نشریه علمی ـ پژوهشی اکوفیزیولوژی گیاهان زراعی، جلد دهم، شماره ۱(۳۷)، بهار ۱۳۹۵، صفحه ۸۸-۷۳

تغییرات صفات مورفولوژیک و فیزیولوژیک شاهدانه (*Cannabis sativa* L.) متاثر از پرایمینگ بذر با فولیک اسید و پراکسید هیدروژن

شیرین کربلای قلیزاده[۱]، تورج میرمحمودی[۱*] و نبی خلیلی اقدم[۲]

تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۹/۱۸ تاریخ بازنگری: ۱۳۹۴/۷/۱۴ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۱۱/۲۷

چکیده

به منظور بررسی اثر پرایمینگ بذور شاهدانه با فولیک اسید و پراکسید هیدروژن بر برخی صفات مورفولوژیک و فیزیولوژیک، آزمایشی در گلخانه دانشگاه آزاد اسلامی واحد مهاباد اجرا گردید. فاکتورهای آزمایشی شامل پراکسید هیدروژن در پنج سطح (صفر، ۷/۵، ۱۵، ۲۲/۵، ۳۰ میلی‌مول در لیتر) و فاکتور دوم فولیک اسید در پنج سطح (صفر، ۵، ۱۰، ۲۰، ۲۷ میلی‌مول در لیتر) بودند که به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی در چهار تکرار اجرا شد. به منظور پیش‌تیمار کردن بذرها پس از تهیه محلول‌های مورد نظر، بذر شاهدانه به مدت ۲۴ ساعت در اسید فولیک و ۶ ساعت در پراکسید هیدروژن به‌صورت غوطه‌ور قرار گرفتند. در این مطالعه صفات کلروفیل a، b، کلروفیل کل، محتوی نسبی آب، ارتفاع بوته، طول ریشه، ضریب آلومتری، وزن تر و خشک بوته اندازه‌گیری شدند. نتایج تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که اثر پراکسید هیدروژن و اسید فولیک بر کلیه صفات مورد بررسی معنی‌دار بود، اما اثر متقابل بین دو تیمار تنها بر صفات محتوی نسبی آب و ضریب آلومتری معنی‌دار گردید. پرایمینگ بذر با سطح ۱۵ میلی‌مول در لیتر پراکسید هیدروژن و ۵ میلی‌مول در لیتر اسید فولیک بالاترین مقدار کلروفیل a، کلروفیل b، کلروفیل کل، ارتفاع ساقه، طول ریشه و وزن تر و خشک بوته را به خود اختصاص دادند. افزایش سطح پراکسید هیدروژن بیشتر از ۱۵ میلی‌مول در لیتر، اثر منفی بر کلیه صفات مورد مطالعه نشان داد. همچنین، ترکیب تیماری ۱۵ میلی‌مول در لیتر پراکسید هیدروژن و ۵ و۱۰ میلی‌مول اسید فولیک در مقایسه با دیگر تیمارها بالاترین محتوی نسبی آب و ضریب آلومتری را به خود اختصاص دادند. بنابراین، با توجه به نتایج مطالعه حاضر، پرایمینگ بذر با سطح ۱۵ میلی‌مول در لیتر پراکسید هیدروژن و ۵ میلی‌مول در لیتر اسید فولیک جهت حصول صفات مطلوب مورفولوژیک و فیزیولوژیک شاهدانه در شرایط این آزمایش مناسب می‌باشد.

واژگان کلیدی: اسید فولیک، پراکسید هیدروژن، پرایمینگ بذر، شاهدانه.

۱- گروه زراعت و اصلاح نباتات، واحد مهاباد، دانشگاه آزاد اسلامی، مهاباد، ایران.
۲- استادیار گروه کشاورزی، دانشگاه پیام نور، سقز، ایران
(* نگارنده‌ی مسئول) Toraj73@yahoo.com

مقدمه

شاهدانه (*Cannabis sativa* L.) گیاهی دو پایه و یک ساله از راسته اورتیکال و تیره کانابیسه است، این گیاه برگ‌های پنجه‌ای با پنج تا هفت برگچه دندانه‌دار دارد. از گیاه شاهدانه، استفاده‌های زیادی در زمینه دارویی می‌شود. کانابینوییدها ترکیبات ترپنوفنولیک هستند که تنها در جنس شاهدانه شناسایی شده‌اند. بیش از شصت کانابینویید در گیاه شاهدانه شناسایی شده است. از کانابینوییدهای اصلی می‌توان‌کانابیجرول (CBG)، دلتا۹ تتراهیدروکانابینول (THC)، کانابینول (CBN)، کانابیدیول (CBD) و کانابیکروم (CBC) را نام برد (Yoshimatsu and Kitazawa, 2004). از بین این ترکیبات، بیشترین اثرات دارویی شناخته شده مربوط به THC می‌باشد (Croxford and Yamamura, 2005; Guzman, 2003; Howlett *et al*., 2004). اسید فولیک یا ویتامین B_9 از یک هسته پتریدینی که با یک بنیان متیلنی به گروه‌های اسید پاراآمینوبنزوئیک و اسید گلوتامیک متصل می‌گردد، تشکیل شده است (Bermingham, 2002). تتراهیدروفولات فرم فعال و کوآنزیمی این ویتامین می‌باشد که در انتقال بنیان-های تک کربنی و تبدیل آنها به یکدیگر نقش دارد. به عنوان مثال می‌توان به انتقال بنیان تک کربنی متیل و تبدیل هموسیستئین به متیونین و دزوکسی یوریدین مونوفسفات به دزوکسی تیمیدین مونوفسفات اشاره نمود (Heldt, 2005). متیونین اولین اسید آمینه‌ای است که در بیوسنتز پروتئین در زنجیره پلی‌پپتیدی قرار می‌گیرد. به علاوه، تیمیدین مونوفسفات نوکلئوتیدی است که در ساختار DNA بکار می‌رود (Stimola, 2011). لذا برآیند عوامل با کاهش بیوسنتز پروتئین و تکثیر DNA سبب کاهش رشد گیاهچه می‌گردد(Taiz and Zeiger, 2010). هیدرولیز آنزیمی ذخایر بذر و تولید سلول‌های ساختاری با استفاده از این ذخایر دو فرآیند متابولیک متـاثر از پرایمینگ بـذر با اسید فولیک می‌باشند که بر استقرار گیاهچه‌ها و جوانه‌زنی بذر گندم (Burguieres *et al*., 2007) همانند سایر گیاهان اثر می‌گذارند. در زمان جوانه‌زنی، اسید جیبرلیک پس از سنتز از اسکاتلوم (لپه) به سمت لایه آلورن حرکت و سبب فعال شدن آنزیم‌های هیدرولیتیک نظیر آمیلازها، فسفاتازها و نوکلئازها می‌گردد. این آنزیم‌ها ذخایر بذر را هیدرولیز می‌نمایند به‌طوری‌که زیر واحدهای ساختاری آنها در رشد گیاهچه‌ها مصرف می‌شود. بدین ترتیب، در اثر هیدرولیز آنزیمی و انجام تنفس پیوسته از وزن خشک بذور کاسته می‌شود (Soltani *et al*., 2006). پرایمینگ توسط اسید فولیک می‌تواند به عنوان یک منبع جدید مهم از ترکیبات پلی فنلی ضد سرطانی در گیاه شاهدانه و دانه‌های روغنی این گیاه دارویی مؤثر واقع شود (Murillo rodrigues, 2008). پراکسید هیدروژن تا حد زیادی به‌عنوان یک محرک جوانه‌زنی استفاده شده است. پراکسید هیدروژن باعث اثر مثبت بر جوانه‌زنی بذر شده و مهار H_2O_2 منجر به تولید O_2 در دستگاه میتوکندری و فعالیت‌های سوخت و سازی می‌شود (Katzman *et al*., 2001). پراکسید هیدروژن یک فرآیند حیاتی در سوخت و ساز و هموستازی موجودات هوازی می‌باشد (Bienert *et al*., 2006). در گیاهان، پراکسید هیدروژن یکی از بزرگ‌ترین و پایدارترین ROSها و تنظیم کننده فرآیندهای اساسی مانند دفاع و توسعه می‌باشد (Selsak *et al*., 2007). پیش تیمار بذر با پراکسید هیدروژن باعث افزایش جوانه‌زنی (Amjad *et al*., 2004)، درصد ظهور ساقه، افزایش طول ساقه و ریشه‌چه و وزن تر می‌شود (Cavusoglu and Kabar, 2010). با توجه به بررسی و مطالعات اندک پرایمینگ اسید فولیک و پراکسید

هیدروژن، پژوهشی در رابطه با اثرات فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی، گیاه شاهدانه تحت پرایمینگ با اسید فولیک و پراکسید هیدروژن انجام گرفت.

مواد و روش‌ها

به منظور بررسی اثرات پراکسید هیدروژن و فولیک اسید بر پارامترهای مورفوفیزیولوژیک در شاهدانه، آزمایشی به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۴ تکرار در سال ۱۳۹۳ در گلخانه تحقیقاتی دانشگاه آزاد اسلامی واحد مهاباد اجرا گردید. محل انجام آزمایش از نظر موقعیت جغرافیایی بین ۳۵ درجه و ۵۸ دقیقه تا ۳۹ درجه و ۴۷ دقیقه عرض شمالی (از خط استوا) و ۴۴ درجه و ۳ دقیقه تا ۴۷ درجه و ۲۳ دقیقه طول از نصف النهار گرینویچ و ارتفاع ۱۳۵۸ متر از سطح دریا می‌باشد. دمای روزانه گلخانه ۳±۳۳، دمای شبانه ۳±۱۴ درجه سلسیوس و رطوبت آن ۲۵- ۸۰ درصد، EC=0.73 محلول خاک و خلل و فرج خاک ۳۷٪ بود. گلخانه دارای پوشش پلی‌اتیلن بود. تیمارهای مورد مطالعه، پرایمینگ پراکسید هیدروژن در پنج سطح: (صفر(شاهد، آب مقطر)، ۷/۵، ۱۵، ۲۲/۵، ۳۰) میلی‌مول در لیتر و فولیک اسید نیز در پنج سطح: (صفر (شاهد، آب مقطر)، ۵، ۱۰، ۲۰، ۲۷) میلی‌مول در لیتر بودند. به منظور پرایمینگ بذرها پس از تهیه محلول‌های مورد نظر، بذر شاهدانه به مدت ۲۴ ساعت در اسید فولیک و ۶ ساعت در پراکسید هیدروژن غوطه‌ور و سپس در گلدانهای پلاستیکی با (حجمی ۲ لیتری)، حاوی خاک لومی رسی، در عمق یک سانتی‌متر کاشت شدند. بعد از کشت بذور در گلدان‌ها، هر ۲۴ ساعت یک بار جوانه‌زدن بذور کنترل و یادداشت برداری گردید و هر ۴۸ ساعت یک بار به میزان ۲۰۰ سی‌سی آب به هر گلدان داده شد. پس از سبز شدن و در مرحله ۸ برگی صفات زیر اندازه‌گیری و محاسبه گردید.

اندازه‌گیری مقدار رنگیزه‌های فتوسنتزی شامل کلروفیل a، b، کلروفیل کل و کاروتنوئیدها (کاروتنوئید و گزانتوفیل) با استفاده از روش لیشتنتالر (Lichtenthaler, 1987) انجام پذیرفت. ۰/۲ گرم از برگ¬های فریز شده انتهای گیاه با ۱۵ میلی‌لیتر استن ۸۰ درصد سائیده شده و پس از صاف کردن جذب آنها با اسپکتروفتومتردر طول موج‌های ۶۴۶/۸، ۶۶۳/۲۰ و ۴۷۰ نانومتر خوانده شد و غلظت رنگیزه‌ها بر حسب میکروگرم بر گرم وزن تر از روابط زیر محاسبه گردید (Lichtenthaler, 1987).

$$Chla = 12.25\ A663.2 - 2.79\ A646.8$$
$$Chlb = 21.21\ A646.8 - 5.1\ A663.2$$
$$Chl\ a+b = 7.15\ A663.2 + 18.71\ A646.8$$

برای تعیین محتوای نسبی آب (RWC)، ۴ تا ۵ قطعه از برگ تازه به قطر ۱ سانتی‌متر برش و توزین شدند (FW)، سپس نمونه‌ها در پتری‌دیش همراه مقداری آب به مدت ۴ ساعت در انکوباتور در دمای ۴ درجه سلسیوس قرار داده شده و مجدداً نمونه‌ها توزین شدند (TW). در انتها نمونه‌ها به مدت ۷۲ ساعت در آون در دمای ۷۲ درجه سلسیوس قرار داده و مجدداً توزین گردیدند (DW). در پایان با استفاده از فرمول زیر محتوای نسبی آب برگ محاسبه گردید (Ritchi *et al*., 1990).

$$RWC = (FW-DW/TW-DW)\times 100$$

پس ازمحاسبه طول ریشه (Lr) و طول ساقه (Ls) ضریب آلومتری (CA) از رابطه زیر محاسبه شد (Khvazh, 1999).

$$CA = Lr/Ls$$

در پایان آزمایش‌های گلخانه‌ای (مرحله ۸ برگی) بوته‌های موجود به همراه ریشه از گلدان خارج و پس از آن اندام های هوایی و ریشه از هم جدا و وزن تر بوته اندازه‌گیری و پس از آن، با خشک کردن بوته در دمای ۷۰ درجه سلسیوس در آون، وزن

خشک بوته، با دقت ۰/۰۰۱ بر حسب گرم اندازه‌گیری و محاسبه گردید. داده‌های حاصل با نرم‌افزار SAS 9.2 تجزیه و مقایسات میانگین، با آزمون دانکن در سطح احتمال ۵٪ انجام و شکل‌ها توسط نرم‌افزار Excel 2013 رسم گردید.

نتایج و بحث

کلروفیل a: بر اساس نتایج جدول تجزیه واریانس داده‌ها اثر سطوح پراکسیدهیدروژن و اسید فولیک در سطح احتمال ۱ درصد بر میزان کلروفیل a معنی¬دار بود (جدول ۱). مقایسه میانگین تیمارها از لحاظ اثر پراکسید هیدروژن بر میزان کلروفیل a نشان داد سطح ۱۵ میلی مول در لیتر پراکسید هیدروژن بالاترین مقدار کلروفیل a را به خود اختصاص داد. بین دیگر سطوح از نظر اثر بر کلروفیل a اختلاف معنی‌داری وجود نداشت (شکل ۱). پراکسید هیدروژن در گیاهان، می‌تواند نقشی دوگانه داشته باشد، به‌طوری‌که این ترکیب در غلظت‌های پایین به‌عنوان یک پیام حد واسط جهت تولید سالیسیلیک اسید و اتیلن عمل می‌نماید که سبب تطابق بیشتر با شرایط تنش‌زا می‌شود (Hu *et al.*, 2009)، اما پراکسید هیدروژن در غلظت‌های بالا تخریب بافت و نهایتاً مرگ گیاه را به دنبال دارد (Villa-Castorena *et al.*, 2003). بنابراین، در مطالعه حاضر می‌توان اظهار داشت پراکسید هیدروژن تا سطح ۱۵ میلی مول دارای نقش مثبت در سنتز کلروفیل برگ داشته است. در بین تیمارهای اسید فولیک ۵ و ۱۰ میلی‌مول بر لیتر بالاترین و سطح ۲۷ میلی‌مول بر لیتر کمترین مقدار کلروفیل a را به خود اختصاص دادند بنابراین، می‌توان اظهار داشت در مطالعه حاضر پیش تیمار بذر با اسید فولیک اثر دو جانبه‌ای بر میزان کلروفیل برگ نشان داده است به‌ترتیبی که افزایش سطح اسید فولیک تا ۱۰ میلی‌مول موجب افزایش کلروفیل a شده اما با افزایش غلظت پیش تیمار مذکور به ۲۰ و ۲۷ به صورت معنی‌داری از میزان صفت مذکور کاسته شد (شکل ۲).

کلروفیل b: بین سطوح پراکسید هیدرژن و اسید فولیک از لحاظ اثر بر مقدار کلروفیل b در سطح احتمال ۱ درصد اختلاف معنی‌دار بود (جدول ۱). مقایسه میانگین سطوح پراکسید هیدروژن از لحاظ اثر بر مقدار کلروفیل b برگ نشان داد پیش تیمار بذر اثر مثبتی بر مقدار کلروفیل b تا سطح ۲۲/۵ میلی‌مول بر لیتر دارد. در این مطالعه سطح ۱۵ میلی‌مول بالاترین مقدار کلرفیل b را به خود اختصاص داد (شکل ۳). بالا بودن محتوی کلروفیل را در تیمار ۱۵ میلی مول در لیتر پر اکسید هیدروژن احتمالاً به نقش ماده مذکور در جلوگیری از کاهش فتوسنتز و محتوای کلروفیل گیاهان نسبت داد (Moskova *et al.*, 2007). کیچوا و همکاران (Gecheva *et al.*, 2002) و موسکوا و همکاران (Moskova *et al.*, 2007) به نقش مثبت پراکسید هیدروژن در افزایش مقدار کلروفیل برگ اشاره کردند. در بین سطوح اسید فولیک، سطوح ۵ و ۱۰ میلی‌مول بر لیتر بالاترین و سطوح شاهد و ۲۷ میلی‌مول پایین‌ترین مقدار کلروفیل b را به خود اختصاص دادند (شکل ۴). بالا بودن مقدار کلروفیل b را در سطوح ۱۰ و ۱۵ میلی مول در لیتر را می توان به نقش اسید فولبک در فرآیند رونویسی و ترجمه ژن های مرتبط با سنتز کلروفیل نسبت داد. ملکی و همکاران (Maleki *et al.*, 2011) دریافتند اسید فولیک نقش مثبتی در افزایش مقدار کلروفیل برگ دارد.

کلروفیل کل: بر اساس نتایج جدول تجزیه واریانس داده‌ها اثر پراکسید هیدروژن و اسید فولیک در سطح احتمال ۱ درصد بر مقدار کلروفیل کل معنی‌دار بود (جدول ۱). مقایسه میانگین سطوح پراکسید هیدروژن نشان داد سطوح ۱۵ میلی‌مول بر

لیتر و شاهد به‌ترتیب بالاترین و پایین ترین مقدار کلروفیل برگ را به خود اختصاص دادند (شکل ۵). گلدانی و کمالی (Goldani and Kamali, 2011) گزارش کردند با کاربرد برگی پراکسید هیدروژن، بر محتوای رنگدانه‌های گیاه افزوده شد، به گونه‌ای که در غلظت ۵ میلی‌مولار پرکسید هیدروژن محتوای کلروفیل کل برگ گیاه گل تکمه‌ای با ۱۸ درصد افزایش نسبت به شاهد به بالاترین مقدار خود رسید. اگرچه علت دقیق نقش محافظتی غلظت‌های پایین پراکسید هیدروژن هنوز به خوبی روشن نشده است، اما مشخص گردیده است که پیش تیمار پراکسید هیدروژن سبب جلوگیری از کاهش فتوسنتز و محتوای کلروفیل گیاهانی شده است که با علف‌کش پاراکوآت تیمار شده‌اند (Moskova *et al*., 2007) در مقابل و مخالف با نتایج به‌دست آمده در این آزمایش، گزارش‌هایی مبنی بر کاهش محتوای کلروفیل گیاهان، در اثر تیمار با پراکسید هیدروژن ارایه شده است (Upadhyaya *et al*., 2007). در بین سطوح اسید فولیک مشاهده شد دو سطح ۵ و ۱۰ میلی‌مول بر لیتر بالاترین و سطح ۲۷ میلی‌مول بر لیتر پایین‌ترین مقدار کلروفیل کل برگ را به خود اختصاص دادند (شکل ۶). یکی از مهم‌ترین وظایفی که به اسید فولیک نسبت داده‌اند نقش آنزیمی در همانندسازی DNA و سنتز پروتئین است. به نظر می‌رسد در مطالعه حاضر پرایمینگ بذر با اسید فولیک در دو سطح ۵ و ۱۰ میلی‌مول نقش مهمی در تحریک رونویسی ژن‌های مرتبط با سنتز کلروفیل داشته باشد. ملکی و همکاران (Maleki *et al*., 2011) اظهار داشتند کاربرد اسید فولیک موجب بهبود خصوصیات رشدی در گیاه لوبیا شد.

محتوای نسبی آب RWC: بر اساس نتایج جدول تجزیه واریانس داده‌ها در تحقیق حاضر اثر سطوح پراکسیدهیدروژن، اسید فولیک و اثر متقابل دو تیمار در سطح احتمال ۱ درصد بر صفت محتوای نسبی آب معنی‌دار بود. نتایج مقایسه میانگین ترکیبات تیماری پراکسید هیدروژن و اسید فولیک از لحاظ اثر بر محتوی نسبی آب نشان داد سطح ۱۵ میلی‌مول بر لیتر پراکسید هیدروژن در ترکیب با هر پنج سطح اسید فولیک بالاترین و سطح شاهد پراکسید هیدروژن کمترین محتوی نسبی آب را به خود اختصاص دادند، همچنین، سطح ۱۰ میلی‌مول اسید فولیک در ترکیب با هر پنج سطح پراکسید هیدروژن از بالاترین محتوی نسبی آب در مقایسه با ترکیب شاهد هر دو تیمار برخوردار بود (شکل ۷). پراکسید هیدروژن باعث بهبود تعادل آبی برگ از طریق القای سیستم آنتی‌اکسیدانی و حفظ آماس سلولی می‌گردد (Xing *et al*., 2004). هی و همکاران (He *et al*., 2009) گزارش کردند پیش تیمار بذر گندم با پراکسید هیدروژن منجر به کاهش آسیب غشای سلولی ناشی از تنش خشکی می‌شود. گزارش‌هایی حاکی از بهبود رفتار جوانه‌زنی و شاخص‌های مربوط به آن اعم از متوسط زمان جوانه‌زنی، بنیه بذر، طول ریشه، طول ساقه‌چه، نرخ جوانه‌زنی و استقرار اولیه در بذور پرایم شده می‌باشد (Murugu *et al*., 2004). علت تسریع جوانه‌زنی در بذور پرایم شده می‌تواند ناشی از افزایش فعالیت آنزیم‌های تجزیه کننده مثل آلفا- آمیلاز، افزایش سطح شارژ انرژی زیستی در قالب افزایش مقدار ATP، افزایش سنتز RNA و DNA، افزایش تعداد و در عین حال ارتقای عملکرد میتوکندری‌ها باشد (Afzal *et al*., 2002).

ارتفاع ساقه: بر اساس نتایج جدول تجزیه واریانس داده‌ها، اختلاف بین سطوح پراکسید هیدروژن و اسید فولیک از لحاظ اثر ارتفاع ساقه در سطح احتمال ۱ درصد معنی‌دار بود (جدول ۱). در تحقیق حاضر سطوح ۱۵ و ۲۲/۵ میلی‌مول بر لیتر

پراکسید هیدروژن به‌ترتیب با متوسط ۳۹/۱۱ و ۳۸/۲۰ سانتی‌متر بالاترین ارتفاع بوته را به خود اختصاص دادند. سطح شاهد (عدم پیش‌تیمار با پراکسید هیدروژن) نیز با متوسط ۳۰/۲۳ سانتی‌متر کمترین ارتفاع بوته را به خود اختصاص داد. لازم به ذکر است که بین تیمار مذکور و تیمارهای ۷/۵ و ۳۰ میلی‌مول بر لیتر از لحاظ آماری اختلاف معنی‌داری وجود نداشت (شکل ۸). مقایسه میانگین اثر سطوح اسید فولیک بر ارتفاع بوته نشان داد سطح ۵ میلی‌مول بر لیتر اسید فولیک با متوسط ۴۱/۱۲ سانتی‌متر بالاترین و سطح شاهد (عدم پیش‌تیمار بذر) با متوسط ۳۱/۲۱ سانتی‌متر کمترین ارتفاع بوته را به خود اختصاص دادند (شکل ۹). از تأثیرات عمده پرایمینگ بذر می‌توان به تأثیر بر جوانه‌زنی و استقرار اولیه گیاهچه، افزایش وزن خشک ریشه‌چه و ساقه‌چه، افزایش سرعت و درصد جوانه‌زنی اشاره کرد. گزارش‌هایی زیادی حاکی از بهبود رفتار جوانه‌زنی و شاخص‌های مربوط به آن اعم از متوسط، طول ریشه، طول ساقه‌چه، نرخ جوانه‌زنی و استقرار اولیه در بذور پرایم شده می‌باشد (Lee and Kim, 2000).

طول ریشه: در تحقیق حاضر اثر پراکسید هیدروژن و اسید فولیک در سطح احتمال ۱ درصد بر طول ریشه معنی‌دار بود (جدول ۱). مقایسه میانگین سطوح پراکسید هیدروژن از لحاظ اثر بر طول ریشه حاکی از آن بود که با افزایش غلظت پراکسید هیدروژن تا سطح ۱۵ میلی‌مول بر لیتر بر طول ریشه افزوده شد اما افزایش سطح پراکسید هیدروژن از ۱۵ میلی‌مول بر لیتر موجب کاهش طول ریشه شد (شکل ۱۰). هانگ و همکاران (Hung *et al*., 2005) بیان کردند فرم بیولوژیک فعال پراکسید هیدروژن در هنگام تنش به صورت یک مولکول سیگنال در گیاه عمل می‌کند که در شرایط تنش به‌طور مستقیم در تولید آنتی اکسیدانت‌ها دخالت داشته و سبب بروز مقاومت می‌شود. کاتیرسان (Kathiresan, 2006) گزارش کرد تیماردهی بذور با پراکسید هیدروژن باعث افزایش فوق‌العاده مقاومت به صورت همزمان در برابر تنش‌های حرارتی، شوری، سرما و خشکی شد و همچنین در هنگام جوانه‌زنی سرعت ودرصد جوانه‌زنی ذرت را افزایش داد (Gong *et al*., 2001). چاووش‌اوغلو و کبار (Cavussoglu and Kabar, 2010) گزارش نمودند پیش‌تیمار بذر گیاه جو با پراکسید هیدورژن باعث افزایش طول ریشه‌چه و ساقه‌چه نسبت به تیمار شاهد شد. همچنین، وزن تر گیاهچه در بذور تیمار شده با پراکسید هیدروژن نسبت به بذور شاهد افزایش پیدا کرد. بر اساس نتایج مقایسه میانگین تیمارها در بین سطوح اسید فولیک سطح ۵ میلی‌مول با متوسط ۴۴/۲۳ سانتی‌متر بیشترین و سطح شاهد با متوسط ۳۷/۳۹ سانتی‌متر کمترین طول ریشه را به خود اختصاص دادند. لازم به ذکر است که بین سطح شاهد و سطوح ۲۰ و ۲۷ میلی‌مول از لحاظ طول ریشه اختلاف معنی‌داری وجود نداشت (شکل ۱۱). اسید فولیک به عنوان یک جاذب تنش عمل می‌کند بنابراین، افزایش طول ریشه در بذور تیمار شده با اسید فولیک را می‌توان به نقش این ماده در تعدیل pH و همچنین کاهش تنش‌های محیطی نسبت داد (Burguieres *et al*., 2007). جوادی و همکاران (Javadi *et al*., 2013) در بررسی تاثیر اسید فولیک (ویتامین B9) بر شاخص‌های جوانه‌زنی گندم نان گزارش نمودند کاربرد اسید فولیک اثر معنی‌داری در افزایش طول ریشه‌چه و ساقه‌چه گندم داشت.

ضریب آلومتری: بر اساس نتایج جدول تجزیه واریانس داده‌ها اثرات پراکسید هیدروژن، اسید فولیک در سطح احتمال ۱ درصد و اثر متقابل دو فاکتور در سطح احتمال ۵ درصد بر ضریب آلومتری معنی‌دار بود (جدول ۱). در مطالعه حاضر سطوح

۱۰ و ۲۰ میلی‌مول اسید فولیک همراه در ترکیب با سطح ۱۵ میلی‌مول بر لیتر بیشترین ضریب آلومتری را به خود اختصاص دادند. کمترین مقدار ضریب مذکور نیز به ترکیب شاهد هر دو تیمار (عدم کاربرد اسید فولیک و پراکسید هیدروژن) و سطح ۷/۵ پراکسید هیدروژن و شاهد اسید فولیک اختصاص داشت (شکل ۱۲). در بذور پرایم شده، پاره‌ای تغییرات متابولیکی و بیوشیمیایی به نفع جوانه‌زنی تحقق می‌یابد برای مثال در این بذور بخشی از پروتئین‌ها و کربوهیدرات‌ها در اثر آنزیم‌ها و واکنش-های هیدرولیز کننده شکسته شده و آماده شرکت در فرایند جوانه‌زنی می‌شوند. همچنین، عملکرد و ساختار غشای سلولی در بذور پرایم شده در مقایسه با بذور شاهد در وضعیت مطلوب‌تری می‌باشد. این امر در مورد بذور پرایم شده ذرت شیرین، چغندرقند، آلو، تربچه، گندم و جو به اثبات رسیده است، این موضوع نیز می‌تواند یک توجیه مناسب برای جوانه‌زنی مطلوب‌تر در بذور تیمار شده باشد (Pill and Necker, 2001).

وزن خشک گیاه: نتـایج تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد بین سطوح پراکسید هیدروژن و اسید فولیک از لحاظ اثر بر وزن خشک گیاه اختلاف در سطح ۱ درصد آماری معنی‌دار بود (جدول ۱). مقایسه میانگین سطوح پراکسید هیدروژن نشان داد که سطوح ۱۵ و ۷/۵ میلی‌مول بر لیتر به‌ترتیب با متوسط ۲۴/۶۲ و ۱۸/۰۲ گرم بیشترین و کمترین وزن خشک گیاه را به خود اختصاص دادند. لازم به ذکر است که بین سطح ۷/۵ میلی‌مول و سطح شاهد و ۳۰ میلی‌مول از لحاظ اماری اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد (شکل ۱۳). سلساک و همکاران (Selsak *et al*., 2007)، گلدانی و کمالی (Goldani and Kamali., 2011) و چاووش اوغلو و کبار (Cavussoglu and Kabar, 2010) گزارش نمودند کاربرد خارجی پراکسید هیدروژن موجب افزایش وزن خشک در گیاهان مورد آزمایش شد. در بین سطوح اسید فولیـک سطـوح ۵ و ۳۰ میلی‌مـــول بر لیتـر به‌ترتیب با متوسط ۲۲/۵۲ و ۱۶/۹۷ گرم به‌ترتیب بالاترین و پایین‌ترین وزن خشک گیاه را به خود اختصاص دادند (شکل ۱۴). اسید فولیک یک تامپون طبیعی و کلات کننده مناسب با قدرت تبادل یونی بالاست که قدرت جذب عناصر معدنی را در گیاهان افزایش می‌دهد و نیز باعث افزایش کیفیت و کمیت محصول می‌گردد (Burguieres *et al*., 2007). جوادی و همکاران (Javadi *et al*., 2013) گزارش کردند تیمار اسید فولیـک در گنـــدم به صورت معنی‌داری وزن تر و خشک بوته گندم را افزایش داد که همسو با نتایج مطالعه حاضر است.

نتیجه‌گیری کلی

در تحقیق حاضر پرایمینگ بذر با سطح ۱۵ میلی‌مول در لیتر پراکسید هیدروژن و ۵ میلی‌مول در لیتر اسید فولیک، بالاترین مقدار کلروفیل a، کلروفیل b، کلروفیل کل، ارتفاع ساقه، طول ریشه، وزن تر و وزن خشک گیاه را به خود اختصاص داد. افزایش سطح پراکسید هیدروژن از ۱۵ میلی‌مول در لیتر، اثر منفی بر کلیه صفات مورد مطالعه نشان داد. همچنین، ترکیب تیماری ۱۵ میلی‌مول در لیتر پراکسید هیدروژن و ۱۰ میلی‌مول اسید فولیک در مقایسه با دیگر تیمارها بالاترین محتوی نسبی آب و ضریب آلومتری را به خود اختصاص دادند. بنابراین، پرایمینگ بذر با سطح ۱۵ میلی‌مول در لیتر پراکسید هیدروژن و ۵ میلی‌مول در لیتر اسید فولیک منجر به عکس‌العمل بهتر صفات مورفولوژیک و فیزیولوژیک بررسی شده در این تحقیق گردید.

جدول ۱- تجزیه واریانس صفات مورد بررسی شاهدانه متاثر از پرایمینگ پراکسید هیدروژن و اسید فولیک

Table 1- Analysis of variance for studied traits in cannabis by priming with folic acid and hydrogen peroxide

منابع تغییر S.O.V	درجه آزادی df	میانگین مربعات Mean Square			
		کلروفیل a Chlorophyll a	کلروفیلb Chlorophyll b	کلروفیل کل chlorophyll Total	محتوای نسبی آب RWC
پراکسید هیدروژن Hydrogen peroxide	4	40.29**	11.32**	1.58**	176.49**
اسید فولیک Folic acid	4	35.62**	8.75**	1.17**	198.21**
پراکسید هیدروژن × اسید فولیک × Hydrogen peroxide folic acid	16	11.75ns	3.54ns	0.08 ns	211.47**
اشتباه آزمایشی Error	75	8.12	2.14	0.18	39.11**
ضریب تغییرات CV%		5.18	6.16	11.31	11.21

ns، * و ** به ترتیب عدم معنی‌دار و معنی‌دار در سطح احتمال ۵ و ۱ درصد

ns, * and **, no significant and statistically significant at 5 and 1% probability level, respectively

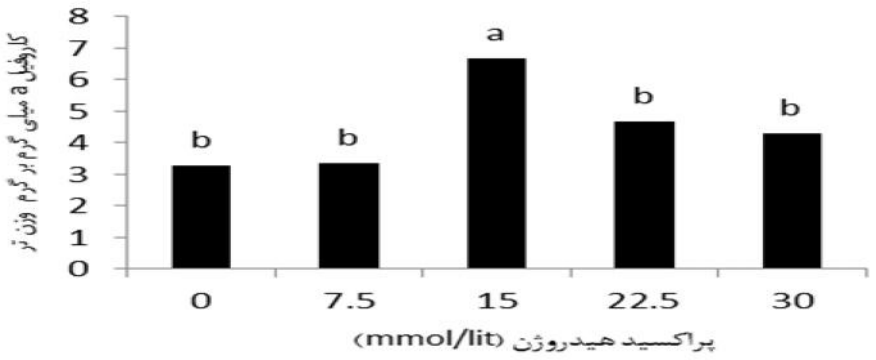
ادامه جدول ۱

Table 1- Continued

منابع تغییر S.O.V	درجه آزادی df	میانگین مربعات Mean Square				
		ارتفاع ساقه Stem Height	طول ریشه root lenth	ضریب آلومتری Allometric coefficient	وزن تر بوته Plant fresh weight	وزن خشک بوته Plant dry weight
پراکسید هیدروژن Hydrogen peroxide	4	355.12**	225.11**	0.92**	339.6**	125.62**
اسید فولیک Folic acid	4	218.08 **	276.11**	0.98**	228.4**	182.22**
پراکسید هیدروژن × اسید فولیک × Hydrogen peroxide folic acid	16	35.9ns	55.39ns	0. 62*	48.9ns	34.4 ns
اشتباه آزمایشی Error	75	9.5	25.12	0.116	26.96	21.7
ضریب تغییرات CV%		10.01	8.36	9.36	12.54	7.4

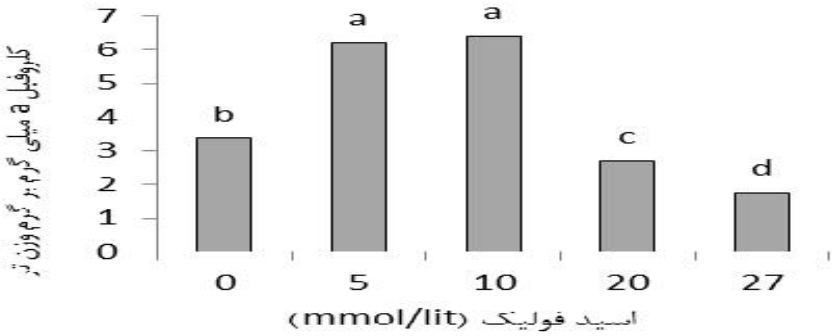
ns، * و ** به ترتیب عدم معنی‌دار و معنی‌دار در سطح احتمال ۵ و ۱ درصد

ns, * and **, no significant and statistically significant at 5 and 1% probability level, respectively



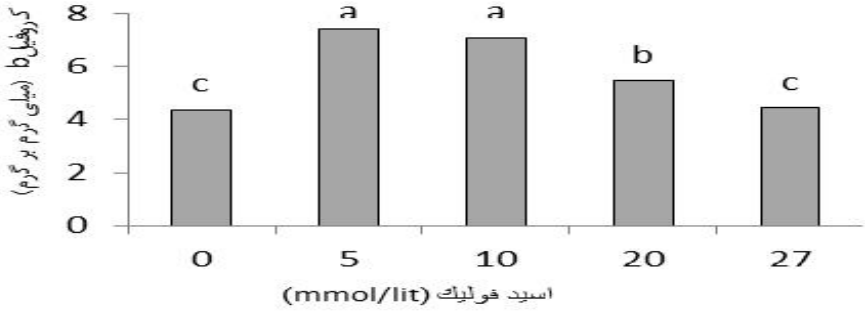
شکل ۱- مقایسه میانگین اثر پراکسید هیدروژن بر کلروفیل a

Figure 1- Mean comparison of hydrogen peroxide on chlorophyll a



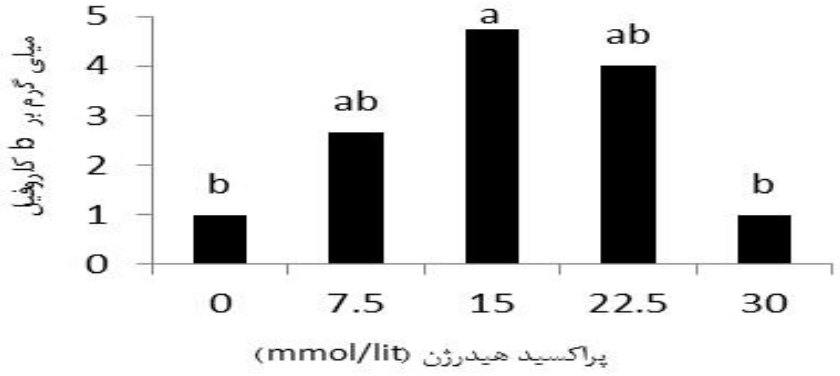
شکل ۲- مقایسه میانگین اثر اسید فولیک بر کلروفیل a

Figure 2- Mean comparison of folic acid effect on chlorophyll a



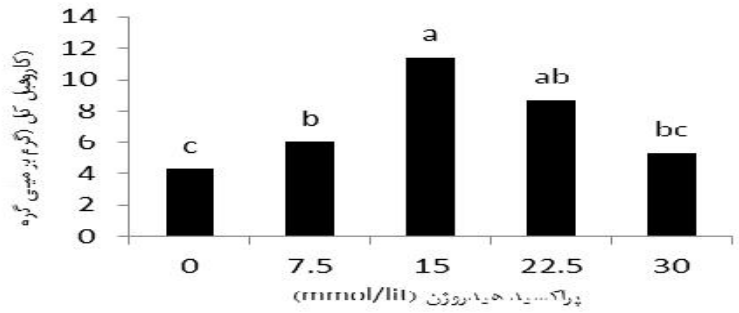
شکل ۳- مقایسه میانگین اثر اسید فولیک بر کلروفیل b

Figure 3-Mean comparison of folic acid effect on chlorophyll b



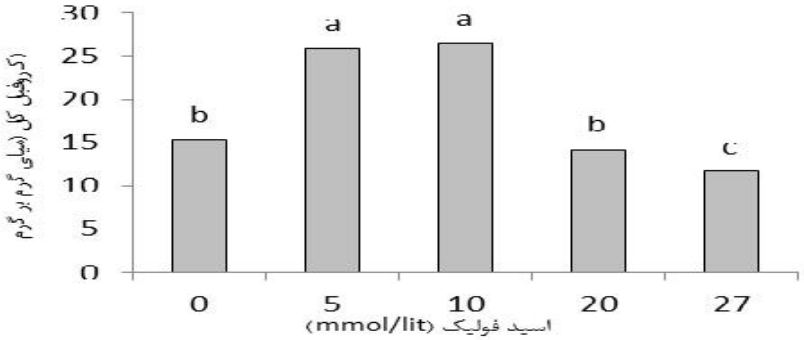
شکل ۴- مقایسه میانگین اثر پراکسید هیدروژن بر کلروفیل b

Figure 4-Mean comparison of hydrogen peroxide effect on chlorophyll b



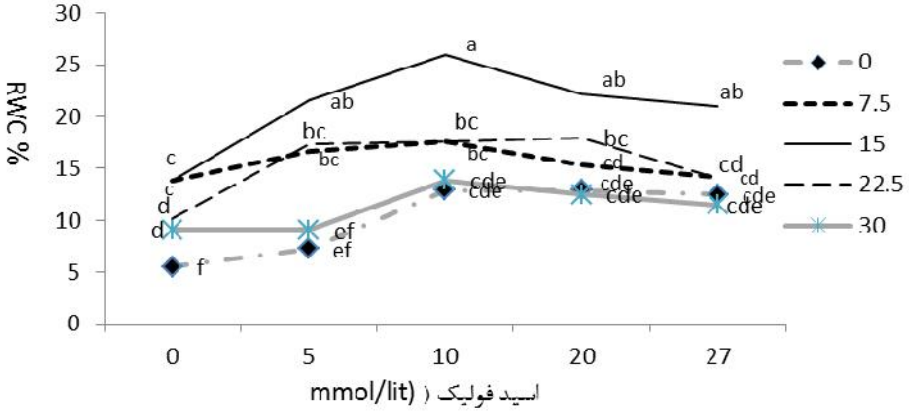
شکل ۵ - مقایسه میانگین اثر پراکسید هیدروژن بر کلروفیل کل

Figure 5-Mean comparison of hydrogen peroxide effect on total chlorophyll



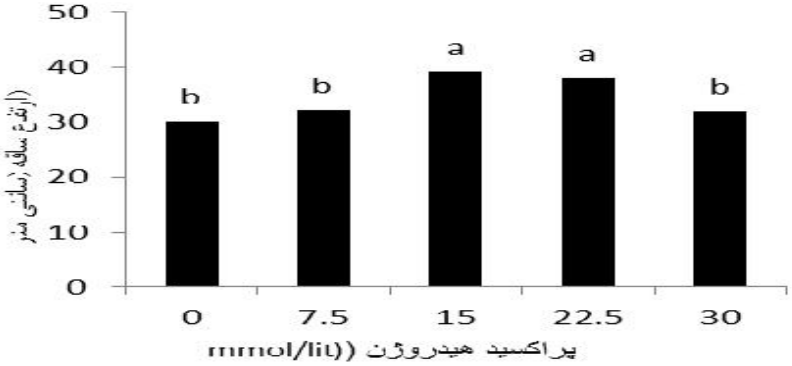
شکل ۶- مقایسه میانگین اثر اسید فولیک بر کلروفیل کل

Figure 6- Mean of the comparison of folic acid effect on total chlorophyll



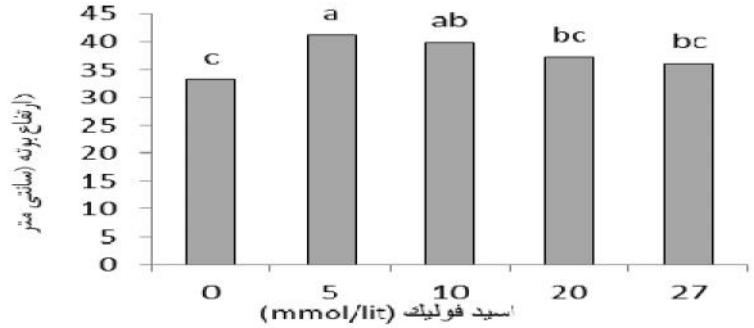
شکل ۷- مقایسه میانگین ترکیبات تیماری پراکسید هیدروژن و اسید فولیک بر محتوای نسبی آب

Figure7- Comparing the mean treatment combination of hydrogen peroxide and folic acid on RWC



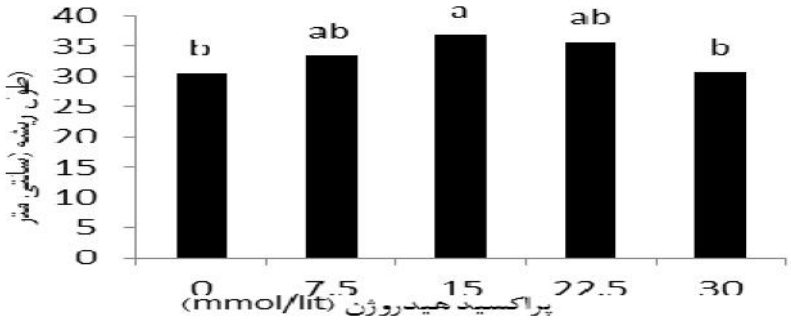
شکل ۸- مقایسه میانگین پراکسید هیدروژن بر ارتفاع ساقه

Figure 8- Mean comparison of hydrogen peroxide effects on stem height



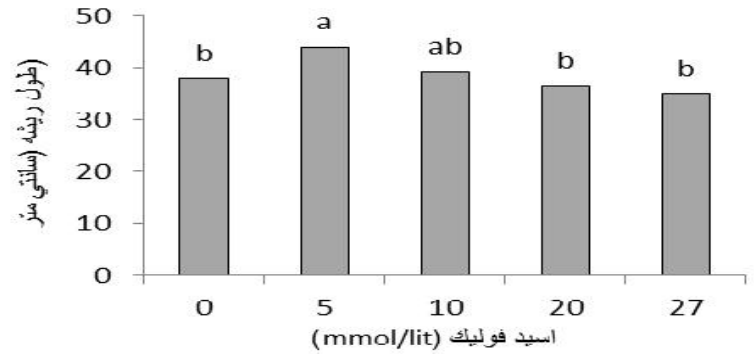
شکل ۹- مقایسه میانگین اثر اسید فولیک بر ارتفاع بوته

Figure 9 – Mean comparison of folic acid effects on stem height



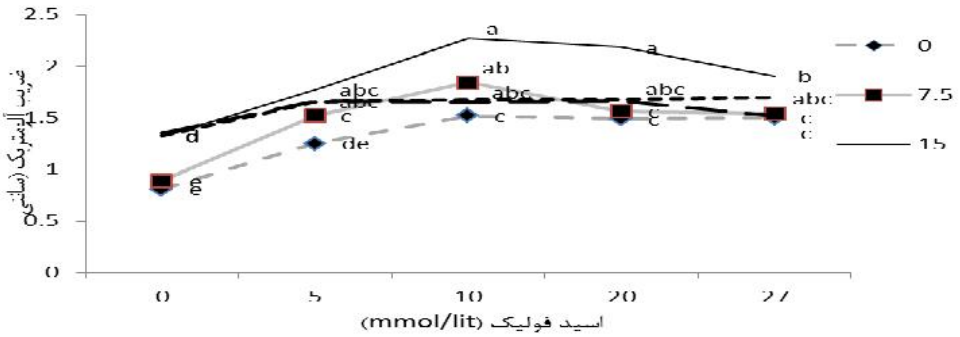
شکل ۱۰- مقایسه میانگین پراکسید هیدروژن بر طول ریشه

Figure 10- Mean comparison of hydrogen peroxide effects on Root length



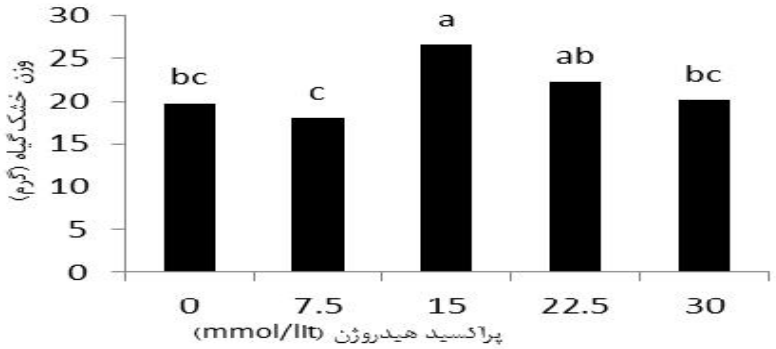
شکل ۱۱- مقایسه میانگین اثر اسید فولیک بر طول ریشه

Figure 11- Mean comparison of folic acid effects on Root length



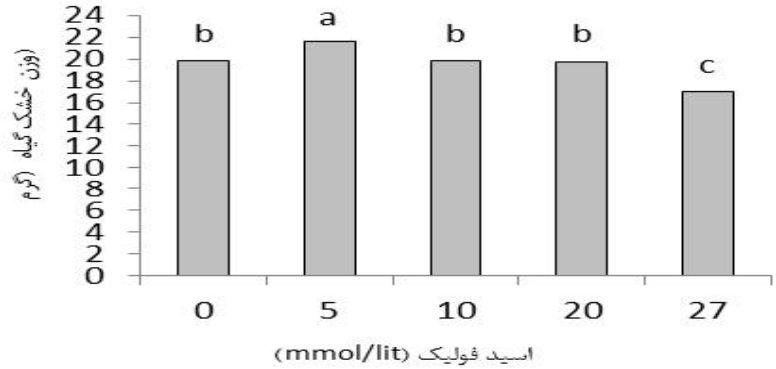
شکل ۱۲- مقایسه میانگین ترکیبات تیماری پراکسید هیدروژن و فولیک اسید از لحاظ اثر بر ضریب آلومتری

Figure 12- Comparing the mean treatment combination of hydrogen peroxide and folic acid on Allometry Coefficient



شکل ۱۳- مقایسه میانگین اثر پراکسید هیدروژن بر وزن خشک گیاه

Figure13 – Mean comparison hydrogen peroxide effects on plant dry weight



شکل ۱۴- مقایسه میانگین اثر اسید فولیک بر وزن خشک گیاه

Figure14 - Mean comparison of folic acid effects on plant dry weight

References منابع مورد استفاده

- Afzal, A., S.M.A. Basra, N. Ahmad, and E.A. Warraich. 2002. Effect of priming and grow regulator treatment on emergence and seedling growth of hybrid Mayze (*Zea mays* L.). *International Journal of Agriculture Biology*.4: 303-306.
- Asghari, M. 1992. Ethylene effect on osmotic adjustment and growth of axial and cotyedonary tissues of seed under drought stress. *Agricultural Sciences Industry*. 7: 137-145.
- Bermingham, A., and J.P. Derrick. 2002. The folic acid biosynthesis pathway in bacteria: Evaluation of potential for antibacterial drug discovery. *Bioessays*. 24: 637–648.
- Bienert, G.P., J.K. Schjoerring, and T.P. Jahn. 2006. Membrane transport of hydrogen peroxide. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1758: 994-1003**.**
- Burguieres, E., P. McCue, Y.I. Kwon, and K. Shetty. 2007. Effect of vitamin C and folic acid on seed vigour response and phenolic-linked antioxidant activity. *Bioresource Technology*. 98: 1393-404.
- Chang, S.M., and J.M. Sung. 1990. Effect of seed priming treatment on the water use efficiency of tomato seeds. *Journal of Crop Research*. 11: 178-86.
- Croxford, J.L., and T. Yamamura. 2005. Cannabinoids and the immune system: Potential for the treatment of inflammatory diseases. *Journal of Neuroimmunology*. 166: 3-18 .
- Demir Kaya, M., G. Okcu, M. Atak, Y. Cikili, and O. Kolsarici. 2006. Seed treatment to overcome salt and drought stress during germination in sunflower (Helianthus annuus L.). *European Journal of Agronomy*. 24: 291- 295.
- Gecheva, T., I. Gadjeva, F. Van Breusegemb, D. Inzeb, S. Dukiandjieva, A. Tonevaa, and I. Minkov. 2002. Hydrogen peroxide protects tobacco from oxidative stress by inducing a set of antioxidant enzymes. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 59:708-714 .
- Goldani, A.D., and D. Kamali. 2011. Effect of exogenous hydrogen peroxide on increasing drought resistance of crops sprout flower (*Gomphrena globosa* L.). *Journal of Agricultural Research*. 10 (3): 613-603. (In Persian)
- Guzman, M. 2003. Cannabinoids: Potential anticancer agents. *Nature Reviews*. 3:745-755 .
- Harris, D. 2001. On- farm seed priming reduces risk and increases yield in tropical crops. *Seed Science and Technology*. 23: 17-26.
- He, L., Z. Gao, and R. Li. 2009. Pretreatment of seed with H_2O_2 enhances drought tolerance of wheat (*Triticum aestivum* L.) seedlings. *African Journal of Biotechnology*. 8 (22): 6151-6157.
- Heldt, H.W. 2005. Plant biochemistry. Elsevier Academic Press Publication. 620 pp.
- Howlett, A.C., C.S. Breivogel, S.R. Childers S.A. Deadwyler, R.E. Hampson, and L.Y. Porrino. 2004. Cannabinoid physiology and pharmacology: 30 years of progress. *Neuropharmacology*. 47:345-358

- Hu, Y., Y. Ge, C. Zhang, T. Ju, and W. Cheng. 2009. Cadmium toxicity and translocation in rice seedlings are reduced by hydrogen peroxide pretreatment. *Plant Growth Regulation*. 59: 51-61.
- Hung, S.H., C.W. Yu, and C.H. Lin. 2005. Hydrogen peroxide functions as a stress signal in plants. *Bot. Bull. Acad. Sin*. 46: 1-10 .
- Javadi, A.S., P. Esfandiari, and B. Mousavi. 2013. The effect of folic acid (vitamin B9) on germination of wheat under cadmium stress. Thirteenth Conference of Crop Sciences and the Third Conference of Seed Science and Technology. Seed and Plant Improvement Institute Karaj. Iran. August 24-26, 288-299.
- Kathiresan A, H.R. Lafitte, J. Chen, L. Mansueto, R. Bruskiewich, and J. Bennett. 2006. Gene expression micro arrays and their application in drought stress research. *Field Crops Res*. 97: 101-110 .
- Katzman, L.S., A.G. Taylor, and R.W. Langhans. 2001. Seed enhance- ments to improve spinach germination. *Horticultural Science*. 36: 979-81.
- Khvazh, D. 1999. Effect of salinity on seed germination and establishment of four species of plants in arid and desert. Department of Natural Resources, University of Technology, A Master's thesis Desertification. (In Persian).
- Lichtenthaler, H.K., and A.R. Wellburn. 1985. Determination of total carotenoids and chlorophylls A and B of leaf in different solvents. *Biochemical Society Transactions*. 11: 591-592.
- Maleki, F., P. Esfandiari, and M. Baradearan Firoozabadi. 2011. Effects of seed treatments and foliar application of folic acid and ascorbic acid on yield and yield components in green beans (*Phaseolus vulgaris*). First National Conference on Sustainable Development of Agriculture Using Crop Pattern. 13 January 2011. Hamadan, 311-316. (In Persian).
- Moskova, I., D. Todorova, V. Alexieva, and I. Sergiev. 2007. Hydrogen peroxide pretreatment alleviates paraquat injuries in pea (*Pisum sativum* L.). *Compets Rendus Academic Bulgare Science*. 60(10): 1101-1106.
- Murillo-rodriguez, E. 2008 .The role of the CB1 receptor in the regulation of sleep. *Neuro-Psycho pharmacology and Biological Psychiatry.* 32: 1420-1427.
- Murugu, F.S., C. Chiduza, P.Nyamugafata, L.J. Clark, W.R. Whalley, and W. Finch Savage. 2004. Effects of on-farm seed priming on consecutive daily sowing occasions on the emergence and growth of maize in semi-aride Zembabwe. *Field Crops Research*. 89:49-57.
- Pill, W.G., and A.D. Necker. 2001. The effect of seed treatment on germination and establishment of kentuky blu grass (*Poa pratenis* L.). *Journal of Agronomy*. 158: 1187-1195.

- Roy, N.K., and A.K. Srivastava. 2000. Adverse effect of salt stress conditions on chlorophyll content in wheat (*Triticum aestivum* L.) leaves and its amelioration through pre-soaking treatments. *Indian Journal of Agriculture Science*. 70: 777-778.
- Ślesak, I., M. Libik, B. Karpinska, S. Karpinski, and S. Miszalskiz. 2007. The role of hydrogen peroxide in regulation of plant metabolism and cellular signalling in response to environmental stresses. *Biochimica et Biophysica Acta*. 54: 39-50.
- Soltani, A. M. Gholipoor, and E. Zeinali. 2006. Seed reserve utilization and seedling growth of wheat as affected by drought and salinity. *Environment and Experimental Botany*. 55: 195-200.
- Stimola, A. 2011. Cell biology. The Rosen Publishing Group. 571 pp.
- Taiz, L., and E. Zeiger. 2010. Plant physiology, Fifth Edition, SA, Inc.
- Upadhyaya, H., M.H. Khan, and S.K. Panda. 2007. Hydrogen peroxide induces oxidative stress in detached leaves of *Oryza sativa* L. *General and Applied Plant Physiology*. 33 (1-2): 83-95.
- van Breusegem, F., J. Bailey-Serres, and R. Mittler. 2008. Unraveling the tapestry of networks involving reactive oxygen species in plants. *Plant Physiology*. 147: 978-984.
- Villa-Castorena, M., A.L. Ulery, E.A.C. Valencia, and M.D. Remmenga. 2003. Division S-4-soil fertility and plant nutrition. *Soil Science Society of America Journal*. 67: 1781-1789.
- Xing, H.L., L. Tan, L. An, Z. Zhao, S. Wang, and C. Zhang. 2004. Evidence for the involvement of nitric oxide and reactive oxygen species in osmotic stress tolerance of wheat seedlings: inverse correlation between leaf abscisic acid accumulation and leaf water loss. *Plant Growth Regulation*. 42: 61-68 .
- Yoshimatsu, K., O. Iicla, and T. Kitazawa. 2004. Growth characteristics of *Cannabis sativa* cultivated in a phytotron and in the field. *Bulletin on Natural Instruction of Health Science*. 122: 16-20.

Morpho- Physiological Changes of Hempseed (*Cannabis sativa* L.) Traits as Affected by Seed Priming with Folic Acid and Hydrogen Peroxide

Shirin Karbalaye Golizadeh[1], Touraj Mir Mahmoodi[1*], and Nabi Khalili Aqdam[2]

Received: December 2014, Revised: 6 October 2015, Accepted: 16 February 2016

Abstract

To evaluate the effects of seed priming of hempseed with folic acid and hydrogen peroxide on some morphological and physiological traits a factorial greenhouse experiment based on randomized complete design with four replications was conducted at Islamic Azad University, Mahabad Branch. Treatments consisted of hydrogen peroxide at five levels (0, 7.5, 15, 22.5, 30 mm/liter) as the first factor and the four leveld of folic acid (5, 10, 20, 27 mm/liter) as the second factor.Seeds, to be primed, were immersed into solution of folic acid for 24 hours and hydrogen peroxide for 6 hours. The characteristics like chlorophyll a, chlorophyll b, total chlorophyll content, relative water content, plant height, root length, allometric coefficient, plant fresh and dry weights, were measured. Result of analysis of variance showed that the effects of folic acid and hydrogen peroxide on all characters were significant, but the interaction between the two treatments were only significant on relative water content and allometric coefficient. In this study, seed priming with 15 mm/liter of hydrogen peroxide and 5mm folic acid resulted in highest chlorophyll a, chlorophyll b, total chlorophyll contents, plant height, root length, fresh and dry weights. Increasing hydrogen peroxide level above 15mm/liter affected traits negatively. Combinated treatments of 15 mm/liter of hydrogen peroxide and 5 and 10 mm of folic acid resulted in highest relative water content and allometric coefficient, respectively. Based on the results obtained it can be concluded that priming seeds with 15 mm/liter of hydrogen peroxide and 5mm folic acid is recommended to produce proper morphological and physiological traits.

Key words: Cannabis, Folic acid, Hydrogen peroxide, Seed priming.

1- Department of Agronomy and Plant Breeding, Mahabad Branch,Islamic Azad University, Mahabad,Iran.
2- Department of Agriculture, Payam noor University of Bokan, Bokan, Iran.
* *Corresponding Author: Toraj73@yahoo.com*