days interval during three weeks. After this period growth and development of shoots and roots were evaluated. Acclimatized plantlet transferred to soil and exposed to long day and 20- 25°C temperature.

All treatments were conducted in complete randomized design. For each trait means and standard error of means were calculated. Analysis of variance was done at $P\leq 0.05$. Means comparison was made by least significant difference (LSD).

Results

Effect of BAP and NAA

The highest shoot length was observed in hormone –free medium (table 1 and figure 1). In this medium shoots had dark green leaves and internodes length were 1cm. The average of adventitious shoots and shoot length decreased as the BAP concentration increased (table 1 and figure 1). The highest shoot proliferation (4.62) was observed in A₉. In medium containing BAP alone, In culture with 0.1mg l^{-1} NAA and different concentration of BAP, there was no significant difference among A₉ to A₁₁ for shoot length and A₈ to A₁₀, A₁₂ to A₁₃ for shoot number. In medium with 1mg l^{-1} NAA, Shoots had thin leaves with light green color. In medium with 0.5mg l^{-1} NAA There was no significant difference among A₁₇ to A₂₀ for shoot length and A₁₅ to A₁₆ for shoots number and A₁₈to A₂₀ for internodes number. In medium with 1mg l^{-1} NAA there was no significant difference among A₂₃ to A₂₅ and A₂₆ to A₂₈ (Table 2). NAA alone did not promote multiple shoots (figure 1). Shoot length was higher in medium with BAP and NAA together.

Optimum root length and root number were obtained in 0.5 and 1mg l^{-1} NAA. In hormone – free medium root formation and growth was observed. The highest root number was in A₂₂ and the optimum root length was in A₁₅. Increased of BAP to 1mg l^{-1} tend to decrease of root regeneration. High content of BAP inhibited root formation (Table 1 and figure 2).

Effect of 2iP and NAA

Highest shoot length (4.21) was observed in medium without PGR. The best shoot proliferation (4.63) was obtained in medium supplement with 1 mg^l⁻¹ 2iP. Shoot length decreased slowly with increased 2iP concentration (table2 and figure2). Increasing of 2iP into 1mg^l⁻¹ promoted shoot regeneration. But high level of 2iP had an inhibitory effect on shoot formation. In culture with 0.1mg^l⁻¹ NAA and different concentration of 2iP, There was no significant difference among B₈ to B₉, B₁₀ to B₁₁ and B₁₂ to B₁₄ for shoot number and B₉ to B₁₁ for internodes number.. In medium with 0.5 mg^l⁻¹ NAA There was no significant difference among B₁₇ to B₂₁ for shoot length, B₁₅ to B₁₇ and B₁₉ to B₂₁ for internodes number, B₁₅ to B₁₈ and B₁₉ to B₂₁ for shoots number. In medium with 1 mg^l⁻¹ NAA There was no significant difference among B₂₂ to B₂₄ and B₂₆ to B₂₇ for internodes number, B₂₂ to B₂₅ and B₂₆ to B₂₈ for shoots number (table2).

Root formation induced in all concentration of NAA with no 2iP. High concentration of NAA increased root regeneration. Increasing of 2iP up to 0.5 mg^l⁻¹ lead to root regeneration. Although, high level of 2iP prevented root formation (figure 2). Optimum root length and root number was in B₁₅ and B₂₂.

Effect of Kin and NAA

The highest shoot length was observed in hormone- free medium. In treatment containing Kin alone. the best shoot proliferation were obtained in 0.5mg^l⁻¹ Kin. Increased of Kin content decreased shoot number (figure 3). However in treatment involved 0.1 mg^l⁻¹ NAA and different concentration of Kin, shoot induction was slowly decreased and the highest shoot number (10.2) was observed in C₁₃ (table 3). In culture with 0.1mg^l⁻¹ NAA and different concentration of Kin, There was no significant difference among C₉, C₁₀ C₁₂ and C₈, C₁₁, C₁₃ for shoot length and C₈, C₁₁ and also C₉, C₁₂ for shoots number In medium with 0.5 mg^l⁻¹ NAA there was no significant difference among C₁₇ to C₂₁, C₁₅ to C₁₆ for shoot length, C₁₆ to B₁₈ and C₁₉ to C₂₁ for shoots number, C₁₇ to C₂₁ and C₁₆ to C₂₀ for internodes number. In medium with 1 mg^l⁻¹ NAA There was no significant difference among C₂₃ to C₂₅ For shoot length and C₂₂, C₂₃ and C₂₆ and C₂₄ to C₂₅ for shoots number, C₂₂ to C₂₃ and C₂₄ to C₂₅ for internodes number (figure 3).

Growth and development of root in medium with Kin was better than medium containing 2iP and BAP. Optimum root length and root number were observed on medium with 0.5 and 1 mg^l⁻¹ NAA respectively. In medium with Kin alone the highest root number and root length were in C₃ and C₂. Kinetin up to 1mg^l⁻¹ promoted root formation. Although, high concentration of Kin had an inhibitory effect on rooting process (figure 3).

Acclimatization of the plantlet to *ex vitro* condition

The highest shoot length was in An medium and shoot length was minimum in control. There is no significant difference between MS and OM medium in relation to root length. The best shoots, internodes and roots number were obtained in An culture medium. In contrast shoot and root number were decreased in MC and MS medium. Plantlet irrigated with An solution have an expanded aerial and root system with normal shoots. Leaves of shoots were long with dark green color. Roots were white, branched and have root hair. In contrast with OM medium, shoot proliferation and internodes length were decreased. Root system was inhibited. Roots were short, branched and dark brown color. With MS solution shoot number inhibited. But shoots have normal leaves. Root system was similar to OM medium. Using of MC medium decreased shoot number. Leave size was inhibited in comparison to An medium. Roots were long and branched with root Hair. In control treatment shoot number and length was reduced. Leaves were normal with light green color. Roots were thin and branched without suitable root hair.

Discussion

There was no adventitious shoot regeneration in leaves explants. Miller et al. (1991) concluded that use of leaf and stem explant was not successful largely due to explant senescence. Jethwani and Kothari (1996) reported Shoot regeneration from leaf derived callus of *Dianthus chinensis* using Phenylacetic acid. The optimum shoot regeneration was found in medium containing Kin and NAA. Casanova et al. (2004) reported that thidiazuron alone as well as synergistically with NAA promoted shoot organogenesis in petal and was more active than BAP. It is hypothesized shoot differentiation in carnation depend on explant source, cultivar and

balance of plant growth regulator. Produced shoots in medium containing Kin showed light green toward yellow color due to leaves senescence in presence of cytokinin (Miller et al., 1991). Genkov et al. (1997) showed that BAP, N-phenyl-N-(2-chloro-4-pyridyl) urea and TDZ increased chlorophyll content and change chlorophyllase activity but TDZ decreased photosynthetic membrane stability. In all treatment highest shoot length was in hormone-free medium. It is suggested that PGR promoted cell division and inhibited cell elongation. Vitrification of organ was observed in treatment with NAA and 2iP as well as NAA and Kin. High level of BAP induced hyperhydric organ. Vitrification of shoots depend on culture medium composition and growth regulator. Yadav et al. (2003) reported that increased concentration of iron and magnesium reduced hyperhydricity in three commercial varieties of carnation. It seems that hyperhydricity of shoots caused by oxidative stress. Saher et al (2005) showed that ethylene content, H₂O₂ production and antioxidative enzymes were higher in hyperhydric tissues of carnation. The percentage of hyperhydric shoots showed a significant decrease under bottom cooling condition (Saher et al., 2005).

Rooting of cutting is an essential process in horticultural mass production. Rhizogenesis controlled by external and internal factor. External

factor are such as temperature, light and medium composition. Internal factor are such as endogenous production of PGR, carbohydrates as well as phenolic compounds (Podwyszynska, 2003). Root induction in all treatment was similar. However root regeneration in medium containing Kin and NAA was expanded. Interaction between Auxin and cytokinin induced root regeneration in carnation. Root formation in hormone-free medium was paralleled with Leshem et al. (1986).

High level of nitrogen and potassium as well as low content of them decreased shoot and root growth. A medium had low level of nitrogen, ammonium and potassium. This medium was suitable for shoot proliferation and rooting. Shoots Growth depend on growth and development of root system. OM and MS medium had high content of nitrate, ammonium and potassium and inhibited root regeneration and subsequent shoot growth. In control treatment internodes number and shoot length were decreased because of mineral nutrition deficiency.

All plantlet were survived after transferring. Flower formation was achieved after 4 months. Nugent et al. (1991) reported flower formation was induced after 8 months. They indicated that flower was formed on short shoots and flower color was similar to mother plant such as our result. However Leshem (1986) indicated flower color of *in vitro* plantlet was different.

Table1. Shoot proliferation and rooting in different concentration of BAP and NAA

mg ^l ⁻¹		code	Shoot proliferation			Root regeneration	
NAA	BAP		Shoot length	Shoot number	internodes number	Root length	Root number
0	0	A ₁	4.26±0.6	3.81±0.74	6.01±0.89	2.5±0.54	3.01±0.63
0	0.5	A ₂	1.42±0.37	1.44±0.48	1.85±0.74	-	-
0	1	A ₃	2.10±0.37	4.21±0.74	3.41±0.48	-	-
0	2	A ₄	1.82±0.24	2.60±0.8	2.60±0.48	-	-
0	3	A ₅	1.74±0.24	3.60±0.48	2.86±0.47	-	-
0	4	A ₆	1.93±0.2	2.87±0.74	2.47±0.8	-	-
0	5	A ₇	0.52±0.31	1.21±0.74	1.08±0.63	-	-
0.1	0	A ₈	2.60±0.2	2.8±0.4	4.23±0.74	2.8±0.6	3.27±0.74
0.1	0.5	A ₉	1.5±0.31	4.62±0.48	3.09±0.63	2.7±0.6	2.6±1
0.1	1	A ₁₀	1.08±0.31	2.26±1.1	1.89±0.74	2.25±0.24	1.24±0.4
0.1	2	A ₁₁	1.24±0.24	2.61±1	2.61±0.8	-	-
0.1	3	A ₁₂	0.21±0.24	0.41±0.48	0.44±0.48	-	-
0.1	4	A ₁₃	0.14±0.2	0.27±0.4	0.21±0.4	-	-
0.1	5	A ₁₄	-	-	-	-	-
0.5	0	A ₁₅	2.73±0.24	2.69±0.8	3.22±0.74	6.47±0.73	9.27±0.74
0.5	0.5	A ₁₆	1.71±0.24	2.81±0.47	2.85±0.47	0.89±0.24	1.49±0.48
0.5	1	A ₁₇	0.74±0.24	1.23±0.4	1.29±0.4	-	-
0.5	2	A ₁₈	1±0.31	2.65±0.48	1.81±0.74	-	-
0.5	3	A ₁₉	0.83±0.24	2.42±1	1.02±0	-	-
0.5	4	A ₂₀	0.72±0.24	2.4±0.8	1.22±0.4	-	-
0.5	5	A ₂₁	0.3±0.24	0.61±0.48	0.62±0.48	-	-
1	0	A ₂₂	2.62±0.21	2.85±0.74	3.2±0.9	6.31±0.6	9.24±0.48
1	0.5	A ₂₃	1.8±0.24	3.82±0.4	2.63±0.8	0.72±0.24	2.12±0.89
1	1	A ₂₄	1.92±0.37	4.09±0.63	2.61±0.48	-	-
1	2	A ₂₅	1.7±0.24	3.8±0.74	2.29±0.4	-	-
1	3	A ₂₆	0.54±0.31	0.87±0.4	1.05±0.63	-	-
1	4	A ₂₇	0.44±0.37	0.65±0.48	0.82±0.74	-	-
1	5	A ₂₈	0.25±0.24	0.6±0.8	0.42±0.48	-	-

Table 2. Shoot proliferation and rooting in different concentration of 2iP and NAA

mg ^l ⁻¹		code	Shoot proliferation			Root regeneration	
NAA	2iP		Shoot length	Shoot number	internodes number	Root length	Root number
0	0	B ₁	4.26±0.6	3.81±0.7	6.01±0.89	2.5±0.54	3.01±0.63
0	0.5	B ₂	2.4±0.48	2.87±0.4	3.42±0.48	2.09±0.54	1.89±0.74
0	1	B ₃	2.6±0.39	4.63±0.48	3.87±0.74	-	-
0	2	B ₄	2.17±0.12	3.21±0.74	3.65±0.8	-	-
0	3	B ₅	0.46±0.25	3.45±0.8	1±0.63	-	-
0	4	B ₆	0.4±0.2	1.09±0.63	0.81±0.4	-	-
0	5	B ₇	0.51±0.31	1.6±1.2	1.2±0.74	-	-
0.1	0	B ₈	2.6±0.2	2.8±0.4	4.23±0.74	2.8±0.6	3.25±0.7
0.1	0.5	B ₉	1.11±0.2	3.2±0.4	1.84±0.7	1.14±0.19	1.63±0.8
0.1	1	B ₁₀	1.55±1	2.22±0.4	2.27±0.4	0.94±0.23	1.2±0.4
0.1	2	B ₁₁	1.84±0.5	1.8±0.74	2.05±0.4	-	-
0.1	3	B ₁₂	0.31±0.24	1.01±0.8	0.86±0.7	-	-
0.1	4	B ₁₃	0.6±0.48	1.28±0.9	1.21±0.97	-	-
0.1	5	B ₁₄	0.37±0.24	0.81±0.74	0.6±0.48	-	-
0.5	0	B ₁₅	2.73±0.24	2.69±0.8	3.22±0.74	6.47±0.73	9.27±0.74
0.5	0.5	B ₁₆	1.8±0.6	2.81±0.7	2.41±1.3	1.02±0.32	2.43±0.48
0.5	1	B ₁₇	0.73±0.24	2.6±0.8	1.18±0.8	-	-
0.5	2	B ₁₈	0.44±0.12	2.4±1	1.2±0.4	-	-
0.5	3	B ₁₉	0.4±0.37	1.47±1.2	1±0.89	-	-
0.5	4	B ₂₀	0.57±0.31	1.61±1.2	1.22±0.74	-	-
0.5	5	B ₂₁	0.6±0.37	2.08±0.7	1.42±0.8	-	-
1	0	B ₂₂	2.62±0.21	28.5±0.74	3.2±0.9	6.31±0.6	9.42±0.48
1	0.5	B ₂₃	1.63±0.37	3.41±0.8	3±0.63	2.44±0.33	4.21±0.7
1	1	B ₂₄	1.7±0.4	2.8±0.4	2.81±0.4	-	-
1	2	B ₂₅	1±0.63	2.62±0.48	1.8±0.74	-	-
1	3	B ₂₆	0.18±0.18	1.22±0.9	0.8±0.74	-	-
1	4	B ₂₇	0.12±0.09	0.8±0.7	0.69±0.4	-	-
1	5	B ₂₈	0.8±0.09	0.42±0.48	4.02±0.4	-	-

Table 3. Shoot proliferation and rooting in different concentration of Kin and NAA

mg ⁻¹		code	Shoot proliferation			Root regeneration	
NAA	Kin		Shoot length	Shoot number	internodes number	Root length	Root number
0	0	C ₁	4.26±0.6	3.81±0.74	6.01±0.89	2.5±0.54	3.01±0.63
0	0.5	C ₂	2.7±0.24	7.1±1.2	3.48±0.4	3.2±0.67	2.8±0.7
0	1	C ₃	2.74±0.22	5.8±0.74	3.6±0.48	2.62±0.37	4.2±0.74
0	2	C ₄	1.72±0.19	5.43±0.8	3.9±0.5	1.11±0.37	2.45±1.2
0	3	C ₅	1.76±0.24	5.6±0.8	4.41±0.4	2.21±0.5	1.8±0.74
0	4	C ₆	-	-	-	-	-
0	5	C ₇	-	-	-	-	-
0.1	0	C ₈	2.6±0.2	2.8±0.4	4.23±0.74	2.8±0.6	3.27±0.74
0.1	0.5	C ₉	2.11±0.3	4.43±1	5.2±0.7	1±0.31	1.81±0.4
0.1	1	C ₁₀	2.14±0.31	5.61±0.48	3.4±0.4	4.6±0.96	5.8±1.1
0.1	2	C ₁₁	2.5±0.44	2.81±1.3	3.29±0.7	-	-
0.1	3	C ₁₂	2.25±0.6	4.4±0.48	3±1.2	-	-
0.1	4	C ₁₃	2.9±0.37	10.02±1	5±0.89	-	-
0.1	5	C ₁₄	-	-	-	-	-
0.5	0	C ₁₅	2.73±0.24	2.69±0.8	3.22±0.74	6.47±0.73	9.27±0.74
0.5	0.5	C ₁₆	2.5±0.31	4.81±0.4	5.8±0.4	3.5±0.44	2.8±0.74
0.5	1	C ₁₇	2.04±0.08	5±0.63	5.22±0.4	-	-
0.5	2	C ₁₈	1.84±0.2	5.2±0.7	4.6±0.66	-	-
0.5	3	C ₁₉	2±0.31	3.8±1.4	5.01±0.63	-	-
0.5	4	C ₂₀	2.1±0.37	4.21±1.4	5.2±0.74	-	-
0.5	5	C ₂₁	1.8±0.4	4.4±0.8	4.6±0.8	-	-
1	0	C ₂₂	2.62±0.21	2.85±0.74	3.2±0.9	6.31±0.6	9.42±0.48
1	0.5	C ₂₃	1.4±0.37	3±1	3.82±0.74	1.7±0.4	1.6±0.8
1	1	C ₂₄	1.84±0.28	4.6±0.48	4.6±0.6	1.2±0.24	1.2±0.4
1	2	C ₂₅	1.61±0.37	4.22±0.74	4.2±0.7	-	-
1	3	C ₂₆	0.93±0.3	2.4±1.2	2.63±0.48	-	-
1	4	C ₂₇	-	-	-	-	-
1	5	C ₂₈	-	-	-	-	-

Table 4. Comparison of growth and development of shoot and root in different nutrient media

Nutrient solution	Shoot proliferation			Rooting	
	Shoot length (cm)	Shoot number	internodes number	Root length (cm)	Root number
An	10.11±0.9	9.6±0.48	24.8±1.6	4.7±0.7	8.2±0.74
OM	8.9±0.96	4.8±0.74	19.62±1.4	1.72±0.24	6.21±0.74
MS	8.82±0.87	5.23±0.74	18.81±2	1.52±0.3	5.4±0.48
MC	9.26±0.9	7.41±0.48	21.22±1.6	5.31±0.67	8.11±0.53
C	5.94±0.91	6.81±0.74	12.8±0.97	2.5±0.44	5.6±0.8

An: Anderson (1975) OM: Olive Medium MS: Murashige & Skoog (1962) MC: Misra & Chaturvedi (1984) C: Control

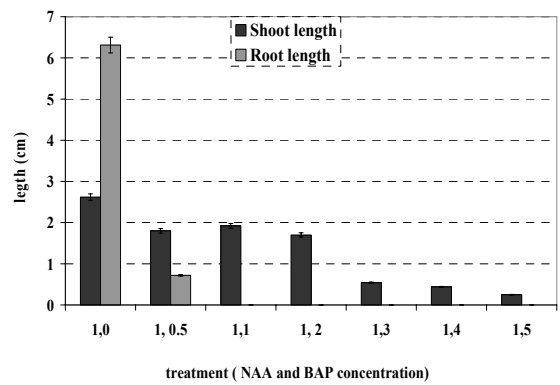
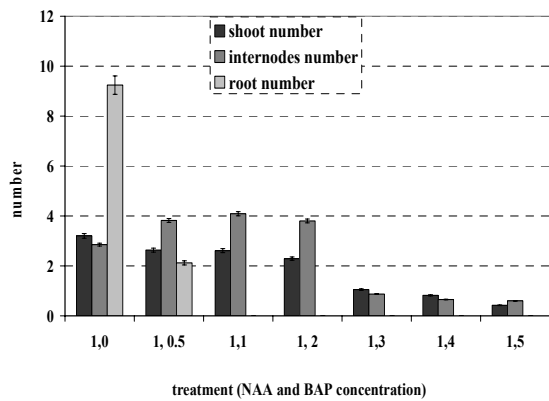
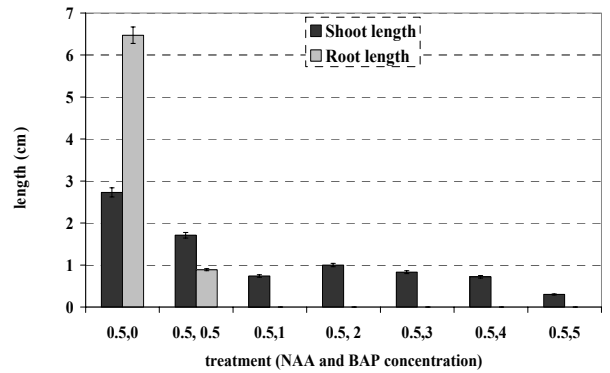
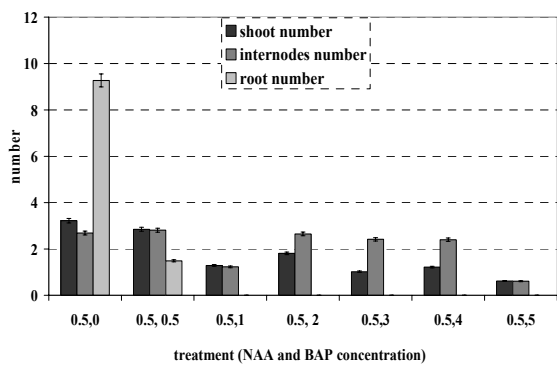
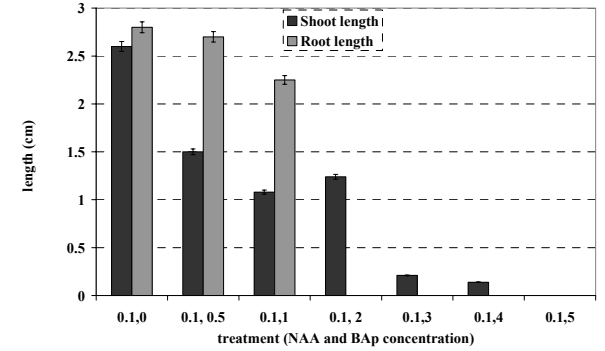
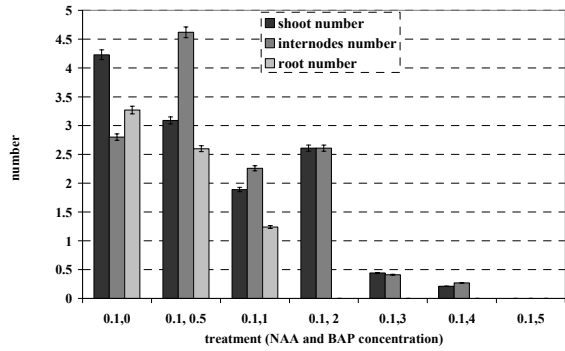
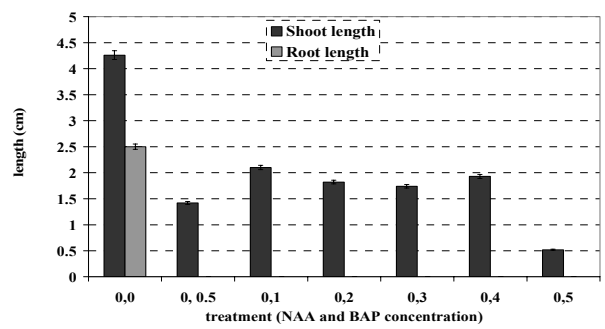
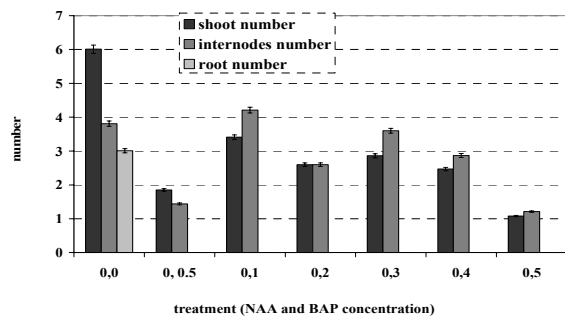


Figure1. Shoot proliferation and rooting in different concentration of BAP and NAA

***In vitro* culture of carnation ...**

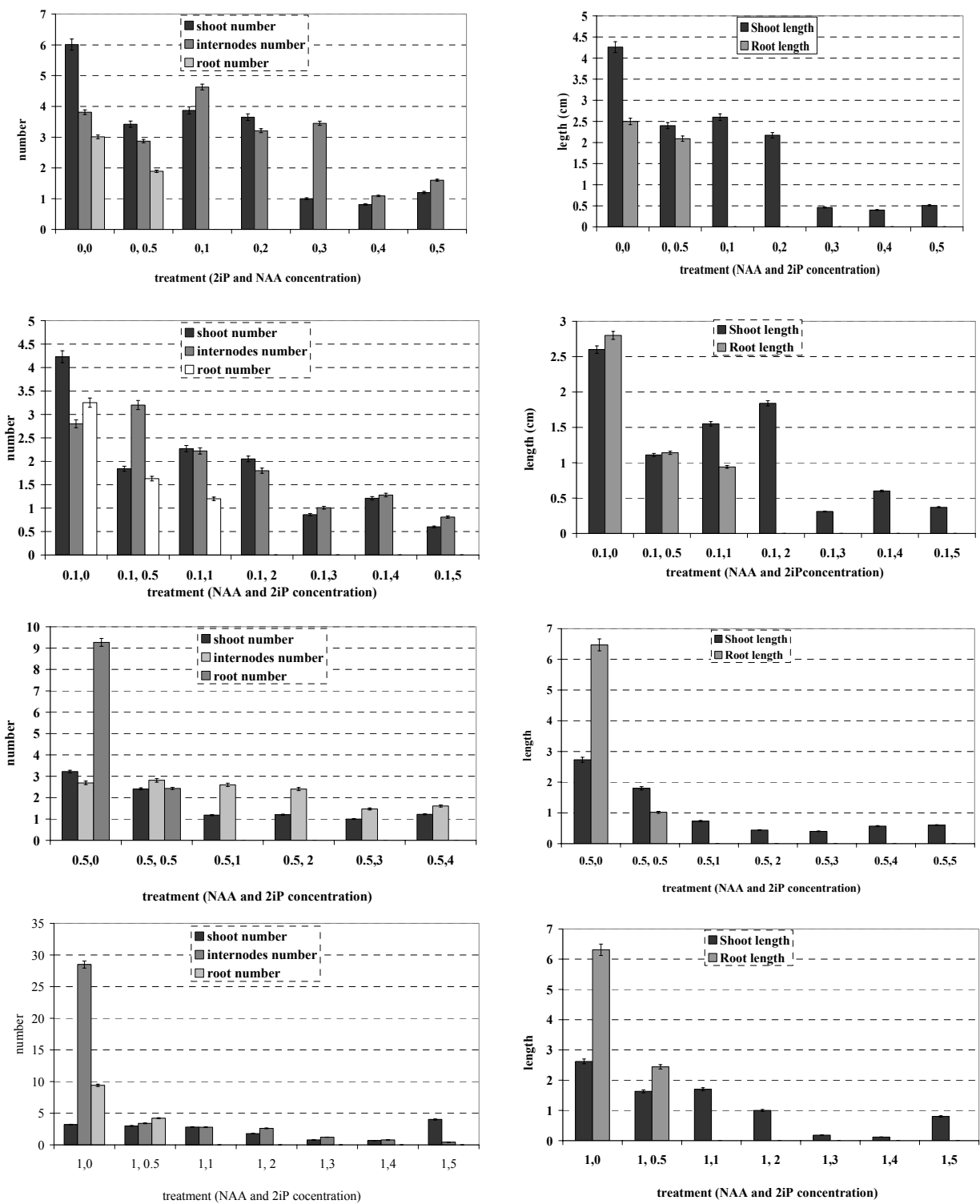


Figure 2. Shoot proliferation and rooting in different concentration of 2iP and NAA.

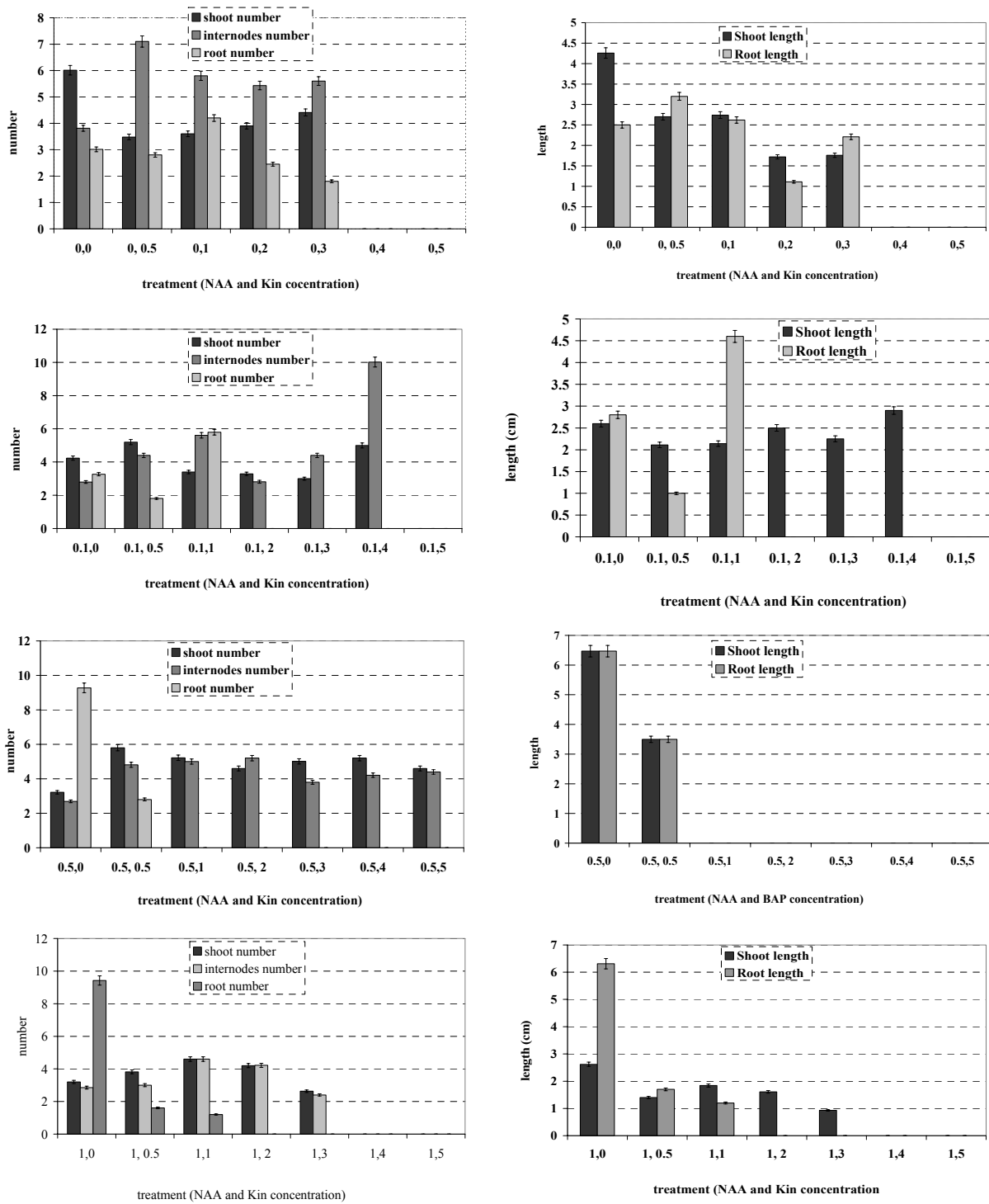


Figure 3. Shoot proliferation and rooting in different concentration of Kin and NAA.

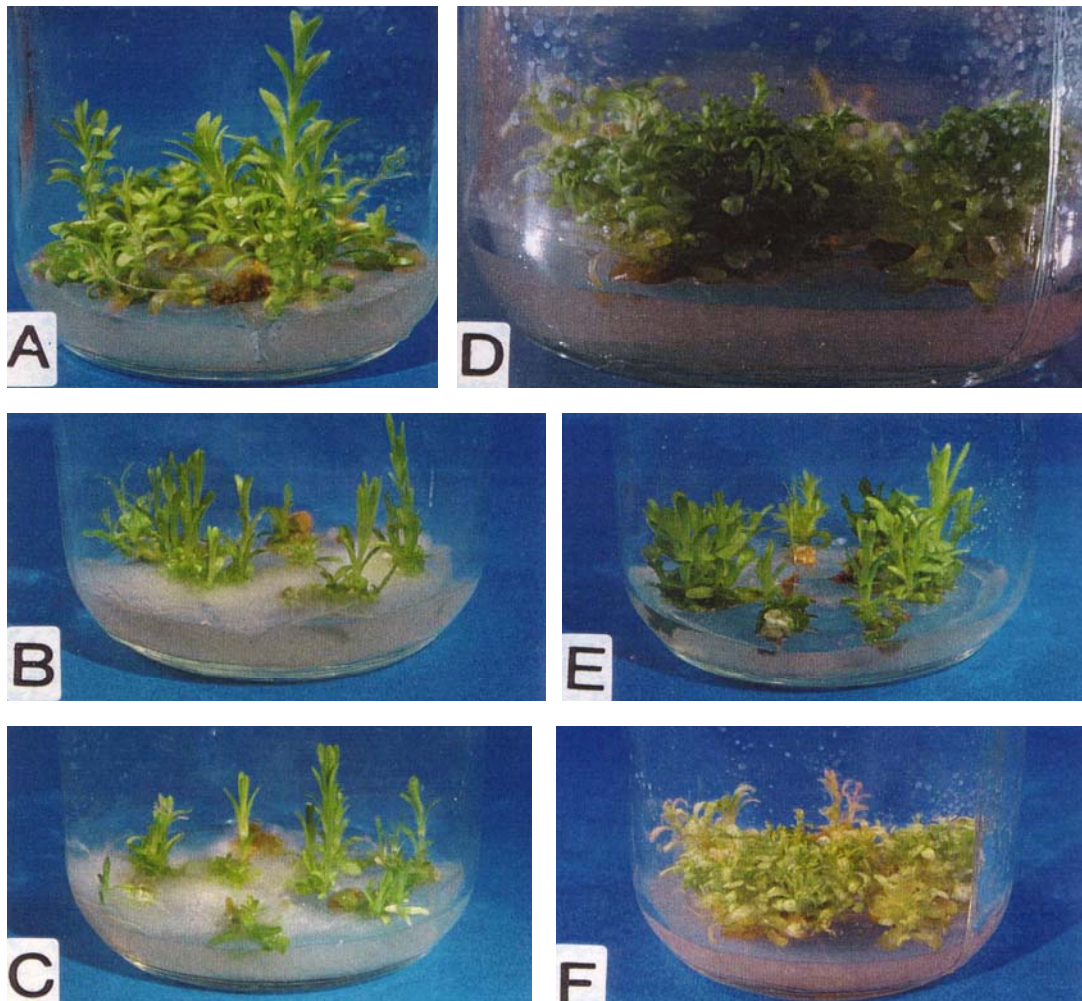


Figure 4. Shoot proliferation and rooting on media with different concentration of BAP, 2iP and kin combine with NAA. A: Shoot elongation in medium without PGR. B and C: Rooting of produced shoots in media of supplement with 0.5 and 1mg⁻¹ NAA respectively .D and E: Shoot proliferation media .F: Symptom of vitrification.

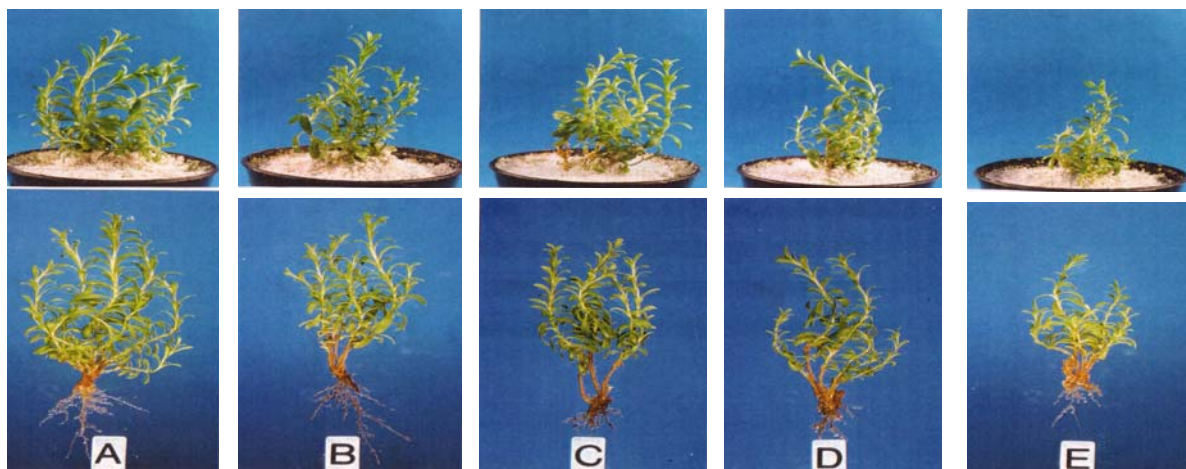


Figure 5. Comparison of growth and development of plantlet irrigated with different nutrient solution. A: Anderson medium, B: MC medium, C: OM medium, D: MS medium, E: Control.

References

- Anderson W C, (1975)** Tissue culture propagation of Rhododendrons *in vitro*. 14: 334 (abs).
- Casanova E, valdes AE, Fernandez B, Moysset L, Trillas, M I (2004)** Levels and immunolocalization of endogenous cytokinins in thidiazuron-induced shoot organogenesis in carnation, *Journal of Plant Physiology*, 161 (1): 95-104.
- Genkov T, Tsoneva P, Ivanova I, (1997)** Effect of cytokinins on photosynthetic pigments and chlorophyllase activity in *in vitro* cultures of axillary buds of *Dianthus caryophyllus* L. *Journal of Plant growth regulation*, 16 (3): 169-172.
- Hammatt N, Grant NJ, (1997)** Micropropagation of mature british wild cherry, *Plant cell, Tissue and Organ Culture*, 47: 103-110.
- Fal MA, Majada JP, Gonzalez A, Sanches Tames R, (1999).** Difference between *Dianthus caryophyllus* L. cultivar in *in vitro* growth and morphogenesis are related to their ethylene production. *Plant growth regulation*, 27(2): 131-136.
- Jethwani V, Kothari S L, (1996)** phenylacetic acid induced organogenesis in cultured leaf segments of *Dianthus chinensis*. *Plant Cell Report*, 15 (11): 869-872.
- Leshem B, (1986)** Carnation Plantlet from vitrified plants as a source of somaclonal variation. *Hort Science*, 21: 320-321.
- Nontaswatsri C, Fukai S, Touma T, Goi M, (2002).** Compartment adventitious shoot formation from node and leaf explants of various carnation *Dianthus caryophyllus* L. cultivars, *The journal of horticultural science and biotechnology*. 77(5): 520-525.
- Nugent, G., Wardley-Richardson, T. and Lu, C. (1991)** Plant regeneration from stem and petal of carnation (*Dianthus caryophyllus* L.), *Plant Cell Report*, 10(9):477-480.
- Majada JP, Tadeo F, Fal M.A, Sanchez-Tames R, (2000)** Impact of culture vessel ventilation on the anatomy and morphology of micropropagated carnation. *Plant cell, Tissue and Organ Culture*, 63 (3), 207-214.
- Miller RM, Kaul V, Hutchinson JF, Richards D, (1991a)** Adventitious shoot regeneration in carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) from axillary bud explants. *Annals of Botany*, 67(1): 33-42.
- Miller RM, Kaul V, Hutchinson JF, Mahesvaran G, Richards D, (1991b)** Shoot regeneration from fragmented flower buds of carnation (*Dianthus caryophyllus*). *Annals of Botany*, 68(6): 563-568.
- Misra P, and Chaturvedi H C, (1984)** Micropropagation of *Rosmarinus officinalis* L. *Plant cell, Tissue and Organ Culture*, 3: 163-168
- Murashige T, and Skoog F, (1962)** Revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture, *Physiologia Plantarum*, 15: 473-479
- Podwyszynska M, (2003)** Cell Tissue and Organ culture (Rooting of micropropagated shoot). In: Roberts AV, Debener T, and Gudin S, *Encyclopedia of Rose science*. Elsevier Press.
- Pospislova J, Ticha I, Kadlec P, Haisel D, (1999)** Acclimatization of micropropagated plants to *ex vitro* condition. *Biologia Plantarum*, 42(4): 481-497.
- Saher S, Piqeras A, Hellin E, Olmos E, (2004)** Hyperhydricity in micropropagated carnation shoots: the role of oxidative stress. *Physiologia Plantarum*, 120 (1); 152-161.
- Saher S, Piqeras A, Hellin E, Olmos E, (2005)** Prevention of hyperhydricity in micropropagated carnation shoots by bottom cooling : implications of oxidative stress, *Plant cell, Tissue and Organ Culture*, 81(2): 149-158.
- Yadav MK, Gaur AK, Garg GK, (2003)** Development of suitable protocol to overcome hyperhydricity in carnation during micropropagation, *Plant cell, Tissue and Organ Culture*, 72(2): 153-156.

کشت در شیشه میخک و خوگیری گیاهچه در شرایط خارج از شیشه

قربانلی، م.^۱، نوری کوتنانی، ف.^۱، الله‌وردی ممقانی، ب.^۲

۱. گروه زیست‌شناسی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال، ایران

۲. مرکز تحقیقات جنگل‌ها و مراتع، تهران، ایران

چکیده

Dianthus caryophyllus یکی از مهمترین گونه‌های جنس میخک است. برای تکثیر گیاهان بدون ویروس کشت در شیشه این گیاه، وارپته سوریز روآیالت مورد مطالعه قرار گرفته است. جداکشت‌ها در محیط کشتی که محتوی ۱ میلی‌گرم در لیتر ۶-بنزیل آمینو پورین بود، کشت داده شوند. ۶-بنزیل آمینو بورین به تنهایی در جداکشت‌های گره و بین گره کالوس القا کرد. برای بدست آوردن اندام‌زایی، کالوس‌ها در محیط اندرسون با، یا بدون تنظیم کننده رشد، واکشت گردیدند. بیشترین طول اندام هوایی در محیط بدون هرگونه تنظیم کننده رشد بدست آمد. بیشترین تولید شاخه‌ها در محیط اندرسون با مکمل ۴ میلی‌گرم در لیتر کیتین و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر نفتالن استیک اسید بدست آمد. پیدایش ریشه در محیط با ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم در لیتر نفتالن استیک اسید مشاهده شد. گیاهچه‌های ریشه‌دار شده به داخل گلدان دارای پرلیت منتقل و بوسیله محلول‌های غذایی مختلف آبیاری شدند. اثر محلول‌های غذایی (MC, MS, OM,) مختلف بر رشد و نمو گیاهچه‌ها مقایسه شد. نتایج نشان داد که محیط اندرسون نسبت به سایر محیط‌ها موثرتر بود. گیاهان سازگار شده به خاک منتقل شدند. تمام آنها در شرایط مزرعه به زندگی ادامه داده و پس از ۴ ماه گل دادند.

واژه‌های کلیدی: تنظیم کننده‌های رشد گیاه، ریز ازدیادی، محلول غذایی، *Dianthus caryophyllus* وارپته سوریز روآیالت

Ethnobotany, chemical composition and antibacterial activity of the essential oil from *Achillea micranta* L. in Golestan province

*Mazandarani, M.¹, Rezaei, M.B.², Ghaemi, E.O³, Behmanesh, B.⁴, Ahmadi.³, A. Chamani, A.⁴

1. Department of biology, Islamic Azad University-Gorgan branch, Gorgan, Iran

2. Forests and Rangeland Institute, Tehran, Iran

3. Department of biology, Golestan University of medical Sciences, Gorgan, Iran

4. Rangeland department Gorgan University, Gorgan, Iran

Abstract

Achillea micranta L. is a wild endemic medicine herb with important therapeutic effects has been used in traditional north of Iran. GC-MS analysis of the isolated essential oil from flowering aerial parts of *A. micranta* resulted to identification of 23 constituents, that eucalyptol (1,8-cineol) with 19.9%, borneol (11.9%), camphor(11.1%) and thujene (5.1%) were the major constituent of essential oil studied, respectively. The antibacterial activity was individually evaluated against 2 tested bacteria. We concluded that the essential oil showed a good antibacterial activity against tested bacteria but the Gram-positive bacteria *staphylococcus aureus* was more sensitive. This study confirms that the essential oil of *A. micranta* L. possesses antibacterial properties in vitro. 1,8-cineol, borneol and camphor can be considered as the main antibacterial constituents of the oil studied.

Key words: *Achillea micranta* L., Antibacterial activity, Essential oil, Ethnobotany.

Introduction

The genus *Achillea* (*Asteraceae*) comprises about 85 species, most indigenous to Europe and Asia. This genus those used traditionally to health wounds and skin infection (Mackuet et al., 2003). There are 40 *Achillea* species have ethno pharmacologic importance as known to be used in folk remedies for various purpose (Cavalcanti et al., 2006).

The antimicrobial and anti inflammation activities of the essential oil of various extracts from *Achillea* species have been reported before (Barel et al., 1999; Simic et al., 2000; Fillippi et al., 2006). Neither the antimicrobial activities of the essential oils of *Achillea setacea* and *Achillea micranta* nor the composition of the oils of *A. teretifolia* have been studied before (Maffei et al., 1993).

Chemical composition of the essential oil of various *Achillea* species have been reported before, that the 1,8-cineol, camphor, borneol, thujene and α -terpineol were the major constituents (Cavalcanti et al., 2006).

Popular indications of this plant include treatment of the wounds, hemorrhages, headaches, inflammation, pain, spasmodic diseases, flatulence and dyspepsia (Blumenthal et al., 2000, Mackuet et al., 2003). Previous reported that extracts from *Achillea* species had an anti oxidant capacity, which is constituent with their total faloonoid and phenol contents (Konyalioglu, 2005). Essential oils of *Achillea* genus had rich bioactive compounds. Recently there are some published reports and invitro studies about their antimicrobial properties, antispasmodic, anti inflammation, antibacterial for wound healing (Benzic, et al., 2003; Fillippi, et al., 2006; Agnihotri, et al., 2005; Baser, et al., 2002; Senatore, et al., 2004).

Ecological study and phonological process were affected not only on the rates of yield, but also on quality and quantity of secondary metabolites, therefore obtaining the best medicinal products, ecological effects and phonological stages is necessary (Van Wyk, et al., 1997). *Achillea* species make up the list of the most important indigenous economic plants of Golestan

mountainous that traditionally used by the rural healers as diuretic, emmenagogue agents, in wound healing, for abdominal pain, diarrhea and flatulence in North of Iran. Present study was designed to evaluate the phenology, ethno pharmacology and chemo type and invitro antibacterial activity of the essential oil of *A. micranta* L. that wild growing in south east of Golestan province in North of Iran.

Material and method

Collection of plant material

The aerial parts (leaves and flowers) of *Achillea micranta* L. was collected in Charbagh, 75km south east of Golestan province, when flowering, mid-June 2003 and late-July 2003, respectively. The voucher specimen of the department of biology Islamic Azad University-Gorgan branch, Golestan province.

Ethnobotany

In our study, all information was gathered through ethno botanical questionnaire, using participant observation with two famous elderly members of selected communities and who still retain traditional knowledge about medicinal plants in small mountainous village *Charbagh* in south east of Golestan province which most of them belonged to the female group (average age: 76 years), whom still retain considerable knowledge about these practices. We used a similar methodology and a comparable approach in all local regions. Our work conducted in such way to be able to compare the collected information. During the first phase of this field study, the required information about identified species, such as locally name, plant part used, the culinary process and other medicinal application was asked and tape- recorded.

Extraction

About 200 g of the dried powders of top flowering species were separately subjected to steam distillation for 2h, in full glass apparatus. The oils were isolated using a Clevenger type apparatus. The oil was stored frozen in dark glass bottles until they were used.

Oil analysis

The oils were analyzed by GC (9-A-shimadzu) and GC/MS (Varian-3400) column (DB-1,60mm-0.25mm fused silica capillary column film thickness 0.25µm using a temperature program of

50-250°C at a rate of 4°C/min, injector temperature 260°C, carrier gas: Helium, the constituents were identified by comparison of their mass spectra with those in the computer library and with authentic compounds. The identifications were confirmed by comparison of their retention indices with those of authentic compounds or with literature data. The components of the oils were identified by matching their mass spectra and retention indices with those of the Wiley 275 library in the computer library and literature. The yield of each component was calculated per Kg of the plant material, while its percentage composition was determined from the peak areas of the total oil composition.

Oil dilution solvent

Microbial strains were streaked on Muller Hinton agar plates using sterile cotton swabs. 5 micro liter of dimethylsulphoxide (DMSO) loaded on sterile blank disks were placed on the agar plates and were incubated at appropriate temperatures for 24-48h. There was any antimicrobial activity on the plates and hence DMSO was selected as a safe diluting agent for the oil. 5 micro liters from each sterile oil dilutions was added to sterile blank discs. The solvent also served as control (25, 50, 100, 200).

Test organism

The test organisms used in the study were obtained from Persian Type Culture Collection, Tehran, Iran (PTCC), namely: *Staphylococcus aureus* (PTCC N. 1112) and *Pseudomonas aeruginosa* (PTCC N. 3142).

Antimicrobial activity

The antibacterial effects were tested by the disc-diffusion method, briefly, Muller Hinton Agar plates were cultured with a standardized inoculums (1.5×10^8 cfu/ml equal to 0.5 McFarland) of each bacterial strains, then the saturated discs with different concentration of essential oils were carefully placed on the plates, the plates then were incubated aerobically at 37°C and inhibition zones were measured after 24 hr. The inhibition zones were compared with the control disc containing Gentamycin as positive control. Each test was repeated 3 times and means inhibition zone were recorded. Inhibitory zone ≥ 12 mm used as good inhibitory effect of extract. Disc diffusion method was employed for the

determination of antimicrobial activities of the essential oil .A broth micro dilution broth susceptibility assay was used (Nostro, 2000).

Result and discussion

Phenology and autecology

This study in many field observations, we found that *Achillea micranta* L. is one of the most important indigenous endemic medicine herbs in Golestan province, North of Iran. It seems to prefer growing with wide density in sunny position, western aspect of grassland of mountain to 2100 meter above the sea level in dry-cool climate and prefer soils with organic carbon (3.2%), nutrient material (10.8%), EC (0.4) and pH (7.5) from in Charbagh small village in south east of Golestan province.

Phenology showed that it is begin vegetative growth stage at the early of May, flowering in mid-June, fruiting in August and falls in September.

Ethnobotany

Ethnobotanical date showed the *Achillea micranta* L. with Persian name "Bumadaran" and locally name "Zarde maramboo" is wide used traditionally for healing wounds, internal bleeding, dysmenorrheal and stomachache, spasm, anti in flammation, headache, gastro intestinal, fever and sedative.

Authors have been reported to effect of *Achillea* species to treat wounds, sore, inflammation and their essential oil compositions in quality and quantity were different , similar identified in due chemo type and their medicinal effects in dependence on different climatic and ecological conditions in various regions of the world (Maockute, et al., 2003; Suleimenov, et al., 2004).

Chemical composition of the essential oil

Steam distillation of dried flowering aerial parts of *A. micranta* L. was pale yellow about 23 constituents was identified by means of GC-MS analysis of the essential oil from *A. micranta* respectively. In Table- 1, Eucalyptol (1,8-cineol), borneole, camphor and thujene were the major constituent of the essential oil, representing 19.9, 11.9, 11.1 and 5.1% of the total oil, respectively.

1,8-cineole , camphor and borneole were found to be the major constituent of *A. micranta* L. oil in our research (Table -1).

Table 1. Chemical composition of essential oil from *A. micranta* L.

Compounds	Rt	%
α-pinene	9.7	1.2
camphene	10.35	1.5
sabinene	11.66	4.7
α-phellandrene	13.04	1.1
α-terpinene	13.59	1.2
eucalyptol(1,8-cineole)	14.50	19.9
γ-terpinene	15.70	4.2
thujene	18.15	5.1
iso thujene	18.66	2.3
cis-mentha-2-en-1-ol	18.95	2.3
camphor	20.07	11.1
pinocarvone	20.91	0.3
borneol	21.15	11.9
terpinene-4-ol	21.81	5.4
α-terpineol	22.46	3.5
trans-piperitol	23.28	3.8
7-menthyl-3-menthylene-6-octan	23.78	2.0
3,7-dimethyl-3-6-octadinene	24.50	1.0
bornyl acetate	26.93	1.5
eugenol	30.25	1.6
caryophyllene	33.06	2.4
nerodiol	39.60	2.6
caryophyllene-oxide		2.1
others not identified(6)	40.71	7.3%
total		100%

It can be concluded that camphore type compounds as observes in some *Achillea* oil studied, such as the 1,8-cineole, camphor and α-terpineole have been found as major compounds in many other *Achillea* species (Rustayian, et al., 1998; Simic, et al., 2000).

Antibacterial activity

The in vitro antibacterial tested of the essential oil of *A. micranta* L. against *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* in Table -2.

Table 2. Antibacterial activity of the essential oil of *A. micranta* using agar disc diffusion method

Tested bacteria	200mg/ml	**Gentamycine
<i>S. aureus</i>	*21	22
<i>P. aeruginosa</i>	12.5	14

s.a: *Staphylococcus aureus*; p.a: *Pseudomonas aeruginosa*; * Inhibition zone (mm); **Positive control

Results obtained from disc diffusion method, followed by the measurement of zone inhibition, is the most sensitive bacteria tested in the presence of the oil extracted from *A. micranta* L. respectively.

Staphylococcus aureus was more sensitive test microorganism against the oil applied (Table-2). The above mentioned oil was also found to posse's antibacterial activity against *S. aureus* and *P. aeruginosa* to the best of our knowledge, the in

vitro antibacterial activities of the essential oil of *A. micranta* L. has not been reported before. Based on a reported concerning the antimicrobial activities of the essential oil from *A. fragrantissima*, terpinen-4-ol was concluded as one of the compounds responsible for bacteriosidic effect against several microorganism (Barel et al., 1991).

In our similar works, the antimicrobial of *Achillea* species oils were more pronounced against Gram-positive than Gram negative bacteria as fact previously observed with essential oils from other species. This general resistance among Gram-negative bacteria has been ascribed to the presence of their phospholipidic membrane. (Senatore. et al., 2004; Bezic, et al., 2003; Fillippi, et al., 2006; Baser, et al., 2002).

Different antimicrobial activities of examined essential oils seem to be due to differences in oil composition of *Achillea* species belongs to various habitats. 1,8-cineole and camphor are well known chemicals with their pronounced antimicrobial potential in *Achillea* species, these similar works showed by Benzic, et al., 2003; Fillippi, et al., 2006; Agnihotri, et al., 2005; Baser, et al., 2002.

In similar our work, we found that camphor, 1,8-cineol, borneol can be considered as the antibacterial constituents of the oils of *A. micranta*. In conclusion *A. micranta* L. essential oils gave interesting results, as in their traditional usage for the wound healing, antibacterial activity.

Ethnobotany, phytochemistry, and antibacterial activity of this oil may lead to extraction and production of active compounds in single or combined forms with useful medicinal application.

References:

- Angihotri, V.K., Lattoo, S.K., Thappa, R.K. Kaul, P., Oazi, G.N., (2005) Chemical variability in the essential oil components of *Achillea millefolium* agg in India. *Plantamed*, 71(3): 280-3.
- Baser, K.H., Demirci, B., Kocak, S., Akinci, C., Malyer, H., Gulerus, G., (2002) Composition and antimicrobial activity essential oils of *A. multifida*. *Planta Med.* 10: 941-3.
- Benzic, N., Skocibusic, M., Dunkic, V., Radonic, A., (2003) Composition and antimicrobial activity of *A.clavennae* L. *J.Essential, Phytother Res*, 17(9): 1037-40.
- Blumenthal, M., Busse, W.R., Goldberg, A, Grueuwald, J., Hall, T., (2000) In herbal medicine expanden commission E, 11, 282-285

- Caralcantis, A.M., Baggio, C.H., Freitas, C.S., Reik, L., (2006) Safety and antinuclear efficacy studies of *A. millefolium* L. after chronic treatment in Wistar rats. *Ethnopharm*, 107,277-284
- Fillippi, J, Lanfranchi, D.A., Prado, S., Baldovini, N., Melerhenrich, U.J. (2006) Composition, ethnobotanical and antibacterial of *A.ligustica*. *Agric Food Chem*, 54(17):6308-13.
- Mockute, D., Judzeatieni, A., (2002) Chemical composition of the essential oils of *Achillea millefolium* L.Ssp.millefolium growing wild in Vilnuse. *F.J.* 13, 97-102.
- Rustaiyan, A., Komeilizadeh, H.M.S., Shariatpanahi, Jassbi, A., Masoudi., S., (1998) Comparative study of the essential oils of three *Achillea* species from Iran. *J. Essential Oil Res.*10, pp.207-209.
- Senatore, F., Napolianto, F., Arnold, A.N., Bruno, M., Herz, W., (2003) Composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Achillea falcata* L. *Flavour and Fragrance Journal.*20, 3, 291-294.
- Simic, N., Andjelkonvic, S., Palic, R., (2000) Composition and antibacterial activity of *A. chrisochoma* essential oil, *Journal of essential oil, Res* 12, pp. 784- 787.
- Suleimenov, Y.M., Atazhanova, G.A., Ozek, T., Demirci, B., Kulijasov, A.T., Adekenov, S.M. and Baser, K.H.C., (2004) Essential oil composition of three species of *Achillea* from Kazakhstan. *Chemistry natural compounds*, 37, 447-450.
- Van Wyk, B., Gericke, N., (2000) *People's plants*. Pretoria: Briza Publications, pp. 128.
- Konyaliogla, S., karamenderes, C., (2005) The protective effects of *Achilla* L.species native in Turkey against H₂O₂-induced oxidative damage in human erythrocytes and leucocytes .g.of *Ethnopharma* 102-221-227.

اتنوبوتانی، بررسی ترکیبات شیمیایی و اثر ضد باکتریال اسانس گیاه دارویی بومادران زرد (*Achillea micranta* L.) در جنوب شرق استان گلستان

مازندرانی، م.^۱، رضایی، م.ب.^۲، قائمی، ع.^۳، بهمنش، احمدی، ع.^۳، ب.، چمنی، ا.^۴.

۱. گروه زیست شناسی دانشگاه آزاد اسلامی واحد گرگان، ایران

۲. مرکز تحقیقات جنگل‌ها و مراتع، تهران، ایران

۳. گروه میکروبیولوژی، دانشگاه علوم پزشکی گلستان، گرگان، ایران

۴. گروه مرتع، دانشگاه منابع طبیعی گلستان، گرگان، ایران

چکیده

گیاه دارویی *A. micranta* L. یکی از مهمترین گونه‌های دارویی و بومی است که سال‌هاست در طب سنتی مردم شمال ایران مصارف درمانی فراوان دارد. این تحقیق با هدف اتنوبوتانی، شناسایی ترکیبات ثانوی اسانس و بررسی اثر ضد باکتریال گیاه در جنوب شرق استان گلستان انجام گرفت. نتایج گاز کروماتوگرافی اسانسی حاکی از وجود ۲۳ ترکیب شیمیایی در روغن اسانس گیاه بود که مهمترین آنها شامل اوکالیپتول (۱۹/۹ درصد)، بورنتول (۱۱/۹ درصد)، کامفور (۱۱/۱ درصد) و توجن (۵/۱ درصد) بود. بررسی اثر ضدباکتریال اسانس علیه دو باکتری گرم مثبت و منفی نشان داد که گیاه تاثیر مطلوبی علیه رشد باکتری گرم مثبت *Staphylococcus aureus* دارد که طبعاً به علت مواد موثره اوکالیپتول، بورنتول و کامفور است که از ترکیبات مهم با اثر ضدباکتریایی می‌باشند. نتایج این تحقیق در تاثیر استفاده سنتی آن در رفع عفونت، التیام زخم و رفع التهابات اندام‌های داخلی و خارجی بدن قابل توجیه است.

واژه‌های کلیدی: اتنوبوتانی، اثر ضدباکتریال، بومادران زرد (*Achillea micranta* L.)، مواد موثره اسانس.

Some Physiological Responses of *Nostoc* sp. JAH 109 to the Combination Effects of Limited Irradiance, pH and DIC Availability

*Shokravi Sh.¹, Amirlatifi F.¹, Safaie M.¹, Ghasemi Y.², Soltani N.³

1. Dep. Biology, Islamic Azad Univ., Gorgan Branch, Gorgan, Iran

2. Dep. Pharmaceutical biotechnology, Faculty of Pharmacy, Shiraz Univ. Medical Science, Shiraz, Iran

3. Dep. Biology, ACECR, Research Institute of Applied Science, Univ. Shahid Beheshti, Tehran, Iran

Abstract

Growth, pigment compositions, nitrogenase activity, photosynthesis and heterocyst frequency fluctuations of dominant species *Nostoc* sp. JAH 109, isolated from rice field, were evaluated in combination of limited irradiance ($2 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$), different pHs (5,7,9) and inorganic carbon availability. *Nostoc* sp. JAH 109, can be considered as an alkalophilic organism. Optimal growth rate were observed at pH 9. Size of phycobilisomes and relationship between photosystem II and photosystem I increased in pH 9 and DIC available condition. This strain could not grow well in acidic condition, but neutral and alkaline condition cause active carbon dioxide concentration mechanism system. The pattern of nitrogenase activity seems more or less regular and linear at the first days after inoculation both in neutral and alkaline conditions. With respect to nitrogenase activity, the highest rate was in pH 9 and DIC availability. This seems true for heterocyst frequency fluctuations too. The higher photosynthetic capacity (P_{max}) per unit of chlorophyll was resulted in higher DIC concentration at alkaline condition.

Key words: Cyanobacteria, DIC, Nitrogenase, pH, Phycobiliproteins, Photosynthesis.

Abbreviations: APC allophycocyanin, Chla chlorophyll *a*, DIC dissolved inorganic carbon, PBP phycobiliproteins, PC phycocyanin, PE phycoerythrin

Introduction

Survival of cyanobacteria in natural environments depends upon their ability to acclimate to the variable conditions of environmental factors. Light is evidently one of the most important factors which determine the natural distribution of cyanobacteria. As other photosynthetic organisms, cyanobacteria are able to adapt to variations in light intensity; nevertheless, little work has been done in this area (Fernandez –Valiente and Leganes 1989; Soltani et al., 2006). In rice fields, light reaching the floodwater varies both daily and over the crop cycle. Because of the variation in light transmission caused by changes in rice canopy height. Underwater irradiance measured in Valencian rice fields (Spain) of full sunlight ranged from $700 \mu\text{mol photon}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ early in growth of the crop to $5 \mu\text{mol photon}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ when the crop was mature (Poza –Carrion et al., 2001).

In addition to light, pH is another factor, which clearly affects the distribution of cyanobacteria. Most cyanobacteria grow in environments that are neutral to alkaline and in laboratory cultures the optimal pH ranges from 7.5 to 10. Generally, a wide range of adaptation to pH has been observed not only among different genera but also between different isolates of the same species. In view of these precedents it seems clear that more work is needed to understand the physiological response of cyanobacteria to changes in pH and irradiances (Fernandez – Valiente and Leganes 1989).

In rice fields, the pH of flood water varies during the day and during the growth of the crop due to the photosynthetic activity of cyanobacteria, algae and other macrophytes. DIC concentration in the floodwater also varies on a daily and seasonal basis depending on photosynthetic and respiratory rate (Leganes and Fernandez-Valiente, 1991).

In the work presented here, we analyze the combined effect of three environmental factors, pH, low irradiance and DIC concentration, on growth, pigment composition and nitrogenase activity of the cyanobacterium *Nostoc* sp. JAH 109, a natural isolate from Golestan rice fields. We believe that this combination of environmental variables reflects nature more realistically.

In the economical point of view nostocalean cyanobacteria can possibly be used as biofertilizer in paddy fields. Due to importance of rice as main food in Iran, and also for the catastrophic damages of using large amount of chemical fertilizers it is necessary to survey using different sources of biofertilizers in paddy fields (Roger and Kulasoorya 1981). Reaching to this aim, evaluation the viability of heterocystous cyanobacteria especially nostocales and stigonematales in response to environmental fluctuations seems basic (Boussiba 1988; Anand et al., 1990). In addition some potent bioactive compound that extracted from this genus, draw clear landscape for pharmacological industries (Olvera-Ramirez et al., 2000; Ghasemi et al., 2001; Tabatabaie Yazdi et al., 2004; Soltani et al., 2005).

Methods and Materials

Isolation of strain

The strain *Nostoc* sp. JAH 109 was isolated from soils of paddy fields of Golestan province (North of Iran). Isolation and purification was made by usual methods (Kaushik 1987). Following achievement of axenic culture, cyanobacteria were cultivated in liquid medium. Identification was done using Anagnostidis and Komarek (1988) and Castenholz (2001).

Culture conditions

Stock cultures were grown in the BG11₀. Temperature was maintained at 30 °C and cultures were incubated under a constant light intensity of 60 $\mu\text{mol photon.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ supplied by three florescent lamps. Cells in logarithmic phase of growth were collected from stock cultures and used as inoculate for experiments. Cells from stock culture were inoculated in 300 ml of BG11₀ medium in 500 ml erlenmeyer flasks stoppered with cotton plugs. Culture media were buffered with 25mM Mes (for pH5), 2.5 mM HEPES (for pH7) or 10mM BTP (for pH9) and adjusted to the pH with HCl or KOH. Cultures were illuminated via different numbers of nets between light source

and flasks. Illumination was supplied with 40 W cool white fluorescent tubes to obtain a desired of irradiance ($2 \mu\text{mol photon.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$). Light measurements were made with Licor LI-1000 Datalogger equipped with quantum sensor. Aliquots were taken and used for determinations, when cells adapted to light regime and pH in logarithmic phase.

Finally we compared cultures without supplementary aeration or stirring (standing condition, DIC limitation) and aerated cultures (bubbled with air, DIC availability).

Analytical methods

Growth was estimated as the increase in dry matter, as described by Soltani (2006). The chlorophyll content was determined spectroscopically. Cells were extracted with pure methanol for 24 hours at 4°C according to Marker (1972). Absorption spectra of the cells were recorded against appropriate culture medium blanks. Phycobiliproteins were measured according to Wyman and Fay (1986). Peak heights for Chlorophyll and phycobiliproteins were 665 and 750, 652, 615, 562 respectively. Heterocyst frequency was determined via counting at least 1500 cell each time (Fernandez-Valiente and Leganes, 1989).

Nitrogenase activity

Nitrogenase activity was determined by acetylene reduction in 15 ml aliquots of cell suspensions placed in stoppered 25 ml vials. First 10 % of the air was replaced with same volume of acetylene. In zero time and also sixty minutes after acetylene addition, 0.5 ml of samples were taken and ethylene concentration was determined in a Shimadzu GC-8 gas chromatograph. During this time the cells were incubated in same conditions as they were cultured (Soltani et al., 2006).

Photosynthesis

O₂ evolution was measured with a Clark-type O₂ electrode (Hach Chemical Company). Cells cultured in desired conditions (different light intensities and pHs) for 120 hours. Two ml aliquots of cell suspensions were placed in a temperature controlled cuvette (30°C) and illuminated with a quantum flux density of desired light intensities.

Results

We focused on three extreme representative pH values in rice fields (5,7 and 9), low irradiances ($2 \text{ uE.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) and two conditions regarding DIC availability (use of standing cultures, DIC limitation; and air-bubbled cultures, more DIC available). The effect of DIC availability is reflected in a significant increase in growth (Figure 1). It seems obvious that aeration cause higher rate of growth both in neutral and alkaline conditions. It seems interesting that this strain have a powerful DIC concentration mechanism which possibly induced at alkaline and DIC available conditions (Figure 1).

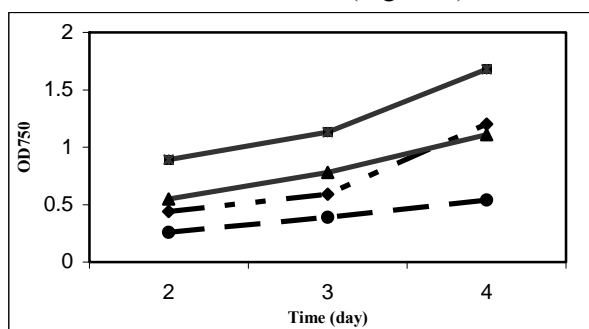


Fig 1. Growth curves of cyanobacterium *Nostoc* sp. JAH 109 at alkaline (pH9) and neutral (pH 7) conditions under DIC limitation and availability. ■ pH 9- DIC availability ▲ pH 7- DIC availability ♦ pH 9- DIC limitation ● pH 7- DIC limitation

Comparison of growth rates showed that the maximum growth rate (u_{max}) can be seen in pH9 and DIC available condition (data not shown). Figure 1. show that completely alkaline condition (pH9), although naturally inducing DIC, cause higher growth rate, the pattern of growth seems similar in both DIC available and limited conditions. In acidic condition (pH5), this strain can keep survival but growth rate decrease sharp comaring neutral and alkaline conditions. This seems considerably true at DIC limited condition (not shown).

It is well known that heterocysts are the sole sites of aerobic nitrogen fixation in heterocystous cyanobacteria and that a change in the number or quality of heterocysts clearly affects the rate of

nitrogen fixation (Fernandez-Valiente and Leganes, 1989).

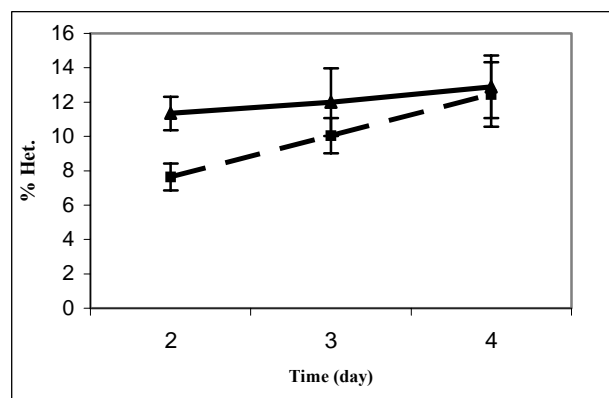


Fig 2. Heterocyst frequency changes (% Het.) of cyanobacterium *Nostoc* sp. JAH 109 at alkaline condition (pH9) under DIC limitation and availability. ■ no aeration ▲ aeration

Figure 2 showed that the heterocyst frequency differences in cultures of *Nostoc* sp. JAH 109 grown at pH9 under limited and available DIC concentration, show insignificant difference in relatively older cultures (4 day after inoculation).

Effect of irradiance and pH on chlorophyll concentration can be seen in Table 1. As shown, chlorophyll content in pH 9 was higher than pH 7 and pH 5. The difference in chlorophyll content between pH 7 and pHs 5 and 9 was significant (ANOVA, $P < 0.05$). Also there was higher chlorophyll. Content at available DIC in pH 7 and 9. This feature had not been seen in pH 5, as there was relatively weak growth of this cyanobacterium in acidic pH at variable carbon dioxide conditions.

Acidic condition (pH5) significantly decreased (ANOVA, $p < 0.05$) the total phycobiliprotein content in standing as well as air bubbled cultures (not shown). However, the availability of DIC increased the PBP content under all pH conditions (ANOVA, $p < 0.05$). The phycocyanin contents (PC) of standing and bubbled cultures were significantly higher in neutral (pH7) and alkaline (pH9) conditions. This is the same as bubbled cultures. Show that aeration cause outstanding increase in phycocyanin.

Table 1. Chl. contents ($\mu\text{g.ml}^{-1}$) in *Nostoc* sp. JAH 109

Days	PH5 (NA)	PH 5 (A)	PH 7(NA)	PH 7 (A)	PH 9(NA)	PH 9 (A)
2	0.58± 0.09	0.78±0.11	0.89± 0.07	2.34±0.17	1.56±0.16	3.78±0.71
3	0.77±0.11	0.99±0.08	0.95±0.13	3.56±0.21	2.45±0.07	6.64±0.19
4	1.4±0.08	1.23±0.34	1.56±0.05	5.78±0.91	2.23±0.08	8.12±2.11

NA: no aeration; A: aeration

Size of phycobilisomes that usually can be represented with the ratio of (PE+PC)/APC (Wyman and Fay, 1986) showed that this parameter promoted by pH 9 and DIC availability (Table 2).

The ratio of APC/Chlorophyll which is used to show the quantify relationship between photosystem II and photosystem I (Yamaka and Glazer, 1981), increased in pH 9 and DIC available condition (Table 2).

Correlation between heterocyst production and nitrogenase activity was significant ($r^2=0.92$, stagnant and $r^2=0.88$, bubbled air) until 3rd day after inoculation in both DIC limited and available conditions (Figures 3 and 4). Heterocyst production tends to outstanding higher quantity in DIC available condition (between 11-14%).

Table 2. Effect of combination of two pH values (5,7, 9) and two DIC conditions on (PC+PE)/APC and APC/Chlorophyll ratios, of *Nostoc sp.*JAH 109.

Culture conditions		(PC+PE)/APC	APC/Chla
PH	DIC		
5	NA	2.68± 0.46	0.79± 0.22
	A	2.89± 0.89	0.63± 0.08
7	NA	9.48 ± 1.44	0.79 ± 0.13
	A	7.45 ± .97	0.34 ± 0.17
9	NA	8.53 ± 1.72	0.88 ± 0.08
	A	11.73 ± 0.76	0.99 ± 0.03

NA: no aeration; A: aeration

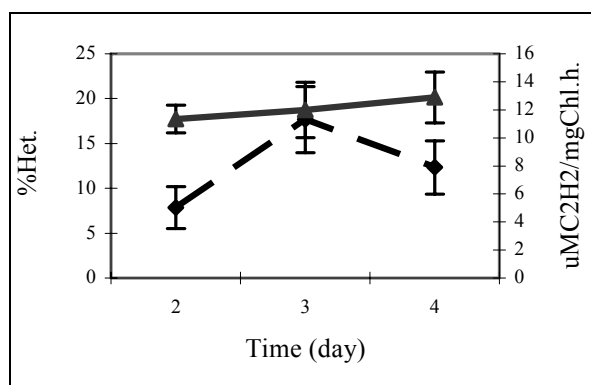


Fig 3. Nitrogenase activity and heterocyst frequency changes (%Het.) of cyanobacterium *Nostoc sp.* JAH 109 at alkaline condition (pH9) under DIC available condition. ♦ nitrogenase ▲ heterocyst

The pattern of nitrogenase activity seems more or less regular and linear at the first days after inoculation. This is interesting that this pattern is not in coincidence with growth of the strain (Figure 1). The pattern of ammonium liberation showed that the highest rate of overproduction of ammonium can be seen in the 3rd day after inoculation (data not shown). So it is logical to suppose that sharp decline in

nitrogenase activity (in the opposite of increasing heterocyst frequency) may be due to overproduction of ammonium and liberation to the medium at the 3rd day after inoculation.

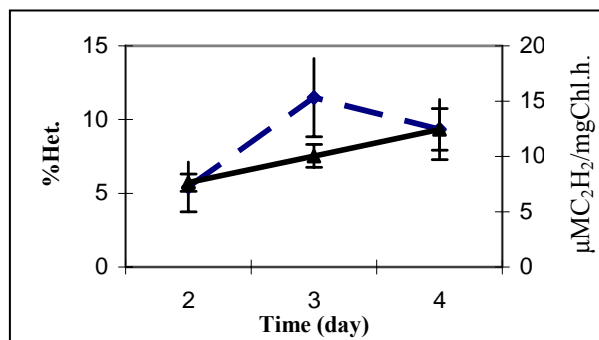


Fig 4. Nitrogenase activity and heterocyst frequency changes of cyanobacterium *Nostoc sp.* JAH 109 at alkaline condition (pH9) under DIC limitation. ♦ nitrogenase ▲ heterocyst

The combined effect of pH and DIC availability on the photosynthetic activity of the cells was also examined to analyze the functional significance of the altered pigment pattern, saturation curves of the photosynthetic net oxygen evolution were measured (Table 3). Results indicated that at pH 5 there was no clear response to variation in irradiance. The light saturated photosynthetic rate (P_{max}) and the irradiance at which photosynthesis reaches saturation (I_k), was affected by irradiance irrespective to pH in such a way that both of them increased with enhancing DIC availability, the feature was more pronounced at pH 9. As shown in table 3, α was higher in pH 9. P_{max} of cells grown at pH 9 aeration conditions were approximately four fold to the cells grown at air limited condition and same pH.

Table 3. Effect of combination of two pH values (7, 9) and two DIC condition on photosynthetic parameters of *Nostoc sp.* GAH 109. Data are means of three experiments ± SD.

pH	DIC	P_{max}	α	I_k
		$\mu\text{mol O}_2 \cdot \text{mg chl}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$		
7	NA	265.9±10.4	1.4±0.1	189.9
	A	475.3±12.8	1.7±0.1	279.6
9	NA	159.5±10.2	2.9±0.8	55
	A	709.1±28.4	4.4±0.5	161.2

Discussion

With respect to the effect of pH on dinitrogen fixation, no detailed work has been reported to our knowledge. We have weak quantity of papers about cyanobacteria of paddy-fields of Iran (Shokravi et al., 2002). Logically the

amount of researches with physiological and ecophysiological theme tend to zero (Shokravi et al., 2002; Soltani et al., 2006).

Nostoc sp. JAH 109, can be considered as an alkalophilic organism. Optimal growth rate were observed at pH 9, which seems in agreement with another strain of nostocalean cyanobacteria (*Nostoc* sp., possibly *N.ellipsosporum*) which has been isolated and characterised from rice fields of Golestan province (Khavarinejad et al., 2001). In addition Soltani (2006) reported that *Fischerella* sp. FS18, an estigonematalean cyanobacteria isolated from rice-fields of Guilan province, showed the maximum growth rate at pH 9. In Khavarinejad (2002), the strain which has been studied were not able to acclimate with acidic conditions and this seems the same for *Fischerella* sp. FS18 in Soltani (2006). *Nostoc* sp. JAH 109 in the opposite way can survive at pH 5, but of course hard metabolic problems that may be reflected on it's behavior such as very weak growth, large time dour reproduction, and very weak chlorophyll and phycoboliprotein producing ability. This is in agree with results of Amirlatifi (unpublished) data about a –possibly- same species collected from Gorgan (near Caspian sea).

DIC concentration in the flood water was almost depleted before noon early in the crop cycle, whereas substantial amounts of DIC could be measured at noon at the end of the crop cycle (Poza –Carrion et al., 2001). The amount of bicarbonate ions rises up to 98% in pH 9 (Shokravi et al., 2002). So having a bicarbonate DIC concentration mechanism seems essential in strains that survive in rice-fields. Growth patterns of *Nostoc* sp. JAH 109, showed that this strain must activate bicarbonate DIC concentrating pump that enable accumulation of bicarbonate and change to carbon dioxide which is the suitable form of inorganic carbon source for photosynthetic systems (Whitton and Paul 1988; Yu et al., 1994).

An increase in irradiance and pH resulted in a concomitant increase in the photosynthetic activity, both in standing and air bubbled cultures. These results agree with those reported in other cyanobacteria where, under saturating conditions of irradiance and DIC, cells grown at lower irradiance showed lower values of Pmax. Than cells grown at high irradiance (Poza-Carrion et al., 2001).

In air-bubbled cultures of *Nostoc* sp. JAH 109, although we observed that cells grown at

acidic condition showed slightly higher values of chlorophyll than cells grown at low DIC, the differences were not statistically significant. The effect was more pronounced in neutral (pH 7) and alkaline (pH9) conditions. In these case, especially phycocyanin contents were statistically significant comparing acidic condition (ANOVA $p < 0.05$). These results were in the opposite of *Nostoc* sp. UAM 206 which has been isolated and studied from the rice-fields of Spain (Poza – Carrion et al., 2001). In Soltani (2006), phycoerythrins were the most prominent phycobilliproteins

The availability of DIC increased the total phycobiliprotein content in in *Fischerella* sp. FS18 which seems in disagreement with our results. standing as well as air-bubbled cultures. However the availability of DIC increased the PBP contents specially at alkaline condition. There was a close parallel between the observed behavior of PC contents, with respect to external pH and availability of DIC. As the phycobilisome is mainly componed of these components, the effects of these experimental conditions were more pronounced on PC content than in PE content. With respect to DIC availability, air-bubbled cultures showed higher values of PC and PE than cells under standing condition (ANOVA $p < 0.05$). Similar results have been reported for PC in *Anacystis nidulans* (Muller et al., 1993). It seems that DIC availability cause positive effect on phycobilliproteins and especially phycocyanin production and naturally may have indirect role in irradiance adaptation (Soltani et al., 2006).

Light energy absorbed by phycobilisomes is known to be efficiently transferred to photosystem II. Transfer of energy within the phycobilisome follows the path from phycoerythrin (when present) to phycocyanin to allophycocyanin to the long-wavelength pigment (Mimuro et al., 1986). These additional pigments function as light-harvesting antennae, can exhibit a high sensitivity to variation of light quality/intensity (Reuter and Müller, 1993). In this respect the variability of phycobilisomes size and structure was examined. In *Nostoc* sp. JAH 109, PC is the main component of phycobilisomes. On the other hand total PBP, PC and APC were promoted in neutral pH. Latter feature was disagree with result of *Nostoc* sp. strain UAM206 (Poza-Carrion et al., 2001). Taking consideration to light intensity affect, data showed all pigments lower in lower DIC condition (not shown). In *Microcystis aeruginosa*,

the chlorophyll a and phycocyanin contents decreased by increasing light intensity for growth (Raps et al., 1983). Müller et al., (1993) indicated that regardless of the CO₂ concentration during growth, adaptation to 2 W/m² induces a parallel increase of the chlorophyll and phycocyanin content. The results of Poza-Carrión et al., 2001 were the same. The amounts and change of PE was relatively uncertain.

As is known, upon transfer of cells from high to low light, the size of the antenna first increases (by elongation of the phycobilisome rods), followed by an increase in the number of phycobilisomes per unit area of thylakoid membrane (Marsac and Houmard, 1993). This feature can be seen in *Microcystis aeruginosa* (Raps et al., 1983). Also this statement can explain the improvement in APC in this irradiance, because the core of phycobilisomes remains constant, and APC is a component of core.

Results of size of phycobilisomes and relation between PS II and PS I in *Nostoc sp.* JAH 109 are in disagreements of the results were reported in relation to irradiance in *Anacystis nidulans* and *Nostoc sp.* UAM206 (Poza-Carrión et al., 2001; Müller et al., 1993; Vierling and Alberte, 1980). Size of phycobilisomes are higher in pH 9 than in pH 7 and increased with DIC concentration enhancing. The relation of PSII/PSI decreased not significantly with decreasing pH. the phenomenon which was not seen in pH 7. According to different strategies of adaptation of photosynthetic apparatus by irradiance (Reuter and Müller, 1993) it seems that *Nostoc sp.* JAH 109 modulate size of the phycobilisomes, not number of them, while transfer to different pHs and inorganic carbon concentration. Anyway, it seems that the ratios of the alternations within the distinct pigments are organism-specific.

In air-bubbled cultures, DIC concentration at pH 9 is higher than pH 7 (Poza -Carrion *et al.*, 2001). Thus at pH9 under light limitation, cells probably have enough DIC to maintain the activity of the of the carboxylating activity of Rubisco and do not fully induce the carbon dioxide concentrating mechanism as has been reported in several strains of *Synechococcus* (Yu et al., 1994). This may be possibly the reason of increasing heterocyst frequency despite of decline in nitrogenase activity, which has been shown in bubbled and DIC limited conditions.

The higher photosynthetic capacity (P_{max}) per unit of chlorophyll of *Nostoc sp.* JAH109 was

resulted in higher DIC concentration and it is clearly observed in pH 9 (Table 3). These results agreed with those reported in other cyanobacteria (Vierling and Alberte, 1980). External pH also had an increasing effect on P_{max}. Cells grown in pH 9 had higher value of photosynthesis than cells grown in pH 7. Also the effect of pH 9 on I_k was clearly visible. Irrespectively to irradiance, photosynthesis could saturate at lower light intensity in cells grown in pH 9 than cells grown in pH 7. The slope of photosynthetic rate in pH 9 was higher indicating the capacity of carbon assimilation in limited irradiance. At pH 5 there was not a clear response to variation in irradiance. Different pH effects have been reported in other strains of cyanobacteria as no observed difference in P_{max} between pH7.5 and pH8.5 in *Synechococcus* PCC7942 (Yu et al., 1994). Our observation was agreed with *Nostoc sp.* UAM 205 (Fernández-Valiente and Leganés, 1989).

Acknowledgments

The authors would like to appreciate Mrs. Maliheh Rasaie and Mrs. Leila Mirkarimi for their kind collaboration in spectral studies and Dr. Farzaneh Aziz Mohseni for the identification confirmation of algal strain.

References

- Anagnostidis, K, and J. Komarek (1988)** Modern approaches to the classification of cyanobacteria.. Nostocales. Archives for hydrobiology suppl2. PP102-184
- Anand N, Radha L, Shanthakumar Hopper RS, Revathi G, Subramanian TD. (1990)** Blue-green algae as biofertilizers: certain view points on the choice of suitable isolates. In: Rajarao VN, editor. Perspective in phycology. New Delhi: Today and Tomorrow's Printer & Publisher PP. 383-391
- Boussiba, S., (1988)** *Anabaena azollae* as biofertilizer In: Algal biotechnology (ed.). Stadler, T.,J., Millon, M.C.Verdus, Y.Karamanos,H.Morvan and D.Christiaen, Elsevier applied science.
- Castenholz, RW. (2001)** General characteristics of the cyanobacteri. In: Boone D, Castenholz WR, editors. Bergey's manual of systematic bacteriology, 2nd edn, Vol 1, Newyork: Springer pp. 474-487.
- Fernández-Valiente, E., Leganés, F., (1989)** Regulatory effect of pH and incident irradiance on the levels of nitrogenase activity in the cyanobacterium *Nostoc* UAM 205. J Plant Physiol. 135:623-627.
- Kaushik BD. (1988)** Laboratory methods for blue-green algae. Associated Publishing Company

- Khavarinejad R., H. Riahi and S. Shokravi (2001)** The effect of salinity, acidity and air CO₂ on growth, heterocyst frequency and pigment composition of cyanobacterium *Nostoc sp. PTCC 1635*. *Sci. J. of Research and Planning* 14: 66-71
- Leganés F, Fernández-Valiente E. (1991)** The relationship between the availability of external CO₂ and nitrogenase activity in the cyanobacterium *Nostoc UAM205*. *J Plant Physiol* 139:135-139
- Marker AFH. (1972)** The use of acetone and methanol in the estimation of chlorophyll in the presence of phaeophytin. *Freshwater Biol.*2:361-385.
- Marsac NT, Houmard J.(1993)** Adaptation of cyanobacteria to environmental stimuli: new steps towards molecular mechanisms. *FMS Microbiology Reviews*: 104:119-190. Mimuro M, Lipschultz C, Gantt E. (1986) Energy flow in the phycobilisome core of *Nostoc sp.* (MAC): two independent terminal pigments. *Biochemica et Biophysica Acta*: 852:126-132.
- Muller C, Reuter W, Wehrmeyer W, Dau H, Senger H (1993)** Adaptation of the photosynthetic apparatus of *Anacystis nidulans* to irradiance and carbon dioxide concentration. *Bot Acta* 106:480-487
- Olvera-Ramirez, R.M., Coria-Cedillo, R.O., Canizares-Villanueva, F.M., Jeronimo, T., Ponce-Noyola, E., Rios-Leal (2000)** Growth evaluation and bioproducts characterization of *Calothrix sp.* *Bioresource Technology* 72 121-124
- Poza-Carrión C, Fernández-Valiente E, Piñas FF, Leganés F. (2001)** Acclimation to photosynthetic pigments and photosynthesis of the cyanobacterium *Nostoc sp.* strain UAM206 to combined fluctuations of irradiance, pH, and inorganic carbon availability. *J Plant Physiol.* 158:1455-1461.
- Raps S, Wyman K, Siegelman H.W, Fakowski PG. (1983)** Adaptation of the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* to light intensity. *Plant Physiol*: 72: 829-832.
- Roger PA, Kulasooriya SA.(1981).** Blue-green algae and rice. International rice Research Institute, Los Banos, laguna, Philippines
- Reuter W, Müller C. (1993)** Adaptation of the photosynthetic apparatus of cyanobacteria to light and CO₂. *J Photochem Photobiol B: Biol* 1993; 21:3-27.
- Shokravi. Sh.; F.fallahian and R.Khavarinejad (2002)** *Nostoc sp. PTCC 1635* as biofertilizer in paddy fields: growth, heterocyst frequency and pigmentation adaptation-an ecophysiological approach Proceeding of the Congress on Applied Biology, Dept. Biology, Azad university, Mashhad, Iran.
- Soltani N, Khavar-Nejad RA, Tabatabaei Yazdi M, Shokravi Sh, and Fernández-Valiente E (2005)** Screening of soil cyanobacteria for antifungal and antibacterial activity. *Pharmaceutical Biology* 43: 455-459.
- Soltani N., Khavari-Nejad R., Tabatabaie M., Shokravi Sh and Fernández-Valiente E (2006)** Variation of Nitrogenase Activity, photosynthesis and pigmentation of cyanobacterium *Fischerella sp.* FS18 under different irradiance and pH. *World Microbiol. Biotechnol.* 22 (6): 571-576
- Tabatabaei Yazdi M, Arabi H, Faramarzi MA, Ghasemi Y, Amini M, Shokravi Sh and Aziz mohseni F. (2004)** Biotransformation of hydrocortisone by a natural isolate of *Nostoc muscorum*. *Phytochemistry* 65: 2205-2209.
- Vierling E, Alberte RS. (1980)** Functional organization and plasticity of the photosynthetic unit of the cyanobacterium *Anacystis nidulans*. *Physiol Plant* .50:93-98.
- Whitton BA, Rother J, Paul A.(1988)** Ecology of deepwater rice fields in Bangladesh. 2. Chemistry of sites at Manikganj and Sonargaon. *Hydrobiologia* 169:23-30.
- Wyman M, Fay P. (1986)** Underwater light climate and the growth and pigmentation of planktonic blue-green algae (cyanobacteria). I. The influence of light quantity. *Proc R Soc Lond* 227: 367-380.
- Yu JW, Price GD, Badger MR. (1994)** Characterization of CO₂ and HCO₃⁻ uptake during steady-state photosynthesis in the cyanobacterium *Synechococcus PCC7942*. *Aust J Plant Physiol.* 21: 185-195.

بررسی برخی واکنش‌های فیزیولوژیک سیانوباکتریوم *Nostoc sp. JAH 109* به شرایط توام نور محدود، تغییر pH و DIC

شکروی، ش.^۱، امیرلطیفی، ف.^۲، صفایی، م.^۱، قاسمی، ن.^۲، سلطانی، ن.^۳

۱. گروه زیست‌شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد گرگان، گرگان، ایران
۲. گروه بیوتکنولوژی دارویی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، شیراز، ایران
۳. گروه زیست‌شناسی، پژوهشکده علوم پایه کاربردی، جهاد دانشگاهی دانشگاه شهید بهشتی، اوین، تهران، ایران

چکیده

رشد، وضعیت رنگیزه‌ای، فعالیت نیتروژنازی، تغییرات هتروسوسیست و فتوسنتز سیانوباکتریوم غالب شالیزار *Nostoc sp. JAH 109* در شرایط توام نور محدود (۲ میکرومول کوانتا در مترمربع در ثانیه)، تغییرات اسیدیته (۵.۷، ۹ pH) و تفاوت در شرایط محدودیت کربن معدنی محلول مورد بررسی قرار گرفته است. نتایج نشان می‌دهد که *Nostoc sp. JAH 109* سویه‌ای قلیا دوست می‌باشد. بیشینه نرخ رشد ویژه در شرایط pH معادل ۹ بدست می‌آید. اندازه فیکوبیلی زوم‌ها و نسبت PSII به PSI در شرایط ۹ pH و عدم محدودیت DIC مشاهده می‌گردد. سویه در شرایط اسیدی قادر به رشد مطلوب نیست، اما شرایط خنثی همانند شرایط قلیایی احتمالاً سبب فعال شدن سیستم مربوط به مکانیسم تراکمی دی‌اکسید کربن می‌گردد. الگوی فعالیت نیتروژنازی کمابیش در روزهای نخست پس از تلقیح منظم و خطی است. بیشترین میزان تثبیت نیتروژن در شرایط ۹ pH و عدم محدودیت DIC مشاهده می‌گردد. این امر در مورد الگوی نوسان فرکانس هتروسوسیست نیز صدق می‌نماید. بیشینه ظرفیت فتوسنتزی (Pmax) در واحد کلروفیل در شرایط DIC بدون محدودیت و به طور مشخص در شرایط قلیایی مشاهده گردیده است.

واژه‌های کلیدی: سیانوباکتریوم، غلظت کربن معدنی، فتوسنتز، فیکوبیلی پروتئین، نیتروژناز، اسیدیته