

نقش کیتوزان در بهبود مقاومت به شوری از طریق تأثیر بر برخی خصوصیات مورفولوژیک و فیزیولوژیک گیاه شنبلیله (*Trigonella foenum-graecum* L.)

حسن موسی پور یحیی آبادی^۱، محمد رضا اصغری پور^{۲*} و محبوبه بصیری^۲

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۸/۱۰؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۱۲/۲۴)

چکیده

شوری خاک یک مسئله محیطی جدی است که آثار منفی بر رشد و تولید گیاهان دارد. از سوی دیگر، اخیراً کاربرد کیتوزان، در افزایش مقاومت به تنش‌هایی همچون شوری زیاد شده است. بدین منظور، آزمایشی با هدف بررسی تأثیر پیش‌تیمار بذر کیتوزان بر کاهش اثر تنش شوری در شنبلیله، به صورت فاکتوریل، در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار، در گلخانه تحقیقاتی دانشگاه زابل در سال ۱۳۹۳ انجام شد. عامل اول، پیش‌تیمار کیتوزان در سه سطح (۵/۵ و ۱ گرم در لیتر و عدم کاربرد کیتوزان) و عامل دوم محلول کلرید سدیم در چهار سطح (۵۰، ۱۵۰ و ۲۵۰ میلی‌مولار و عدم کاربرد کلرید سدیم) در نظر گرفته شد. قبل از کاشت، بذرها به مدت شش ساعت در محلول‌های کیتوزان قرار داده شدند. کلرید سدیم نیز به صورت خاکی و از طریق آبیاری (بعد از مرحله دو برگ)، با فواصل سه روزه، به گیاهان اعمال شد. نتایج نشان داد که افزایش شدت تنش شوری باعث کاهش خصوصیات رشد، محتوای رنگیزه‌های فتوسنتزی، محتوای نسبی آب برگ، شاخص سبزیگی و افزایش میزان آنتوسیانین و پرولین شد. پیش‌تیمار ۵/۵ گرم در لیتر کیتوزان موجب افزایش وزن خشک گیاه، طول ساقه و ریشه و محتوای نسبی آب برگ در شرایط تنش شوری، نسبت به شاهد گردید. همچنین، کاربرد یک گرم در لیتر کیتوزان، میزان کلروفیل a، کلروفیل b و کاروتنوئیدها را در سطح شوری ۲۵۰ میلی‌مولار به ترتیب به میزان ۴۳/۷، ۶۵/۴ و ۲۸/۰ درصد نسبت به تیمار شاهد افزایش داد. بیشترین میزان آنتوسیانین در تیمار یک گرم در لیتر کیتوزان به دست آمد. به طور کلی، نتایج نشان داد که در مناطق تحت تنش شوری، کاربرد کیتوزان می‌تواند از طریق حفظ محتوای نسبی آب برگ و ازدیاد رنگیزه‌های فتوسنتزی، مقاومت گیاه را افزایش داده و در نتیجه باعث رشد و استقرار مطلوب‌تر گیاه شنبلیله شود.

واژه‌های کلیدی: آنتوسیانین، پرولین، کلروفیل کل، گیاهان دارویی

مقدمه

محیط ریشه، سمیت برخی از یون‌ها همانند Na^+ و Cl^- و نیز عدم تعادل عناصر غذایی از عوامل مهم کاهش رشد گیاهان در این شرایط به شمار می‌روند (۲۷). کمالی و همکاران (۴) گزارش کردند که ارتفاع بوته، وزن خشک ریشه و ساقه و عملکرد گل تکمه‌ای (*Gomphrena globosa* L.) با شوری کاهش می‌یابد، که این کاهش رشد ممکن است به دلیل اثرهای

تنش شوری یکی از مهم‌ترین عوامل محیطی است که رشد و تولید بسیاری از گیاهان را، به‌خصوص در مناطق خشک و نیمه خشک، محدود می‌کند (۲۹). واکنش معمول گیاهان با افزایش غلظت نمک در محیط ریشه، تنش اسمزی، سمیت یونی و کمبود عناصر غذایی است (۳۰). کم شدن پتانسیل آب در

۱. گروه باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زابل

۲. گروه زراعت، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زابل

*: مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: m_asgharipour@uoz.ac.ir

منفی پتانسیل اسمزی شدید محلول خاک باشد که جذب آب و عناصر غذایی را کاهش می‌دهد و در نهایت باعث کاهش رشد ریشه و بخش هوایی می‌شود.

در این بین، استفاده از سازوکارهایی که به کاهش خسارات تنش شوری منتهی گردد، می‌تواند مفید باشد. یکی از این روش‌ها که اخیراً توجه محققین به آن معطوف شده است استفاده از بیوپلیمر کیتوزان می‌باشد. کیتوزان یک ماده غیرسمی، بیوپلیمر آلی و طبیعی، پلی‌ساکارید نیتروژن‌دار و قابل تجزیه زیستی است که می‌تواند تنش‌های محیطی حاصل از شوری و خشکی خاک را کاهش دهد، و موجب بهبود روند رشد در گیاهان شود (۱۲ و ۲۳). مهدوی و رحیمی (۲۶) در بررسی پیش‌تیمار بذر با کیتوزان بر رشد و نمو گیاه زنیان (*Trachyspermum ammi* L.) در شرایط تنش شوری، گزارش کردند که کیتوزان از طریق افزایش محتوای نسبی آب برگ، منجر به حفظ تورژسانس و حجم برگ می‌شود و غشای سلولی را محافظت می‌کند. در نتیجه، رشد و عملکرد گیاه زنیان در تیمار با کیتوزان در شرایط تنش شوری نسبت به عدم پیش‌تیمار، به طور معنی‌داری افزایش داشت. همچنین، کیتوزان با افزایش رنگیزه‌های فتوسنتزی و حفظ آنها تحت شرایط تنش شوری و فعال نمودن تعدادی از آنزیم‌ها نظیر فیتواکسین‌ها و کیتینازها، مقاومت گیاه را در برابر شرایط نامساعد محیطی و تنش‌ها افزایش داده و صدمات ناشی از آنها را کاهش می‌دهد (۶).

شنبليله (*Trigonella foenum-graecum* L.) گیاهی دارویی، متعلق به خانواده بقولات *Fabiaceae*، است که بومی ایران بوده، در بیشتر نواحی ایران از جمله آذربایجان، اصفهان، فارس، سمنان و دامغان می‌روید و به عنوان سبزی خوراکی کشت و مصرف می‌شود. شنبليله دارای خواص ضد دیابتی، ضد سرطان، ضد میکروبی و کاهنده قند خون است (۲). خواص دارویی شنبليله به دلیل وجود ترکیبات استروئیدی، ترکیبات نیتروژن‌دار، پلی‌فنل، ترکیبات فرار و آمینو اسید موجود در آن می‌باشد (۱۳). شنبليله، به علت توانایی رشد در شرایط تنش شوری و

ارزش دارویی و اقتصادی آن، می‌تواند یک گیاه مناسب در اکوسیستم‌های زراعی مناطق خشک و نیمه خشک باشد (۲۸). اگر چه شنبليله به شوری مقاوم است، ولی جوانه‌زنی آن به طور قابل توجهی تحت تأثیر شوری خاک قرار می‌گیرد (۲۸). یکی از مهم‌ترین عوامل مؤثر در حصول عملکرد مطلوب، استقرار مناسب گیاه در مزرعه است که خود وابسته به مرحله جوانه‌زنی می‌باشد. این مرحله به شدت از تنش‌های محیطی، به‌ویژه شوری، تأثیر می‌پذیرد. با توجه به این موارد و همچنین اهمیت شنبليله به عنوان یک گیاه دارویی و علوفه‌ای، انجام این تحقیق جهت استقرار مطلوب آن و تأثیر شوری و کیتوزان بر رنگیزه‌های فتوسنتزی و میزان پرولین شنبليله به عنوان هدف این تحقیق در نظر گرفته شد.

مواد و روش‌ها

به منظور بررسی اثر پیش‌تیمار کیتوزان روی برخی از عوامل رشد از قبیل تغییرات طول ریشه و ساقه، وزن خشک گیاه و برخی خصوصیات فیزیولوژیک گیاه شامل محتوای نسبی آب برگ، میزان پرولین برگ، شاخص سبزی‌نگی و میزان کلروفیل a، کلروفیل b، کاروتنوئیدها و میزان آنتوسیانین برگ‌ها، آزمایشی به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار در سال ۱۳۹۳ در گلخانه دانشکده کشاورزی، دانشگاه زابل، در شرایط نسبی کنترل شده شامل: طول روز ۱۴ ساعت و دمای ۲۸ درجه سلسیوس در روز و ۲۰ درجه سلسیوس در شب، اجرا شد. عامل اول، پیش‌تیمار کیتوزان در سه سطح (۰/۵ و ۱ گرم در لیتر و عدم کاربرد) و عامل دیگر غلظت محلول کلرید سدیم (NaCl) (۵۰، ۱۵۰ و ۲۵۰ میلی مولار و عدم کاربرد کلرید سدیم) در نظر گرفته شد. قبل از شروع آزمایش، بذرهای شنبليله با هیپوکلرید سدیم (NaClO) ۵٪ به مدت ۴ دقیقه ضدعفونی و سپس با آب مقطر شسته شدند و شش ساعت در محلول کیتوزان با غلظت‌های مختلف و به‌طور جداگانه خیسانده شدند. دانه‌های پیش‌تیمار شده در گلدان‌های پلاستیکی دو کیلویی حاوی کوکوپیت و پرلیت با نسبت سه به

نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر (Unico مدل UV-2100 ساخت آمریکا) قرائت شد و مقدار آنتوسیانین با استفاده از فرمول $A = \varepsilon bc$ به دست آمد که در آن مقدار ε (ضریب خاموشی) معادل 33000 سانتی متر بر مول، A مقدار جذب، b عرض کوت اندازه گیری برابر یک سانتی متر و c مقدار آنتوسیانین بر حسب میکروگرم بر گرم وزن تر گیاه می باشد.

محتوای پرولین بافت گیاهی از طریق سنجش مقدار محصول رنگی واکنش پرولین با اسید نین هیدرین به دست آمد (۹). میزان جذب در طول موج 520 نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر قرائت شد و مقدار پرولین به کمک منحنی استاندارد از پیش آماده شده محاسبه و بر حسب میلی گرم بر گرم وزن تر بیان گردید.

برای اندازه گیری طول ساقه و ریشه، گیاهان با دقت از گلدان خارج شدند و بعد از شستشوی ریشه، بلافاصله به آزمایشگاه منتقل و طول ساقه و ریشه اندازه گیری شد. پس از جدا کردن اندام های گیاهی از یکدیگر، به مدت 48 ساعت در آون با دمای 70 درجه سلسیوس قرار گرفتند و توزین وزن خشک گیاه با ترازوی دیجیتالی با دقت 0.001 انجام شد.

برای تجزیه آماری داده ها از نرم افزار SAS نسخه $9/1$ استفاده شد و مقایسه میانگین ها با آزمون چنددامنه ای دانکن در سطح احتمال 5% صورت گرفت.

نتایج و بحث

نتایج تجزیه واریانس داده ها نشان داد که سطوح مختلف شوری و کیتوزان بر کلیه صفات در سطح احتمال 1% تأثیر معنی دار داشته اند. اما میزان پرولین و شاخص سبزینگی تحت تأثیر پیش تیمار کیتوزان قرار نگرفت. اثر متقابل تنش شوری و پیش تیمار کیتوزان بر صفات وزن خشک گیاه، کلروفیل a و کلروفیل b ، کاروتنوئیدها و کلروفیل کل در سطح 1% و روی صفات طول ساقه، محتوای نسبی آب برگ در سطح 5% معنی دار بود (جداول ۱ و ۲).

مقایسه میانگین اثر متقابل نشان می دهد که با افزایش میزان

یک، کشت شدند (در هر گلدان 8 عدد بذر کاشته شد). تیمارهای شوری پس از رشد مناسب (دو برگگی) به همراه محلول غذایی هوگلند به گلدان ها اعمال شدند. هفته ای سه بار و به هر گلدان 60 میلی لیتر محلول غذایی هوگلند داده شد و پس از 40 روز رشد، گیاهان برداشت شدند.

بعد از اعمال تنش شوری، در مراحل پایانی آزمایش، شاخص سبزینگی با استفاده از دستگاه کلروفیل سنج (Hansatech مدل CL-01)، در برگ های جوان (کاملاً توسعه یافته) ارزیابی شد. جهت اندازه گیری محتوای نسبی آب برگ (RWC) نمونه های برگگی بعد از اندازه گیری وزن تر، در آب مقطر به مدت 24 ساعت در دمای اتاق و نور کم غوطه ور شدند تا وزن آماس نمونه ها به دست آید. سپس، برای به دست آوردن وزن خشک، به مدت 48 ساعت در دمای 70 درجه سلسیوس در آون قرار داده شدند و RWC طبق معادله زیر محاسبه شد (۳۱):

$$RWC (\%) = [(WW - DW) / (TW - DW)] \times 100 \quad [1]$$

که WW وزن تر، DW وزن خشک و TW وزن آماس است. برای سنجش میزان رنگیزه های فتوسنتزی، از روش آرنون (۸) استفاده شد. برای این منظور، 0.125 گرم از برگ های تازه گیاه جدا و استخراج رنگیزه ها با استفاده از استون 80% انجام شد. غلظت رنگیزه ها با استفاده از روابط زیر محاسبه گردید:

$$Chla = (19.3 \times A663 - 0.86 \times A645) V / 100W \quad [2]$$

$$Chlb = (19.3 \times A645 - 3.6 \times A663) V / 100W \quad [3]$$

$$Car = [(100 \times A470) - 3.27(mg Chla) - 104(mg Chlb)] / 227 \quad [4]$$

در این فرمول ها، $Chla$ ، $Chlb$ و Car به ترتیب غلظت کلروفیل a ، b و کاروتنوئیدها (شامل کاروتن ها و گزانتوفیل ها)، V حجم محلول صاف شده (محلول فوقانی حاصل از سانتریفیوژ)، A جذب نور در طول موج های 663 ، 645 و 470 نانومتر و W وزن تر نمونه بر حسب گرم می باشد. نتایج حاصل از اندازه گیری مقدار رنگیزه های فتوسنتزی بر حسب میلی گرم بر گرم وزن تر محاسبه و ارائه گردیده است.

جهت اندازه گیری مقدار آنتوسیانین های اندام هوایی از روش وگنر (۴۱) استفاده شد. میزان جذب در طول موج 550

جدول ۱. مقایسه میانگین اثرهای ساده شوری و کیتوزان بر خصوصیات مورفولوژیک و فیزیولوژیک گیاه شبلیله

تیمار	طول ساقه (سانتی متر)	طول ریشه (سانتی متر)	وزن خشک کل (میلی گرم)	محتوای نسبی آب برگ (درصد)	شاخص سبزی‌نگی	پرولین (میلی گرم بر گرم وزن تر)
شوری (میلی مولار)						
۰	۵/۲a	۹/۴a	۳۴/۳۲a	۸۵/۰۱a	۳۹/۰۰ba	۲/۳۸c
۵۰	۵/۱a	۸/۸a	۲۹/۰۷b	۸۴/۸۹a	۴۰/۰۹a	۲/۴۶cb
۱۵۰	۴/۲b	۷/۳b	۲۲/۵۶c	۸۰/۷۱b	۳۵/۱۲b	۲/۹۹b
۲۵۰	۲/۹c	۵/۳۴c	۱۴/۷۸d	۷۰/۹۲c	۲۹/۷۴c	۳/۵۶a
کیتوزان (گرم در لیتر)						
۰	۶/۵۲b	۳/۰۷b	۲۰/۰۵b	۷۸/۴۲c	۳۳/۸۴a	۲/۷۸a
۰/۵	۸/۳۸a	۵/۰۱a	۲۹/۰۱a	۸۲/۴۴a	۳۷/۰۱a	۳/۰۲a
۱	۸/۲۲a	۵/۰۲a	۲۸/۴۳a	۸۰/۲۷b	۳۷/۱۴a	۲/۷۵a
شوری	**	**	**	**	**	**
کیتوزان	**	**	**	**	ns	ns
شوری*کیتوزان	*	ns	**	*	ns	ns

در هر ستون و تیمار، میانگین‌های دارای حداقل یک حرف مشترک بر مبنای آزمون دانکن در سطح ۰.۵٪ دارای تفاوت معنی‌دار نمی‌باشند. **، * و ns به ترتیب معنی‌دار در سطوح احتمال ۰.۱٪ و ۰.۵٪ و بدون اختلاف معنی‌دار.

جدول ۲. تأثیر پیش تیمار کیتوزان بر رنگی‌های فتوسنتزی و آنتوسیانین در گیاه شبلیله تحت تنش شوری

تیمار	آنتوسیانین (میکرو گرم بر گرم وزن تر)	کلروفیل a (میلی گرم بر گرم وزن تر)	کلروفیل b (میلی گرم بر گرم وزن تر)	کاروتنوئیدها (میلی گرم بر گرم وزن تر)	کلروفیل کل (میلی گرم بر گرم وزن تر)
شوری (میلی مولار)					
۰	۰/۳۹b	۲/۲۵b	۱/۱۳a	۰/۱۶۳a	۳/۳۹b
۵۰	۰/۴۰b	۲/۵۳a	۱/۱۲a	۰/۱۲۵b	۳/۶۵a
۱۵۰	۰/۵۶a	۲/۰۶c	۰/۸۱b	۰/۰۸۹c	۲/۸۸c
۲۵۰	۰/۴۴b	۱/۳۷d	۰/۵۰c	۰/۰۸۲c	۱/۸۷d
کیتوزان (گرم در لیتر)					
۰	۰/۴۳b	۱/۸۹b	۰/۶۹c	۰/۰۹c	۲/۵۸c
۰/۵	۰/۴۲b	۲/۰۹a	۰/۹۵b	۰/۱۴a	۳/۰۴b
۱	۰/۴۹a	۲/۱۸a	۱/۰۳a	۰/۱۱b	۳/۲۱a
شوری	**	**	**	**	**
کیتوزان	*	**	**	**	**
شوری*کیتوزان	ns	**	**	**	**

در هر ستون و تیمار، میانگین‌های دارای حداقل یک حرف مشترک بر مبنای آزمون دانکن در سطح ۰.۵٪ دارای تفاوت معنی‌دار نمی‌باشند. **، * و ns به ترتیب معنی‌دار در سطوح احتمال ۰.۱٪ و ۰.۵٪ و بدون اختلاف معنی‌دار.

احتمال ۱٪ کاهش نشان داد. بیشترین طول ریشه از تیمار شاهد به دست آمد که نسبت به تیمارهای ۲۵° و ۱۵۰ میلی مولار شوری به ترتیب ۴۴/۲ و ۱۹/۲ درصد بیشتر بود (جدول ۱). آل ابراهیم و همکاران (۷) و لینچ و لوچلی (۲۴) به ترتیب در بررسی اثر شوری بر رشد گیاه آویشن (*Thymus vulgaris* L.) و ذرت (*Zea mays* L.) کاهش طول ریشه را در شرایط اعمال تنش شوری گزارش کردند. کاهش رشد ریشه ممکن است به دلیل اثرهای منفی پتانسیل اسمزی زیاد محلول خاک باشد که جذب آب و مواد غذایی را کاهش داده و در نهایت باعث کاهش رشد ریشه می گردد. همچنین، کاهش طول ریشه به علت سمیت یونی و در نهایت اختلال متابولیسمی گزارش شده است (۵). در پیش تیمار بذر با کیتوزان، تیمار یک گرم در لیتر توانست طول ریشه را نسبت به تیمار شاهد به میزان ۳۸/۸ درصد افزایش دهد. این نشان دهنده تأثیر مؤثر کیتوزان بر رشد ریشه و استقرار بیشتر گیاه شنبلیله می باشد. ما و همکاران (۲۵) گزارش کردند که پیش تیمار بذر گندم با کیتوزان باعث افزایش رشد ریشه در شرایط تنش شوری نسبت به عدم پیش تیمار می شود.

نتایج مقایسه میانگین داده ها نشان داد که با افزایش سطح تنش شوری در بین تیمارها، وزن خشک گیاه شنبلیله به طور معنی داری نسبت به شاهد کاهش نشان داد. کاهش رشد و وزن خشک گیاهان تحت تنش شوری می تواند به دلیل کاهش ذخایر انرژی گیاه و کاهش سطح فتوسنتز باشد که در نتیجه کاهش اختلال فعالیت های زیستی و متابولیسمی در گیاهان می باشد (۳۹). بیشترین و کمترین میزان وزن خشک گیاه به ترتیب مربوط به تیمارهای شاهد و سطح شوری ۲۵۰ میلی مولار بود (جدول ۱). در مورد پیش تیمار کیتوزان، تیمار ۵/۰ گرم در لیتر نسبت به تیمار شاهد به میزان ۳۲/۲ درصد وزن خشک گیاه را افزایش داد (جدول ۱). عامل محتمل دیگری که سبب کاهش فتوسنتز می گردد اثر بازدارندگی تنش شوری بر فرایند جذب و انتقال مواد فتوسنتزی می باشد (۱۱).

نتایج این تحقیق با نتایج سقیب و همکاران (۳۶) که نشان

شوری، طول ساقه روندی کاهشی نشان داد، به طوری که در سطوح زیاد شوری، طول ساقه نسبت به تیمار شاهد به میزان ۶۹٪ کاهش یافت. پیش تیمار کیتوزان توانست میزان طول ساقه را در سطوح زیاد شوری نسبت به شاهد افزایش دهد. تیمار ۵/۰ گرم در لیتر در شرایط تنش ۱۵۰ میلی مولار و تیمار یک گرم در لیتر کیتوزان در شرایط تنش ۲۵۰ میلی مولار، طول ساقه را به میزان ۲۷ و ۶۰ درصد نسبت به عدم پیش تیمار افزایش دادند (جدول ۳). نتایج حاکی از کاهش طول ساقه در اثر شوری در گیاهان مختلفی مانند سیاهدانه (۳۵) و سورگوم (۲۱) گزارش شده است. شوری، با کاهش تقسیم و طویل شدن سلولی، باعث کاهش طول ساقه می گردد (۵). نتایج مطالعه حسین و همکاران (۱۷) نشان داد که تنش شوری سبب کاهش چشمگیر میزان رشد در ارقام مختلف نیشکر شد. از دلایل کاهش طول گیاه در شرایط شوری، ایجاد خشکی فیزیولوژیک در محیط ریشه و همچنین رقابت Cl^- و SO_4^{2-} با NO_3^- توسط میبیدی و قره یاضی (۵) گزارش شده است. کیتوزان از طریق تنظیم فشار اسمزی سلول، باعث افزایش جذب آب و مواد غذایی ضروری توسط گیاه شده و در نتیجه رشد گیاه در شرایط تنش افزایش پیدا می کند (۱۵). ما و همکاران (۲۵) گزارش کردند که بذر گندم (*Triticum aestivum* L.) تحت تیمار کیتوزان در شرایط تنش شوری نسبت به تیمار شاهد از رشد بیشتری برخوردار بود. دزانگ و تانگ (۱۲) نشان دادند که کیتوزان می تواند رشد گیاه و عملکرد محصول سویا (*Glycine max* L.) را افزایش دهد.

طول ریشه یکی از خصوصیات ارزشمند و بسیار متداول جهت توصیف سیستم ریشه ای کارآمد و پیش بینی واکنش گیاه به تغییرات محیطی است. همچنین، این صفت، شناسه مناسبی برای بررسی جذب آب و مواد غذایی توسط این اندام به شمار می آید (۳).

در این مطالعه، مقایسه میانگین اثر سطوح مختلف شوری بر طول ریشه نشان داد که با افزایش شوری تا سطح ۲۵۰ میلی مولار، طول ریشه نسبت به شاهد به طور معنی داری در سطح

جدول ۳. اثر متقابل کیتوزان و شوری کلرید سدیم بر صفات مورد مطالعه در گیاه شنبلیله

کاروتنوئیدها	کلروفیل کل (میلی گرم بر گرم وزن تر)	کلروفیل b (میلی گرم برگرم وزن تر)	کلروفیل a (میلی گرم بر گرم وزن تر)	محتوای نسبی آب برگ (درصد)	وزن خشک گیاه (میلی گرم)	طول ساقه (سانتی متر)	تیمار	
							شوری (میلی مولار)	کیتوزان (گرم در لیتر)
۰/۱۴۱c	۳/۲۹b	۱/۰۳cd	۲/۲۵b	۸۵/۱۳a	۳۰/۱۵c	۹/۲۱ab	۰	
۰/۱۷۳b	۳/۴۴b	۱/۱۳bc	۲/۳۱b	۸۴/۸۱a	۳۷/۷۷a	۹/۸۴a	۰/۵	۰
۰/۱۹۱ab	۳/۴۱b	۱/۲۲b	۲/۱۹bc	۸۵/۱a	۳۵/۰۷b	۹/۱۵ab	۱	
۰/۰۹۲ef	۳/۳۸b	۰/۹۸d	۲/۴b	۸۴/۳۳a	۲۶/۵۱d	۸/۱۷abc	۰	
۰/۱۸۹a	۴/۱۹a	۱/۳۵a	۲/۸۴a	۸۵/۶۴a	۳۵/۲۷b	۹/۵ab	۰/۵	۵۰
۰/۰۹۴e	۳/۳۶b	۱/۰۱d	۲/۳۵b	۸۴/۷a	۳۳/۱۷b	۸/۷۵abc	۱	
۰/۰۷۴fg	۲/۲۳d	۰/۴۱f	۱/۸۳d	۷۹/۱۱bc	۱۴/۸۳f	۵/۹d	۰	
۰/۱۱۲d	۲/۹۱c	۰/۸۱e	۲/۱۴bcd	۸۳/۲۱ab	۲۶/۵۳d	۸/۱abc	۰/۵	۱۵۰
۰/۰۸۲efg	۳/۴۱b	۱/۱۴bc	۲/۲۷b	۷۹/۸۲bc	۲۶/۳۴d	۷/۹bc	۱	
۰/۰۶۷g	۱/۳۵e	۰/۲۷g	۱/۰۸e	۶۵/۱۲e	۸/۷۱g	۲/۸۱e	۰	
۰/۰۸۷ef	۱/۵۸e	۰/۴۷f	۱/۱۱e	۷۶/۱۱c	۱۶/۵۰f	۶/۱۱d	۰/۵	۲۵۰
۰/۰۹۳e	۲/۷c	۰/۷۸e	۱/۹۲cd	۷۱/۵۳d	۱۹/۱۷e	۷/۱cd	۱	

در هر ستون، میانگین‌های دارای حداقل یک حرف مشترک، بر مبنای آزمون دانکن در سطح احتمال ۵٪ دارای تفاوت معنی‌داری نمی‌باشند.

شوری از لحاظ آماری اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد (جدول ۲). در گیاهان مختلف، کاهش محتوای نسبی آب برگ در شرایط تنش شوری گزارش شده است (۱۸). کاهش محتوای نسبی آب برگ تحت تنش شوری به دلیل کاهش جذب آب، کم شدن پتانسیل آب و خاک و یا آسیب رسیدن به سیستم ریشه‌ای می‌باشد (۱۴). مقایسه میانگین اثرهای متقابل نشان می‌دهد که پیش‌تیمار یک گرم در لیتر کیتوزان در شرایط تنش شوری ۲۵۰ میلی‌مولار باعث افزایش ۹ درصدی محتوای نسبی آب برگ نسبت به عدم پیش‌تیمار شد (جدول ۳). این نتایج با نتایج سایر محققین مطابقت دارد (۲۶). آن‌ها گزارش کردند که مصرف کیتوزان در گیاهان قرار گرفته در معرض تنش شوری، سبب افزایش محتوای نسبی آب برگ می‌شود. بنابراین، با توجه به نتایج حاصل از این آزمایش و گزارش‌های سایر محققین می‌توان استنباط کرد که کیتوزان از طریق بهبود سیستم ریشه‌ای کارآمد، باعث افزایش جذب آب و ذخایر آبی گیاه شده و همچنین با کاهش تعرق در گیاه، باعث حفظ محتوای نسبی آب

دادند افزایش شوری سبب کاهش فتوسنتز، هدایت روزنه‌ای و رشد اندام هوایی و وزن خشک گیاه می‌شود، مطابقت دارد. در بررسی اثر متقابل بین شوری و سطوح پیش‌تیمار با کیتوزان (جدول ۳)، مشاهده شد که بیشترین میزان وزن خشک گیاه از تیمار ۰/۵ گرم در لیتر کیتوزان و بدون تنش شوری به دست آمد. با افزایش شوری تا سطح ۲۵۰ میلی‌مولار، پیش‌تیمار یک گرم در لیتر، نسبت به سایر تیمارها، وزن خشک ساقه را افزایش داد. به نظر می‌رسد مصرف کیتوزان با تحریک رشد ساقه و ریشه و در نتیجه افزایش جذب آب و مواد غذایی و انتقال بهتر این مواد در اندام گیاهی، منجر به افزایش وزن خشک گیاه می‌گردد.

با افزایش میزان شوری، محتوای نسبی آب برگ کاهش نشان داد. بیشترین و کمترین میزان محتوای نسبی آب برگ به ترتیب از تیمارهای شاهد و سطح ۲۵۰ میلی‌مولار شوری به دست آمد که نشان از کاهش ۱۶/۶ درصدی نسبت به تیمار شاهد دارد. بین تیمار ۵۰ میلی‌مولار شوری با و بدون تنش

برگ در شرایط تنش شده است.

با توجه به مقایسه میانگین داده‌ها با افزایش تنش شوری به طور معنی‌داری شاخص سبزی‌نگی روند کاهشی نشان داد به طوری که تنش شوری ۲۵۰ میلی‌مولار نسبت به تیمار شاهد به میزان ۲۳/۷۴ درصد شاخص سبزی‌نگی را کاهش داد. بر اساس نظر اسکاتز و فانگمیر (۳۷) کاهش میزان کلروفیل در اثر تنش مربوط به افزایش تولید رادیکال‌های اکسیژن در سلول است. این رادیکال‌های آزاد سبب پراکسیداسیون و در نتیجه تجزیه این رنگیزه می‌گردند. به نظر می‌رسد کاهش غلظت کلروفیل تحت شرایط تنش به واسطه اثر کلروفیل‌لاز، پراکسیداز و ترکیبات فنلی و در نتیجه تجزیه کلروفیل باشد (۱). پیش‌تیمار کیتوزان یک گرم در لیتر بیشترین شاخص سبزی‌نگی را داشت ولی از نظر آماری اختلاف معنی‌داری بین تیمارها مشاهده نشد (جدول ۱).

میزان پرولین در برگ‌ها تحت تأثیر شوری افزایش یافت؛ اما پیش‌تیمار کیتوزان بر آن بی‌تأثیر بود (جدول ۱). پرولین به عنوان بخشی از راهبرد مقاومت در برابر تنش برای برخی از گیاهان ثابت شده است (۲۲). با افزایش شوری به ۵۰، ۱۵۰ و ۲۵۰ میلی‌مولار، محتوای پرولین برگ به ترتیب ۳/۳، ۲۰/۴ و ۳۳/۱ درصد نسبت به شاهد افزایش نشان داد (جدول ۱). به نظر می‌رسد که در شنبلیله نیز مانند بسیاری از گیاهان، در شرایط تنش شوری، تولید پرولین درون سلولی به منظور افزایش تحمل به شوری، افزایش می‌یابد. این یافته‌ها با نتایج نظریاتی و همکاران (۳۱) با مطالعه روی گیاه کلزا (*Brassica napus L.*) مطابقت دارد. این محققین نشان دادند که با افزایش شوری، میزان پرولین در ریشه و برگ ارقام مورد مطالعه افزایش یافت، که این افزایش در سطح زیادتر شوری (۱۵۰ میلی‌مولار) نسبت به دیگر تیمارها بیشتر بود. پرولین به سرعت تغییرات محیط آبی سلول را تنظیم می‌کند و از طریق تنظیم اسمزی از تلفات آب برگ‌ها جلوگیری می‌کند. انباشت پرولین واکنش سریعی نسبت به تغییرات وضعیت آبی (RWC) و پتانسیل آب برگ‌ها را نشان می‌دهد و با کاهش رشد در بخش هوایی همراه

است (۳۴). بنابراین، افزایش میزان پرولین، تحت تنش شوری، با کاهش RWC منطبق است. در این آزمایش، علی‌رغم افزایش محتوای نسبی آب برگ در شرایط پیش‌تیمار کیتوزان، اختلافی در میزان پرولین بین سطوح کیتوزان و عدم پیش‌تیمار کیتوزان مشاهده نشده است.

نتایج داده‌ها نشان داد که میزان آنتوسیانین تحت تأثیر تیمار شوری و پیش‌تیمار کیتوزان قرار گرفت. افزایش شوری تا سطح ۱۵۰ میلی‌مولار باعث افزایش ۳۰ درصدی میزان آنتوسیانین نسبت به تیمار شاهد شد. ولی سطح ۲۵۰ میلی‌مولار شوری باعث کاهش میزان آنتوسیانین شد. عوامل محیطی تنش‌زا از قبیل شوری، خشکی، سرما، اشعه فرابنفش و آلودگی هوا باعث تجمع رنگدانه آنتوسیانین در برگ‌ها می‌شوند. از نقش‌های اصلی آنتوسیانین‌ها می‌توان به نقش آنتی‌اکسیدانی و محافظت سیستم فتوسنتزی در برابر فتواکسیداسیون اشاره نمود که در گیاهان در معرض تنش نقش محافظتی ایفا می‌کنند (۱۶). در گیاه *Grevillea ilicifolia R.Br.* به هنگام شوری، مقدار آنتوسیانین‌ها افزایش نشان داده که به نظر می‌رسد آنتوسیانین‌ها بتوانند در شرایط تنش آبی یا شوری به عنوان یک محلول سازگار کننده اسمزی عمل کنند (۱۹). گزارش‌هایی از محتوای زیاد آنتوسیانین در گیاهان بردبار به شوری در دست است (۴۲). نتایج مقایسه میانگین‌ها نشان داد که پیش‌تیمار کیتوزان باعث افزایش آنتوسیانین شنبلیله به میزان ۱۲٪ نسبت به تیمار شاهد شد (جدول ۲). آنتوسیانین‌ها جزو متابولیت‌های ثانویه گیاهان محسوب می‌شوند که از مسیر فنیل پروپانویید سنتز می‌شوند و توانایی جذب رادیکال‌های آزاد را در هنگام تنش دارند. گزارش شده است که کیتوزان از طریق تأثیر بر فعالیت آنزیم PAL کلیدی مسیر تولید مشتقات فنیل پروپانوییدی باعث افزایش آنتوسیانین در گیاه می‌شود (۱۰).

مقایسه میانگین داده‌های رنگدانه‌های فتوسنتزی برگ گیاه شنبلیله شامل کلروفیل a، کلروفیل b، کاروتنوئیدها و نهایتاً کلروفیل کل نشان داد که مقادیر این صفت با افزایش میزان شوری کاهش معنی‌داری نسبت به شاهد در پی داشت که نشان

همکاران (۲۳) دریافتند که کیتوزان در افزایش کلروفیل و فتوستتزی نقش دارد و علاوه بر این، آن‌ها ثابت کردند که کیتوزان بیان ژن کلروپلاست برگ را تحت تأثیر قرار می‌دهد. به‌طوری که تغییرات در اندازه کلروپلاست ممکن است عامل تحریک کننده رشد گیاهان باشد. همچنین، اثر متقابل شوری و کیتوزان بر میزان کاروتنوئیدها نشان می‌دهد که تیمار ۵/۰ گرم در لیتر کیتوزان، در حضور شوری، توانسته میزان این صفت را نسبت به شاهد به طور معنی‌داری افزایش دهد (جدول ۳).

نتیجه‌گیری

نتایج به دست آمده نشان می‌دهد که تنش شوری باعث کاهش رنگیزه‌های فتوستتزی گیاه شنبلیله شده، ولی میزان پرولین و آنتوسیانین برگ در شرایط شوری افزایش داشتند. افزایش میزان پرولین و آنتوسیانین تا سطح مشخصی از شوری نشان دهنده ایجاد مکانیزم مقاومت نسبی شنبلیله به شوری می‌باشد. پیش‌تیمار بذر شنبلیله با کیتوزان اثر مثبتی بر رشد گیاه داشته و از طریق افزایش محتوای نسبی آب برگ، منجر به حفظ تورم و حجم برگ شده و غشای سلولی را محافظت می‌کند و همچنین با افزایش و حفظ رنگیزه‌های فتوستتزی در شرایط تنش شوری موجب بهبود رشد و صفات فیزیولوژیکی گیاه شنبلیله شده و مقاومت گیاه را در شرایط سخت تنش شوری افزایش می‌دهد. در این مطالعه، با در نظر گرفتن سطح شوری و به منظور بهبود شرایط رشد و نمو گیاه شنبلیله، غلظت یک گرم در لیتر کیتوزان مناسب‌ترین تیمار تشخیص داده شده است.

دهنده حساسیت رنگیزه‌های فتوستتزی شنبلیله به تنش شوری می‌باشد (جدول ۲). کمترین مقدار کلروفیل a و b، کاروتنوئیدها و کلروفیل کل از تیمار ۲۵۰ میلی‌مولار شوری به دست آمد که نسبت به تیمار شاهد به ترتیب به میزان ۳۹/۱، ۵۵/۷، ۵۰/۸ و ۴۴/۸ درصد کاهش نشان داد. پاریدا و داس (۳۳) بیان کردند که محتوای کلروفیل و کاروتنوئیدهای گیاهان تحت شرایط تنش شوری کاهش پیدا می‌کند. همچنین، کاهش میزان کلروفیل و کاروتنوئیدها در شرایط تنش شوری در گیاه گوجه‌فرنگی (*Solanum lycopersicum* L.) توسط تازی (۴۰) گزارش شده است. کاهش مقدار رنگیزه‌های فتوستتزی در شرایط تنش شوری می‌تواند عمدتاً به دلیل تخریب ساختمان کلروپلاست و دستگاه فتوستتزی، فتواکسیداسیون کلروفیل‌ها، واکنش آن‌ها با اکسیژن یکتایی، تخریب پیش‌ماده‌های سنتز کلروفیل و ممانعت از بیوستتزی کلروفیل‌های جدید و فعال شدن آنزیم‌های تجزیه کننده کلروفیل از جمله کلروفیلاز و اختلال هورمونی باشد (۱۸ و ۴۱). علت کاهش مقدار کاروتنوئیدها در شرایط شوری، تخریب بتاکاروتن و تشکیل زاگزانتین می‌باشد (۳۸). مقادیر رنگیزه‌های فتوستتزی، با افزایش کاربرد کیتوزان، به طور معنی‌داری افزایش پیدا کردند (جدول ۲). پیش‌تیمار یک گرم در لیتر توانست نسبت به تیمار ۵/۰ گرم در لیتر، میزان کلروفیل a، b و کلروفیل کل را افزایش دهد. نکته مهم آنکه هر چند با افزایش غلظت نمک در محیط ریشه گیاه، به تدریج از محتوای کلروفیل کل برگ کاسته شده، ولی باید توجه داشت که کاربرد یک گرم در لیتر کیتوزان در مقایسه با عدم کاربرد آن محتوای کلروفیل کل برگ را طی تنش‌های ۱۵۰ و ۲۵۰ میلی‌مولار نمک به ترتیب ۳۴ و ۵۰ درصد افزایش داد (جدول ۳). لیمپاناوج و

منابع مورد استفاده

- احمدی، ا. و ع. سی و سه مرده. ۱۳۸۳. اثر تنش خشکی بر کربوهیدرات‌های محلول، کلروفیل و پرولین در چهار رقم گندم سازگار با شرایط متفاوت اقلیمی ایران. علوم کشاورزی ایران ۳۵(۳): ۷۵۳-۷۶۳.
- حسن زاده، ا. ش. رضازاده، س. ف. شمسا، ر. دولت‌آبادی و ج. زرین قلم. ۱۳۸۹. مروری بر خواص درمانی و فیتوشیمیایی شنبلیله (*Fenugreek*). فصلنامه گیاهان دارویی ۹(۲): ۱-۱۵.
- شکاری، ف. ر. بالجانی، ج. صبا، ک. افصحی. و ف. شکاری. ۱۳۸۹. تأثیر پرایمینگ با سالیسیلیک اسید روی خصوصیات رشدی

گیاهیچه گاوزبان (*Borago officinalis*). مجله دانش نوین کشاورزی ۶(۱۸): ۴۷-۵۳.

۴. کمالی، م.، س. م. خرازی، ی. سلاح‌ورزی و ع. تهرانی‌فر. ۱۳۹۱. اثر سالیسیلیک اسید بر رشد و برخی خصوصیات مورفولوژیک گل تکمه‌ای (*Gomphrena globosa* L.) در شرایط تنش شوری. نشریه علوم باغبانی (علوم و صنایع کشاورزی) ۲۶(۱): ۱۰۴-۱۱۲.

۵. میرمحمدی میدی، س. و ب. قره‌یاضی. ۱۳۸۱. جنبه‌های فیزیولوژیک و بهنژادی تنش شوری گیاهان. مرکز نشر دانشگاه صنعتی اصفهان.

6. Agrawal, G.K., R. Rakwal, S. Tamogami, M. Yonekura, A. Kubo and H. Saji. 2002. Chitosan activates defense/stress response(s) in the leaves of *Oryza sativa* seedlings. *Plant Physiol. Biochem.* 40: 1061-1069.
7. Alebrahim, M.T., N. Sabaghnia, A. Ebadi and M. Mohebodini. 2004. Investigation th effect of salt and drought stress on seed germination of thyme medicinal plant (*Thymus vulgaris*). *J. Res. Agric. Sci.* 1: 13-20.
8. Arnon, A.N. 1967. Method of extraction of chlorophyll in the plants. *Agron. J.* 23: 112-121.
9. Bates, L.S., R.P. Waldern and I.D. Teare. 1973. Rapid determination of free proline for water stress studies. *Plant Soil* 39(1): 205-207.
10. Chakraborty, M., A. Karun and A. Mitra. 2009. Accumulation of phenylpropanoid derivatives in chitosan-induced cell suspension culture of *Cocos nucifera*. *J. Plant Physiol.* 166: 63-71.
11. Demiral, M.A., M. Aydin and A. Yorulmaz. 2005. Effect of salinity on growth, chemical composition and antioxidative enzyme activity of two malting barley (*Hordeum vulgare* L.) cultivars. *Turk. J. Bot.* 29: 117-123.
12. Dzung, N.A. and N.T. Thang. 2002. Effects of oligoglucosamine prepared by enzyme degradation on the growth of soybean. PP. 463-467. In: Suchiva, V.K., S. Chandkrachang, P. Methacanon and M.G. Peter (Eds.), *Adv. Chitin Sci.*, Bangkok.
13. Fazli, F. and R. Hardman. 1968. The spice, fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* L.): Its commercial varieties of seed as a source of diosgenin. *Trop. Sci.* 10: 66-78.
14. Garg, N. and R. Singla. 2009. Variability in the response of chickpea cultivars to short-term salinity, in terms of water retention capacity, membrane permeability, and osmo-protection. *Turk. J. Agric. For.* 33: 57-63.
15. Guan, Y.J., J. Hu, X.J. Wang and C.X. Shao. 2009. Seed priming with chitosan improves maize germination and seedling growth in relation to physiological changes under low temperature stress. *J. Zhejiang Univ. Sci.* 10(6): 427-433.
16. He, F., L. Mu, G.L. Yan, N. Liang, J. Wang, M. Reeves and C. Duan. 2010. Biosynthesis of anthocyanins and their regulation in colored grapes. *Molecules* 15: 9057-9091.
17. Hussain, A., Z.I. Khan, M. Ashraf, H.M. Rashid and M.S. Akhtar. 2004. Effect of salt stress on some growth attributes of sugarcane cultivars CP-77-400 and CoJ- 84. *Int. J. Agric. Biol.* 6(1): 188-191.
18. Kabir, M.E., M.A. Karim and M. Azad. 2004. Effect of potassium on salinity tolerance of mungbean (*Vigna radiata* L. Wilczek). *J. Biol. Sci.* 4: 103-110.
19. Kennedy, B.F. and L.F. De Filippis. 1999. Physiological and oxidative response to NaCl of the salt tolerant *Grevillea ilicifolia* and the salt sensitive *Grevillea arenaria*. *J. Plant Physiol.* 155: 746-754.
20. Khan, M.A., M.Z. Ahmad and A. Hameed. 2006. Effect of sea salt and L-ascorbic acid on the seed germination of halophytes. *J. Arid Environ.* 67: 535-540.
21. Lacerda, C.F.D., J. Cambraia, M.A. Oliva, H.A. Ruiz and J.T. Prisco. 2003. Solute accumulation and distribution during shoot and leaf development in two sorghum genotypes under salt stress. *Environ. Exp. Bot.* 49: 107-120.
22. Lauchli, A. and E. Epstein. 1984. How plants adapt to salinity. *California Agric.* 38: 18-20.
23. Limpanavech, P., S. Chaiyasuta, R. Vongprommek, R. Pichyangkura, C. Khunwasi, S. Chadchawan, P. Lotrakul, R. Bunjongrat, A. Chaidee and T. Bangyeekhun. 2008. Chitosan effects on floral production, gene expression, and anatomical changes in the *Dendrobium* orchid. *Sci. Hort.* 116: 65-72.
24. Lynch, J. and A. Lauchli. 1988. Salinity affects intracellular calcium in corn root protoplasts. *Plant Physiol.* 87: 351-356.
25. Ma, L., Y. Li, C. Yu, Q. Chen and N. Bu. 2011. Alleviation of exogenous oligochitosan on wheat seedlings growth under salt stress. *Protoplasma* 249: 393-399.
26. Mahdavi, B. and A. Rahimi. 2013. Seed priming with chitosan improves the germination and growth performance of ajowan (*Carum copticum*) under salt stress. *Eurasian J. Biosci.* 7: 69-76.
27. Marschner, H. 1995. *Mineral Nutrition of Higher Plants*. Academic Press, London.
28. Misra, N. and U.N. Dwivedi. 2004. Genotypic difference in salinity tolerance of green gram cultivars. *Plant Sci.* 166: 1135-1142.

29. Montanari, M., E. Degl-Innocenti, R. Maggini, S. Pacifici, A. Pardossi and L. Guidi. 2008. Effect of nitrate fertilization and saline stress on the contents of active constituents of *Echinacea angustifolia* DC. *Food Chem.* 107(4): 1461-1466.
30. Munns, R. 2002. Comparative physiology of salt and water stress. *Plant Cell Environ.* 25(2): 239-250.
31. Nazarbeygi, E., H. Lari-Yazdi, R. Naseri and R. Soleimani. 2011. The effects of different levels of salinity on proline and a-, b- chlorophylls in canola. *American-Eurasian J. Agric. Environ. Sci.* 10: 70-74.
32. Noreen, S. and M. Ashraf. 2008. Alleviation of adverse effects of salt stress on (*Helianthus annuus* L.) by exogenous application of salicylic acid: Growth and photosynthesis. *Pak. J. Bot.* 40(4): 1657-1663.
33. Parida, A. and A.B. Das. 2005. Salt tolerance and salinity effects on plants: A review. *Ecotox. Environ. Safe.* 60: 324-349.
34. Rajagopal, V., V. Balasubramanian and K. Sinha. 1977. Diurnal fluctuations in relative water content, nitrate reductase and proline content in water-stressed and non-stressed wheat. *Physiol. Plant.* 40: 69-71.
35. Safarnejad, A., A. Sadr and H. Hamidi. 2008. Salt effects on morphologic characteristics of *Nigella sativa*. *J. Rangeland For. Plant Breed. Gen. Res.* 15: 75-84.
36. Saqib, M., J. Akhtar and R.H. Qureshi. 2005. Na⁺ exclusion and salt resistance of wheat (*Triticum aestivum*) in saline-waterlogged conditions are improved by the development of adventitious nodal roots and cortical root aerenchyma. *Plant Sci.* 169: 125-130.
37. Schutz H. and Fangmier E. 2001. Growth and yield responses of spring wheat (*Triticum aestivum* L.) to elevated CO₂ and water limitation. *Environ. Pollut.* 114: 187-194.
38. Sultana, N., T. Ikeda and R. Itoh. 1999. Effect of NaCl salinity on photosynthesis and dry matter accumulation in developing rice grains. *Environ. Exp. Bot.* 42: 211-220.
39. Tanou, G., A. Molassiotis and G. Diamantidis. 2009. Induction of reactive oxygen species and necrotic death-like destruction in strawberry leaves by salinity. *Environ. Exp. Bot.* 65(3): 270-281.
40. Tari, B. 2009. Acclimation of tomato plants to salinity stress after a salicylic acid pretreatment. *Act. Biol. Szegediensis* 46: 55-56.
42. Wahid, A. and A. Ghazanfar. 2006. Possible involvement of some secondary metabolites in salt tolerance of sugarcane. *J. Plant Physiol.* 163: 723-730.
41. Wagner, G.J. 1979. Content and vacuole/extra vacuole distribution of neutral sugars, free amino acids, and anthocyanine in protoplast. *Plant Physiol.* 64: 88-93.
43. Zhang, S., J. Weng, J. Pan, T. Tu, S. Yao and C. Xu. 2003. Study on the photogeneration of superoxide radicals in photosystem II with EPR spin trapping techniques. *Photosynth. Res.* 75:41-48.