اثر طول زمان پیش‌تیمار با سیلیکون بر تحمل شوری در گیاه گاوزبان ایرانی (*Echium amoenum* Fisch & C.A. mey)

مهشید سعادتمند[1*] و شکوفه انتشاری[2]

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۰/۱۱/۴ ؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۱/۲/۲۹)

چکیده

سیلیکون اثرهای مفیدی بر رشد، عملکرد و بهبود تحمل برخی گیاهان در برابر تنش‌های زیستی و غیرزیستی دارد. به‌منظور مطالعه تأثیر غلظت‌های مختلف سیلیکون بر گیاه گاوزبان ایرانی (*Echium amoenum* Fisch & C.A. Mey.) سه سطح سیلیکون (صفر، ۰/۲ و ۰/۷ میلی‌مولار از منبع نمک سیلیکات سدیم) و دو سطح شوری (صفر و ۱۰۰ میلی‌مولار از کلرید سدیم) و دو دوره تیمار سیلیکون بلند مدت (۳۰ روز) و کوتاه مدت (۱۵ روز) در نظر گرفته شد و گیاه گاوزبان در محیط آبکشت در گلخانه کشت و با این سطوح تیمار گردید. آزمایش در یک طرح کاملاً تصادفی با دو فاکتور سیلیکون و شوری و ۴ تکرار انجام شد و تعدادی از پارامترهای بیوشیمیایی و فیزیولوژی در مواجهه با تنش شوری و سیلیکون در کوتاه مدت و بلند مدت مورد بررسی قرار گرفت. براساس نتایج به‌دست آمده، میزان پرولین، قند احیا، آنتوسیانین، مالوندی‌آلدئید، کلروفیل کل و وزن تر و خشک به‌طور معنی‌داری (در سطح ۵%) در تیمار سیلیکون بلند مدت تغییر یافته و تفاوت‌هایی با تیمار سیلیکون کوتاه مدت داشت. به‌طورکلی، نتایج حاصل از این پژوهش تأثیر غلظت مناسب سیلیکون (۰/۲ میلی‌مولار) و طول تیمار بلند مدت (۳۰ روز) با سیلیکون در تحمل تنش شوری در گیاه گاوزبان ایرانی را اثبات می‌کند.

واژه‌های کلیدی: گیاهان دارویی، تنش شوری، مالوندی‌آلدئید

۱. مرکز پژوهشی کشت بدون خاک، دانشگاه صنعتی اصفهان

۲. گروه زیست‌شناسی دانشگاه پیام نور، تهران

* : مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: msaadat@sepahan.iut.ac.ir

[Downloaded from jspi.iut.ac.ir on 2024-08-17]

[DOR: 20.1001.1.20089082.1391.3.4.4.8]

مقدمه

ایران با دارا بودن یازده منطقه اقلیمی و بیش از ۸۰۰۰ گونه گیاهی، محل رویش حدود ۱۴۰۰ گونه دارویی بوده و بستر مناسبی برای دستیابی به‌گونه‌های با ارزش دارویی و نادر است. گاوزبان ایرانی (*Echium amoenum* Fisch. & C. A. mey.) گیاهی علفی، دو ساله، روزبلند، با برگ‌ها و ساقه‌های منشعب شیاردار و پوشیده از کرک‌های خشن است. برگ‌های این گیاه پهن، بزرگ، منفرد و ساده است که در پایین ساقه دمبرگ‌دار و در بالای ساقه فاقد دمبرگ هستند (۴، ۵ و ۲۰). این گیاه دارای مقدار جزئی اسانس، موسیلاژ، صمغ، تانن، املاح منگنز و منیزیم و مواد معدنی دیگر است. در برگ‌ها نیترات دوپتاس و در بذر روغن مرغوبی وجود دارد که حدود ۲۳% آن اسید لینولئیک است. مواد دیگری نیز نظیر رزین‌ها، مالات کلسیم، مقدار بسیار جزئی اسانس، املاح منگنز، منیزیم، اسید فسفریک و مقدار بسیار جزئی از آلانتوئین در آن یافت می‌شود (۵ و ۱۹). در طب سنتی، مواد مؤثر موجود در گل‌ها و سرشاخه‌های آن برای تصفیه خون، نرم‌کنندگی سینه، تقویت قلب، به‌عنوان مدر، معرق، آرام بخش و موارد متعدد درمانی دیگری استفاده می‌شود. به‌علاوه، از آن نوعی تنطور و ورنی آبی رنگ تهیه می‌شود (۵). به‌علت وجود مادهٔ پیرولیزیدین که از سموم کبدی است، امروزه مصرف این گیاه کم شده (۲۰)، ولی به‌علت وجود روغن مرغوب در بذر گیاه، کشت گستردهٔ آن به‌عنوان دانه روغنی مرسوم شده است. گل آن مورد توجه زنبور عسل است (۴). از آنجا که کشت این گیاه به‌عنوان یک گیاه دارویی مورد توجه بوده است بررسی عوامل مختلف مؤثر بر رشد آن نیز اهمیت دارد.

شوری یکی از عوامل مهم کاهش‌دهنده رشد گیاهان در بسیاری از مناطق جهان است. وسعت خاک‌های شور در ایران حدود ۲۴ میلیون هکتار است که معادل ۱۵% از اراضی کشاورزی کشور می‌باشد (۲). شوری، پتانسیل آب محیط ریشه را کاهش داده و کم شدن توان جذب آب توسط گیاه را سبب می‌شود. به‌علاوه، با افزایش شوری در محیط ریشه، جذب و انتقال یون‌های سمی به بافت‌های گیاه افزایش می‌یابد و کاهش جذب عناصر ضروری، به‌هم خوردن توازن یونی و سمیت ناشی از انباشتگی یون‌های سدیم و کلر را به‌دنبال دارد (۲ و ۱۱). یکی از راهکارهای کاهش اثرهای زیانبار تنش شوری استفاده از روش‌های صحیح تغذیه معدنی گیاهان است که نقش قابل ملاحظه‌ای در افزایش عملکرد دارند. در همین ارتباط، نقش برخی عناصر نظیر سیلیکون مورد توجه برخی متخصصین تغذیه گیاهی قرار گرفته است (۳). سیلیکون برای گیاهان تیره گندم، جگن و دم اسب به‌عنوان یک عنصر ضروری شناخته شده است، درحالی‌که این عنصر برای دولپه‌ای‌ها لازم نیست. این عنصر می‌تواند باعث افزایش تولید و کیفیت محصول، کاهش تبخیر و تعرق، افزایش مقاومت به‌تنش شوری، خشکی و سمیت فلزات سنگین، افزایش تحریک تولید برخی آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان و کاهش حساسیت به‌بعضی بیماری‌های قارچی شود (۳). نتایج برخی پژوهش‌ها نشان می‌دهد که سیلیکون در گیاهان یک عامل فعال‌کننده است. در واقع این عنصر ممکن است به‌عنوان علامتی برای فعال کردن پاسخ‌های دفاعی در برابر بیماری‌های گیاهی عمل کند. افزایش فعالیت آنزیم کیتیناز توسط سیلیکون به اثبات رسیده است. سیلیکون هم‌چنین فعال شدن آنزیم‌های پراکسیداز و پلی‌فنل اکسیداز در حضور عوامل بیماری‌زای قارچی را تسریع می‌کند (۱۳). تأثیر سیلیکون بر عملکرد گیاه ممکن است به‌دلیل رسوب آن در پهنای برگ، افزایش استحکام برگ‌ها و نیز افزایش غلظت کلروفیل در واحد سطح برگ باشد، که از این طریق توانایی گیاه برای استفاده مؤثر از نور را بالا می‌برد (۱۲). این تحقیق با هدف تعیین طول دوره و تأثیر سیلیکون بر برخی خصوصیات فیزیولوژیک و بیوشیمیایی گیاه گاوزبان ایرانی تحت تنش شوری انجام شده است.

مواد و روش‌ها

تهیه بذر، پرورش گیاه و اعمال تیمار

بذرهای این گیاه از مرکز تحقیقات نکا تهیه شد. آزمایش‌های این تحقیق در گلخانه مرکز پژوهشی کشت بدون خاک دانشگاه

[Downloaded from jspi.iut.ac.ir on 2024-08-17]

[DOR: 20.1001.1.20089082.1391.3.4.4.8]

صنعتی اصفهان در تابستان ۱۳۸۹ انجام شد. آزمایش به‌صورت فاکتوریل و در قالب طرح پایه کاملاً تصادفی با فاکتور سیلیکون در سه سطح (صفر، ۰/۲ و ۰/۷ میلی‌مولار) و شوری در دو سطح (صفر و ۱۰۰ میلی‌مولار) و با چهار تکرار و تعداد ۳ بوته در هر تکرار انجام شد. در این آزمایش از ظروف پلاستیکی ۲ لیتری استفاده شد. محلول غذایی پایه لانگ آشتون (جدول ۱) انتخاب و برای تیمار شوری از کلرید سدیم و برای تیمار سیلیکون از سیلیکات سدیم استفاده شد. بذرهای گاوزبان ایرانی پس از ضدعفونی توسط قارچ‌کش بنومیل و شستشو با آب مقطر برای جوانه‌زنی به ظروف ماسه شسته شده انتقال داده و آبیاری شدند و پس از جوانه زدن، تغذیه بوته‌ها تا مرحله دو برگی به‌وسیله محلول یک دوم لانگ آشتون انجام گرفت. بعد از رشد دومین برگ، گیاهچه‌ها به‌ظروف دو لیتری حاوی محلول غذایی منتقل گردیدند. پس از طی مدت ۴ هفته از رشد گیاهان، تیمار سیلیکون در سطوح صفر، ۰/۲، و ۰/۷ میلی‌مولار از نمک سیلیکات سدیم در دو دوره ۳۰ و ۱۵ روزه اعمال گردید. سپس، شوری در دو سطح (صفر و ۱۰۰) میلی‌مولار به‌مدت ۲ هفته اعمال گردید. میانگین دمای محیط گلخانه در طی دوره آزمایش در شب ۳±۲۱ و در روز ۳±۲۴ درجه سلسیوس و رطوبت نسبی ۴۵% بود. پ- هاش محلول غذایی توسط KOH و H_2SO_4 بین ۶/۵ تا ۷ تنظیم گردید. پس از طی دوره، ابتدا میزان کلروفیل گیاه به‌کمک دستگاه کلروفیلمتر رقمی اندازه‌گیری و سپس گیاهان از محل طوقه قطع شده و برداشت گردیدند و بلافاصله وزن تر اندام هوایی و ریشه به‌وسیله ترازوی دیجیتال اندازه‌گیری شد و بعد از خشک شدن نیز وزن آنها اندازه‌گیری گردید.

اندازه‌گیری میزان پرولین

ابتدا ۰/۱۲۵ گرم نایین هیدرین به ۲ میلی‌لیتر اسید استیک گلاسیال اضافه و محلول گرم شد (۱۰). سپس ۲ میلی‌لیتر اسید فسفریک ۶ مولار به آن اضافه و محلول به‌مدت ۲۴ ساعت در یخچال نگهداری شد. مقدار ۰/۰۵ گرم ماده تر را در ۵ میلی‌لیتر محلول اسید سولف سالیسلیک (۳%) ساییده و با کاغذ واتمن صاف گردید. دو میلی‌لیتر از عصاره صاف شده را با ۲ میلی‌لیتر محلول اسید نایین هیدرین و ۲ میلی‌لیتر اسید استیک مخلوط و ۳۰ دقیقه در دمای ۱۰۰ درجه قرار داده شد. سپس لوله‌ها را در حمام یخ قرار داده تا سرد شدند. به لوله‌ها ۶ میلی‌لیتر تولوئن اضافه و لوله‌ها به‌خوبی تکان داده شدند. با ثابت نگه داشتن لوله‌ها به‌مدت ۲۰ ثانیه، دو لایه مجزا که حاوی تولوئن و پرولین است تشکیل شد که میزان پرولین در طول موج ۵۲۰ نانومتر و با شاهد تولوئن اندازه‌گیری گردید.

اندازه‌گیری قندهای احیا کننده

میزان قندهای احیاکننده در برگ‌ها و ریشه‌ها با استفاده از روش سوموجی- نلسون (۳۳) اندازه‌گیری شد. در آزمایش انجام شده، وجود قندهای احیاکننده در محلول باعث احیای Cu_2O می‌شود. سپس سولفات مس باعث احیای فسفومولبیدیک اسید موجود در محیط آزمایش می‌گردد که تولید رنگ آبی می‌کند. شدت رنگ تشکیل شده، که رابطه مستقیم با مقدار قندهای احیاکننده در محلول دارد، توسط اسپکتروفتومتر قابل سنجش است.

اندازه‌گیری آنتوسیانین

از روش واگنر (۳۹) جهت اندازه‌گیری مقدار آنتوسیانین‌های برگ استفاده شد. دیسک‌های برگی تهیه شده از گیاه را در هاون چینی با مقداری متانول اسیدی (متانول خالص و اسید کلریدریک خالص به نسبت حجمی ۹۹ : ۱) کاملاً سائیده و عصاره در لوله‌های آزمایش سرپیچ‌دار ریخته شد و به مدت ۲۴ ساعت در تاریکی و دمای ۲۵ درجه سلسیوس قرار گرفت. پس از این به‌مدت ۱۰ دقیقه در دور ۴۰۰۰g عصاره را سانتریفیوژ نموده و جذب محلول رویی با استفاده از اسپکتوفتومتر در طول موج ۵۵۰ نانومتر خوانده شد. مقدار آنتوسیانین با استفاده از فرمول $A=\varepsilon bc$ به‌دست آمد که در آن مقدار ε یا ضریب خاموشی معادل $33000\ mM^{-1}\ cm$، A مقدار جذب، b عرض سلول اندازه‌گیری برابر با یک سانتی‌متر و c مقدار آنتوسیانین برحسب مول بر گرم وزن تر گیاه می‌باشد.

[Downloaded from jspi.iut.ac.ir on 2024-08-17]

[DOR: 20.1001.1.20089082.1391.3.4.4.8]

جدول ۱. ترکیب شیمیایی محلول غذایی لانگ آشتون

محلول استفاده شده (میلی‌گرم بر لیتر)	محلول پایه (گرم بر لیتر عناصر غذایی مورد استفاده)
عناصر غذایی پرمصرف	
۸	۵۰/۶۰
۸	۸۰/۲۵
۸	۴۶/۰۰
۴	۵۲/۰۰
عناصر غذایی کم مصرف	
۵	۳/۳۰
۱	۲/۲۳
۱	۰/۲۹
۱	۰/۲۵
۱	۳/۱۰
۱	۰/۱۲
۱	۵/۸۵
۱	۰/۰۵۶

اندازه‌گیری مالون‌دی‌آلدئید

از روش هیت- پکر (۱۸) برای اندازه‌گیری مالون‌دی‌آلدئید استفاده شد. مقدار ۰/۱ گرم از بافت تازه برگی توزین شده و در هاون چینی حاوی ۵ میلی‌لیتر اسید تری‌کلرو استیک (TCA) ۰/۱ درصد سائیده شد. عصاره حاصل با استفاده از دستگاه سانتریفیوژ به‌مدت ۵ دقیقه در g ۱۰۰۰۰ سانتریفیوژ شد. به ۱ میلی‌لیتر از محلول رویی حاصل از سانتریفیوژ، ۴/۵ میلی‌لیتر محلول TCA ۲۰ درصد که حاوی ۰/۵ درصد اسید تیوباربیتوریک (TBA) بود اضافه شد. مخلوط حاصل به‌مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سلسیوس حمام آبگرم حرارت داده شد. سپس بلافاصله در یخ سرد شد و دوباره مخلوط به مدت ۱۰ دقیقه در g ۱۰۰۰۰ سانتریفیوژ گردید. شدت جذب این محلول با استفاده از اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۳۲ نانومتر خوانده شد. ماده مورد نظر برای جذب در این طول موج کمپلکس قرمز (MDA – TBA) است. جذب بقیه رنگیزه‌های غیراختصاصی در ۶۰۰ نانومتر تعیین و از این مقدار کسر گردید. برای محاسبه غلظت MDA از ضریب خاموشی معادل $155\ mMcm^{-1}$ استفاده شد و نتایج حاصل از اندازه‌گیری برحسب وزن تر محاسبه و ارائه گردید.

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها از قبیل آزمون نرمال بودن توزیع داده‌ها، تجزیه واریانس، مقایسه میانگین‌ها و تجزیه رگرسیون با استفاده از نرم‌افزارهای SPSS و MSTAT-C انجام شد. مقایسه میانگین‌ها با آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۵% انجام و نمودارها با نرم‌افزار Excel رسم شد.

نتایج و بحث

نتایج تجزیه واریانس (جدول ۲) نشان داد که مقدار وزن تر و خشک قسمت هوایی و کلروفیل در تیمار سیلیکون بلند مدت افزایش یافته ولی در تیمارهای ۰/۲ و ۰/۷ اختلاف معنی‌داری با هم نداشتند. ساموئلز و همکاران (۳۲) نیز نشان دادند که افزایش رشد و عملکرد گیاه در حضور سیلیکون از طریق بهبود توانایی مکانیکی ساقه و برگ‌ها در جذب نور و افزایش ظرفیت

[Downloaded from jspi.iut.ac.ir on 2024-08-17]

[DOR: 20.1001.1.20089082.1391.3.4.4.8]

جدول ۲. مقایسه میانگین تیمارهای شوری و سیلیکون به‌صورت جداگانه در گاوزبان ایرانی

منابع تغییر	وزن تر هوایی (گرم)	وزن تر ریشه (گرم)	وزن خشک هوایی (گرم)	وزن خشک ریشه (گرم)	میزان کلروفیل (SPAD)
سطح سیلیکون (میلی‌مولار) بلند مدت					
سطح شوری (میلی‌مولار) =صفر					
صفر	۱۸/۸b	۲۱/۸c	۲/۵c	۲/۴a	۵۷/۵b
۰/۲	۲۴/۸a	۳۵/۶a	۴/۴a	۳/۳a	۶۸a
۰/۷	۲۵/۸a	۲۷/۶b	۴/۲a	۲/۸a	۶۵/۶a
سطح سیلیکون (میلی‌مولار) بلند مدت					
سطح شوری (میلی‌مولار)=۱۰۰					
صفر	۸/۳e	۴/۷f	۱/۶d	۰/۴c	۵۱/۳c
۰/۲	۱۱/۳d	۹/۸d	۲/۱d	۱b	۵۹/۷b
۰/۷	۱۶/۶c	۱۷/۱d	۳/۳b	۱/۷b	۴۸/۱c
سطح سیلیکون (میلی‌مولار) کوتاه مدت					
سطح شوری (میلی‌مولار)=صفر					
صفر					۰/۶۲a
۰/۲			-		۵۶/۳b
۰/۷					۵۸/۲b
سطح سیلیکون (میلی‌مولار) کوتاه مدت					
سطح شوری (میلی‌مولار)=۱۰۰					
صفر					۵۴/۷c
۰/۲			-		۵۰/۰d
۰/۷					۵۲/۴d

در هر ستون، میانگین‌هایی که حداقل دارای یک حرف مشترک باشند طبق آزمون دانکن در سطح ۵% با یکدیگر اختلاف معنی‌داری ندارند.

فتوسنتزی گیاه می‌باشد. نتایج بسیاری از تحقیقات نیز حاکی از تأثیر مثبت کاربرد سیلیکون بر عملکرد گیاه می‌باشد. تیمار شوری باعث کاهش معنی‌دار وزن خشک اندام هوایی و ریشه و محتوای کلروفیل شد. ظفر و همکاران (۴۳) نشان دادند که زیست‌توده (وزن خشک) رابطه معکوسی با شوری دارد. شوری باعث کاهش سطح برگ و زیست‌توده می‌گردد. با افزایش شوری، میزان کلروفیل کاهش یافته که می‌تواند به‌دلیل تولید برگ‌های کوچک‌تر باشد و کاهش سطح برگ نیز منجر به کاهش فتوسنتز می‌شود (۲۹).

با توجه به‌جدول ۲ می‌توان چنین نتیجه گرفت که میزان کلروفیل با افزایش مقدار سیلیکون در طول دوره بلند مدت سیلیکون افزایش یافته ولی بین دو غلظت ۰/۲ و ۰/۷ میلی‌مولار اختلاف معنی‌داری وجود ندارد. به نظر می‌رسد که سیلیکون با تأثیر بر کلروفیل موجود در واحد سطح، توانایی گیاه برای استفاده مؤثرتر از نور را بالا برده است (۷). در تحقیق دیگری که توسط نویسندگان انجام گرفته مشخص گردید (نتایج منتشر نشده است) در تیمار ۰/۲ میلی‌مولار سیلیکون فشردگی پارانشیم نردبانی حدود ۱۶۰% نسبت به شاهد افزایش نشان می‌داد و در تیمار شوری غلظت ۰/۲ میلی‌مولار سیلیکون با ممانعت از کاهش بیش از حد کلروفیل، جلوگیری از آسیب فتوسیستم II، مقاومت بیشتری در تنش شوری را نشان می‌دهد. ال- آقاباری و همکاران (۹) گزارش کردند که این عنصر اثر فتوسیستم II را در گوجه‌فرنگی‌های تحت تأثیر تنش شوری بهبود بخشیده است. علاوه بر آن، استعمال سیلیکون تراکم ROS های کاهنده سمیت در شرایط تنش شوری را بهبود بخشیده و بدین ترتیب به افزایش ترکیب کلروفیل و فعالیت فتوسنتز کمک خواهد نمود (۱۴). در

[Downloaded from jspi.iut.ac.ir on 2024-08-17]

[DOR: 20.1001.1.20089082.1391.3.4.4.8]

طول دوره کوتاه مدت، این تغییرات معنی‌دار نبوده که شاید به‌دلیل ناکافی بودن طول دوره اثرگذاری سیلیکون بر گیاه باشد. در واقع، یکی از عوامل افزایش رشد، تغذیه مناسب و کاربرد متناسب آن با دوره رشد گیاه و در فواصل زمانی معین است (۶).

میزان پرولین در برگ و ریشه با افزایش تنش شوری در تیمارهای سیلیکون کوتاه مدت و بلند مدت افزایش معنی‌داری یافت (شکل‌های ۱ و ۲). به‌طوری‌که با افزایش شوری از صفر (شاهد) به ۱۰۰ میلی‌مولار کلرید سدیم، میزان پرولین به‌ترتیب در برگ در تیمار ۰/۲ میلی‌مولار(۱/۶۳)، در تیمار ۰/۷ میلی‌مولار(۰/۳۸)، و در ریشه در تیمار ۰/۲ میلی‌مولار(۱/۲۱)، در تیمار ۰/۷ میلی‌مولار(۰/۳۱) در سیلیکون بلند مدت مشاهد شد. میزان پرولین به‌ترتیب در برگ در تیمار ۰/۲ میلی‌مولار(۱/۰۶)، در تیمار ۰/۷ میلی‌مولار(۰/۵۲) و در ریشه در تیمار ۰/۲ میلی‌مولار(۰/۰۵)، در تیمار ۰/۷ میلی‌مولار(۰/۴۹ میلی‌گرم بر گرم وزن تر) در سیلیکون کوتاه مدت مشاهد شد. بیشترین میزان پرولین برگ در تنش شوری ۱۰۰ و تیمار ۰/۲ میلی‌مولار سیلیکون در سیلیکون بلند مدت و کوتاه مدت بود. در ریشه، در طول دوره بلند مدت سیلیکون، میزان پرولین گروه شاهد با تیمار شده با سیلیکون تفاوت معنی‌داری داشته ولی در دوره کوتاه مدت اختلاف معنی‌دار نبود.

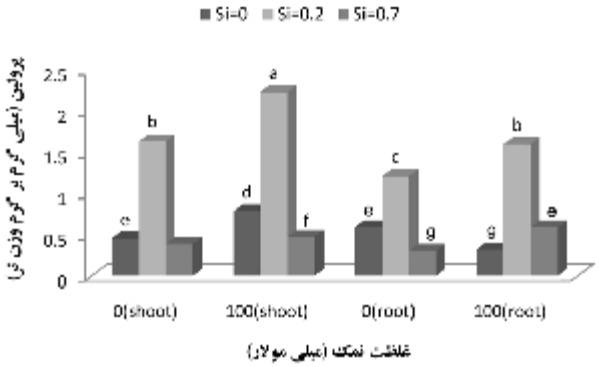
محتوی پرولین با افزایش شوری در تیمارها افزایش یافته که این یکی از سازوکارهای بیوشیمیایی در پاسخ به تنش شوری می‌باشد، در درون سلول‌های گیاهی، پرولین به‌عنوان ماده حفظ تعادل اسمزی بین سیتوپلاسم و واکوئل عمل می‌کند (۲۷). به‌علاوه، پرولین نقش اسیمولاتی به‌عنوان مخزن کربن و نیتروژن دارد. هم‌چنین، پرولین حفاظت گیاه را در برابر صدمات رادیکال‌های آزاد انجام می‌دهد (۳۴). کاهش مصرف پرولین برای سنتز پروتئین در طی تنش ممکن است دلیل احتمالی تجمع پرولین باشد (۱۷). با وارد شدن تنش اسمزی به‌گیاه و به‌هم خوردن تعادل اسمزی، گیاه برای حفظ بقا و تعدیل اسمزی در شرایط شور، اقدام به‌افزایش پرولین و قند به‌عنوان نوعی مکانیسم مقاومت به شوری می‌کند (۳۵ و ۳۷). اثر شوری بر تجمع پرولین در بسیاری از گونه‌های گیاهی نظیر چغندرقند، گوجه‌فرنگی، برنج و توت گزارش شده است (۴۰). در این مطالعه، با مقایسه دو تیمار بلند مدت و کوتاه مدت سیلیکون مشاهده گردید که در تیمار بلند مدت، با افزایش شوری، مقدار پرولین بیشتری تولید شده که نشان‌دهنده متناسب بودن طول دوره تیمار با دوره رشد گیاه است (۶).

شوری، سطح مالون‌دی‌آلدئید را تغییر داده و در غیاب سیلیکون، با اضافه شدن غلظت شوری، مقدار مالون‌دی‌آلدئید افزایش یافته که می‌توان گفت شوری در این گیاه نفوذپذیری و پراکسیداسیون لیپیدها را افزایش داده که استحکام و عمل غشا تحت تأثیر قرار گرفته است (شکل ۳). مقدار مالون‌دی‌آلدئید در تیمار بلند مدت با افزایش شوری افزایش یافته و در سیلیکون ۰/۲ و ۰/۷ میلی‌مولار به‌ترتیب برابر ۱/۰۱ و ۰/۷۵ میکروگرم بر گرم وزن تر بوده و در تیمار ۰/۷ میلی‌مولار توانست تأثیرگذاری بهتری داشته باشد. در تیمار سیلیکون کوتاه مدت، داده‌ها معنی‌دار نبود و ناکافی بودن طول دوره باعث شده اثرگذاری مناسبی انجام نگیرد. همین امر به‌خوبی نشان می‌دهد که سیلیکون در یک طول دوره مناسب می‌تواند پراکسیداسیون چربی‌های غشا را در تنش شوری کاهش دهد. مالون‌دی‌آلدئید یک محصول اکسید شده از لیپیدهای غشایی است و سطح این ماده گسترش تنش اکسیداتیو را نشان می‌دهد (۱۷). تحقیق روی ترکیبات مالون‌دی‌آلدئید آشکار نمود که محصولات غیرمستقیم دیگر نظیر رادیکال‌های سوپراکسید، نتیجهٔ افزایش محصولات پراکسیداسیون لیپیدها و تنش اکسیداتیو می‌باشند. بنابراین غلظت مالون‌دی‌آلدئید به‌عنوان یک شاخص معمولی پراکسیداسیون چربی‌ها بررسی می‌شود (۱۲).

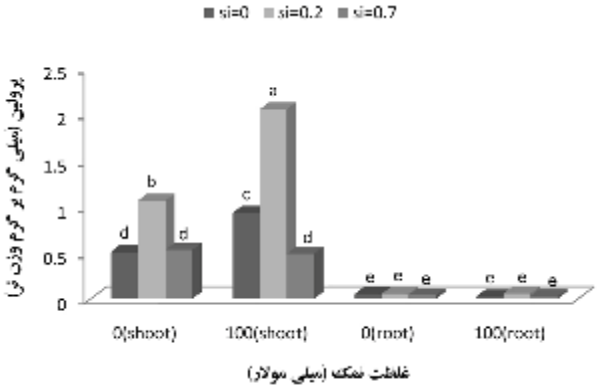
پیش‌تیمار با سیلیکون، مقدار مالون‌دی‌آلدئید را در گیاهان تحت تنش شوری کاهش داده است. سیلیکون اثر ضد تنشی بر گیاهان دارد. افزایش سیلیکون نفوذپذیری غشای سلول‌های برگی را کاهش می‌دهد (۲۴ و ۲۶). پیشنهاد شده است که سیلیکون بر ساختار، استحکام و عمل غشای پلاسمایی با تأثیرگذاری بر پراکسیداسیون وابسته به‌تنش تأثیر می‌گذارد

[Downloaded from jspi.iut.ac.ir on 2024-08-17]

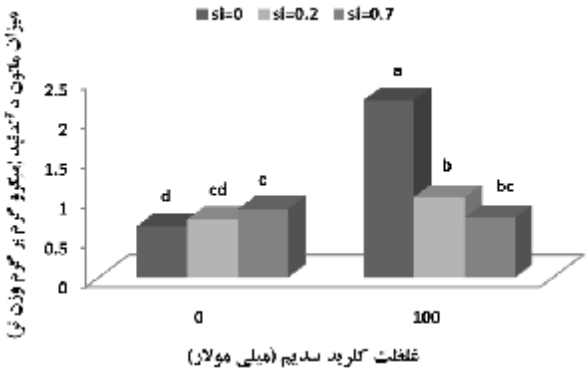
[DOR: 20.1001.1.20089082.1391.3.4.4.8]



شکل ۱. تغییرات محتوای پرولین در بخش هوایی و ریشه در گیاه گاوزبان تحت تیمار سیلیکون بلند مدت و شوری ($P < 0.05$)



شکل ۲. تغییرات محتوای پرولین در بخش هوایی و ریشه در گیاه گاوزبان تحت تیمار سیلیکون کوتاه مدت و شوری ($P < 0.05$)



شکل ۳. تغییرات محتوای مالوندی‌آلدئید در بخش هوایی در گیاه گاوزبان تحت تیمار سیلیکون بلند مدت و شوری ($P < 0.05$)

(۲۴ و ۲۶). سیلیکون با کاهش نفوذپذیری غشای سلولی و حفاظت از ساختار سلولی، با افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان (کاتالاز و سوپراکسید دیسموتاز)، تنش شوری را در ذرت متعادل می‌سازد (۲۰). این عنصر هم‌چنین سیستم تراکمی گیاه را برای مقابله با سمیت ROS (ناشی از تنش) بهبود می‌بخشد (۲۰). یکی از اثرهای تجمع اکسیژن آزاد در سلول‌های گیاهی در شرایط تنش‌زا، پراکسیداسیون چربی‌هاست که با اکسیداسیون اسیدهای چرب اشباع نشده همراه بوده و

[Downloaded from jspi.iut.ac.ir on 2024-08-17]

[DOR: 20.1001.1.20089082.1391.3.4.4.8]

باعث تخریب غشا و نشت الکترولیت‌ها خواهد شد (۲۴). بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که کاهش پراکسیداسیون چربی‌ها در گیاهان تیمار شده با سیلیکون نشان‌دهندهٔ تقویت مکانیسم‌های مقاومتی (احتمالاً ترشح اسیدهای آلی) در این گیاهان است و تیمار ۰/۷ میلی‌مولار سیلیکون در طول دوره بلند مدت مناسب‌ترین اثر گذاری را داشته است.

نتایج تغییرات میزان قند احیا در تیمارهای بلند مدت و کوتاه مدت در شکل‌های ۴ و ۵ نشان داده شده است. مقدار قند احیا هنگام استعمال شوری کاهش می‌یابد و استعمال سیلیکون به‌تنهایی در هر دو دوره بلند مدت و کوتاه مدت باعث کاهش قند احیا گردیده و در بخش زمینی در دوره بلند مدت افزایش میزان قند احیا و در دوره کوتاه مدت در تیمار ۰/۲ میلی‌مولار افزایش مقدار قند احیا را داشتیم. در گیاهانی که تنش شوری متحمل شده بودند در تیمار ۰/۲ میلی‌مولار افزایش در قسمت هوایی (دوره‌های بلند مدت و کوتاه مدت) و در ریشه در بلند مدت افزایش ولی اختلاف معنی‌دار نبوده و در کوتاه مدت بیشترین افزایش قند احیا در تیمار ۰/۲ میلی‌مولار اندازه‌گیری شد.

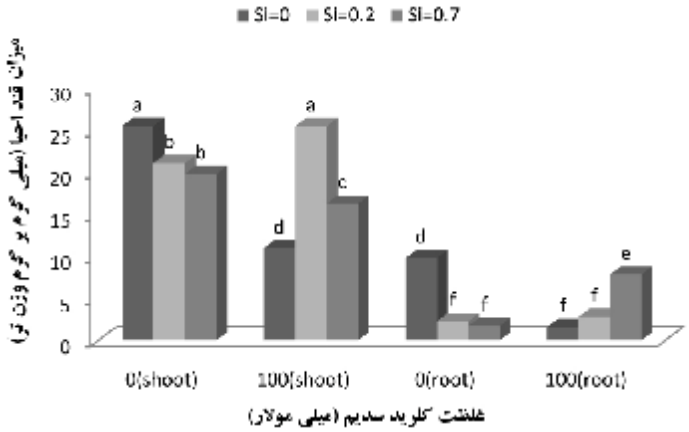
افزایش محتوی قندهای حل‌شونده و احیاکننده در شرایط تنش شوری، غرقابی و سرما گزارش شده است. هوانی و جانسون (۲۲) عقیده دارند که تجمع قندهای احیاکننده در شرایط تنش احتمالاً در تنظیم اسمولاریته درون سلولی و حفاظت مولکول‌های زیستی و غشاها اهمیت دارد. فعالیت آنزیم‌های اینورتاز و ساکاروز سنتاز که دو آنزیم شکست ساکاروز به قندهای غیر احیاکننده در سیتوسل و واکوئل می‌باشند، باعث کاهش محتوی قندهای احیاکننده در گیاه شده و میزان ساکاروز را در دیوارهٔ سلولی واکوئل کاتالیز می‌کند. فعالیت این آنزیم برگشت‌پذیر بوده و نقش مهمی در متابولیسم انرژی با متابولیزه کردن ساکارز به مسیرهای وابسته به متابولیسم و عملکردهای ذخیره‌ای و ساختمانی سلول بازی می‌کند. آنزیم اینورتاز متعلّق به گروهی از آنزیم‌ها با شرایط بهینه پ- هاش خاص و موقعیت قرارگیری ویژه می‌باشد. این آنزیم که ممکن است در واکوئل متصل به دیوارهٔ سلولی باشد، ساکارز را به گلوکز و فروکتوز هیدرولیز می‌کند. از طرف دیگر، در ریشه‌ها ترکیب قند، در مقایسه با گروه کنترل، کاهش می‌یابد و در نتیجه جذب آب و CO_2 در حین فتوسنتز کاهش می‌یابد. این مکانیسم کاهش بیانگر آن است که شوری احتمالاً بعد از تخریب غشای سلول‌های ریشه به‌سلول وارد می‌شود. سپس در درون سلول با ترکیبات دیگر وارد عمل می‌شود و متابولیسم آنها را تحت تأثیر قرار می‌دهد و با افزایش میزان متابولیسم باعث کاهش رشد ساقه‌ها می‌شود.

سیلیکون بر متابولیسم قندها و پخش مواد فتوسنتزی در گیاهان در حال رشد اثر قابل توجهی گذاشته و باعث افزایش آن می‌گردد. به دنبال تجمع شوری در سلول‌ها، سیلیکون محتوی قندهای احیاکننده و محلول را در گیاه افزایش می‌دهد. این پدیده احتمالاً مکانیسم سازش گیاه برای حفظ پتانسیل اسمزی مناسب در شرایط سمیت شوری باشد. پس با توجه به اظهارات ورما و دوبیم (۳۸) می‌توان حدس زد که سیلیکون ذخیرهٔ کربوهیدراتی گیاهان تحت تأثیر تنش را برای فرآیندهای متابولیک و حفظ متابولیسم پایه در حد مطلوب نگه داشته است. سیلیکون با افزایش کربوهیدرات‌ها در شرایط تنش شوری، گیاهان را از تخریب اکسیداتیو محافظت نموده و باعث بقای ساختار غشای پروتئین‌ها خواهد شد. نتیجه‌گیری این‌که در تیمار بلند مدت در بخش هوایی، سیلیکون ۰/۲ میلی‌مولار توانسته بیشترین افزایش میزان قند احیا را جهت سازش هرچه بیشتر گیاه در شرایط سمیت شوری ایجاد کند و در تیمار کوتاه مدت در بخش هوایی، باز سیلیکون ۰/۲ میلی‌مولار توانسته افزایش قند احیای بیشتری داشته باشد که نسبت این افزایش در بلند مدت به کوتاه مدت ۱/۳۲ می‌باشد. طول دوره تیمار سیلیکون بلند مدت و سیلیکون ۰/۲ میلی‌مولار به‌ترتیب طول دوره و غلظت مناسب‌تری برای مواجهه گیاه با شرایط سمیت شوری می‌باشد.

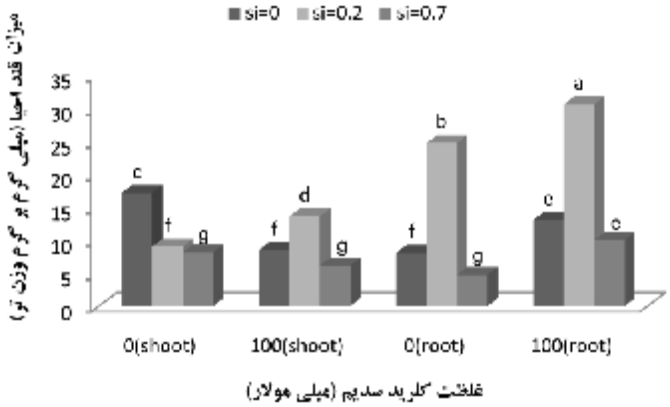
نتایج تغییرات میزان آنتوسیانین در برگ‌های گیاهانی که تحت تیمار سیلیکون و شوری بودند در شکل‌های ۶ و ۷ نشان داده شده است. مقدار آنتوسیانین در تیمار با سیلیکون (بلند

[Downloaded from jspi.iut.ac.ir on 2024-08-17]

[DOR: 20.1001.1.20089082.1391.3.4.4.8]



شکل ۴. تغییرات محتوای قند در بخش هوایی و ریشه در گیاه گاوزبان تحت تیمار سیلیکون بلند مدت و شوری ($P < 0.05$)



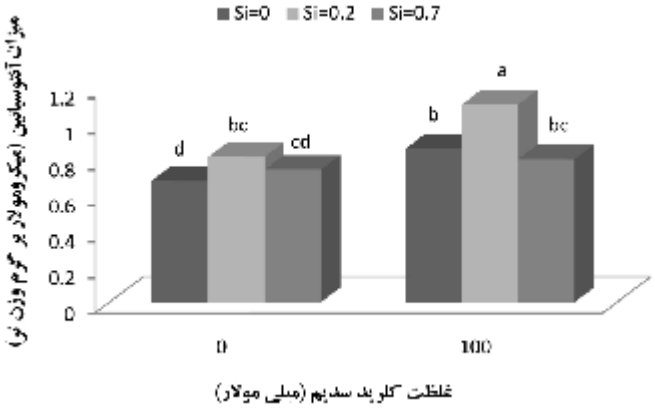
شکل ۵. تغییرات محتوای قند در بخش هوایی و ریشه در گیاه گاوزبان تحت تیمار سیلیکون کوتاه مدت و شوری ($P < 0.05$)

مدت و کوتاه مدت) به‌تنهایی در تیمار ۰/۲ میلی‌مولار بیشتر شده که در دوره کوتاه مدت این اختلاف معنی‌دار نمی‌باشد. در تیمار با سیلیکون و تنش شوری نیز در بلند مدت و کوتاه مدت، افزایش مقدار آنتوسیانین وجود داشته که در تیمار ۰/۲ میلی‌مولار سیلیکون این مقدار بیشتر بوده است.

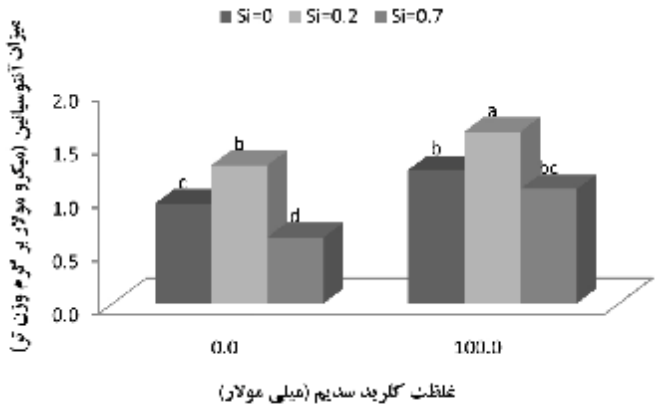
متداول‌ترین گروه فلاونوئیدهای رنگیزه‌ای آنتوسیانین‌ها هستند که مسئول بیشتر رنگ‌های قرمز، صورتی، بنفش و آبی مشاهده شده در قسمت‌های مختلف گیاه می‌باشند (۱). در این تحقیق، در اثر تیمار شوری، میزان آنتوسیانین‌ها افزایش نشان می‌دهد. سیستم دفاعی غیر آنزیمی در گیاهان شامل ترکیبات آنتی‌اکسیدان مانند آنتوسیانین‌ها، کاروتنوئیدها، توکوفرول‌ها، آسکوربیک اسید و ترکیبات فنلی می‌باشد. فلاونوئیدهای آنتوسیانینی از مهم‌ترین این ترکیبات آنتی‌اکسیدانی هستند این ترکیبات نه تنها رادیکال‌های آزاد را از بین می‌برند، بلکه از تولید بیشتر آنها در گیاه نیز جلوگیری می‌کنند. آنتوسیانین‌ها به احتمال زیاد باعث تسهیل ورود نمک به واکوئل سلول‌ها و در نتیجه جمع‌آوری آنها از سایر بخش‌ها می‌شوند. احتمالاً سیلیکون نیز در تیمارها بر این گروه از آنزیم‌ها تأثیر می‌گذارد و در نتیجه این رنگیزه در گیاه افزایش می‌یابد. تحقیقات نشان می‌دهد که آنتوسیانین‌ها می‌توانند در هماهنگی با مولکول‌های حفاظتی در یاخته‌های گیاهی عمل خود را انجام دهند و برای جبران نقص در غلظت مولکول‌ها در طی دوره تنش وارد عمل شوند. آنتوسیانین‌ها در مکان‌های ویژه‌ای درون برگ‌ها برای کارایی بهینه گیاه وارد عمل می‌شوند. انباشتگی آنتوسیانین‌ها با

[Downloaded from jspi.iut.ac.ir on 2024-08-17]

[DOR: 20.1001.1.20089082.1391.3.4.4.8]



شکل ۶. تغییرات محتوای آنتوسیانین در بخش هوایی در گیاه گاوزبان تحت تیمار سیلیکون بلند مدت و شوری ($P < 0.05$)



شکل ۷. تغییرات محتوای آنتوسیانین در بخش هوایی گیاه گاوزبان تحت تیمار سیلیکون کوتاه مدت و شوری ($P < 0.05$)

محرک‌های محیطی گوناگون مانند UV (۳۱)، دمای کم (۱۴)، حمله عوامل بیماری‌زا (۱۹ و ۲۱) و چندین تنظیم‌کننده رشد مانند سیتوکینین (۱۵)، جیبرلین‌ها (۲۸)، اتیلن (۴۱) و سالسیلیک اسید (۲۶) القا می‌شود. نتیجه‌گیری این‌که آنتوسیانین در بخش هوایی در تیمار ۰/۲ میلی‌مولار افزایش بیشتری داشته و نسبت این افزایش در دوره بلند مدت به کوتاه مدت ۰/۰۶۳ می‌باشد.

نتیجه‌گیری

آنچه در این پژوهش مد نظر بوده کاهش اثرهای منفی شوری به کمک تغذیه مناسب گیاه با استفاده از سیلیکون و پیدا کردن طول دوره بهینه تأثیر سیلیکون بر گیاه گاوزبان ایرانی تحت تنش شوری می‌باشد. تغذیه مناسب در بسیاری از موارد می‌تواند اثرهای مفیدی بر تحمل گیاهان نسبت به تنش‌های زیستی و غیرزیستی داشته باشد. افزودن کلرید سدیم به محلول غذایی بر رشد و عملکرد و توازن عناصر غذایی گاوزبان تأثیر گذاشت که احتمالاً به‌دلیل اثر سوء سدیم و کلر، کاهش پتانسیل اسمزی محلول غذایی و کاهش جذب آب در محیط کشت باشد. براساس نتایج موجود، استفاده از سیلیکون به‌عنوان یک نوع کود توانسته بسیاری از این آثار منفی را تعدیل کند. در این پژوهش، مشخص گردید که تیمار ۰/۲ میلی‌مولار سیلیکون توانسته در طول دوره مناسب تیماردهی (بلند مدت) سیلیکون اثر بهتری بر گیاهان تحت تنش شوری بگذارد.

[Downloaded from jspi.iut.ac.ir on 2024-08-17]

[DOR: 20.1001.1.20089082.1391.3.4.4.8]

منابع مورد استفاده

۱. تایزو، زایگر. ۱۳۷۹. فیزیولوژی گیاهی (ترجمهٔ م. کافی و ا. زند). انتشارات جهاد دانشگاهی، مشهد، جلد ۲، صفحهٔ ۱۱۹.

۲. جعفری، م. ۱۳۷۳. سیمای شوری و شورروی‌ها. مؤسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع، تهران.

۳. خوشگفتارمنش، ا .ح. ۱۳۸۶. مبانی تغذیه گیاهی. انتشارات دانشگاه صنعتی اصفهان.

٤. زرگری، ع. ۱۳۷۵. گیاهان دارویی. انتشارات دانشگاه تهران، چاپ ششم، جلد سوم.

۵. صالح‌زاده، ع. ۱۳٦۸. بررسی گونه‌های مختلف گاوزبان موجود در بازار داروهای گیاهی و مقایسه آن با گونه استاندارد. پایان‌نامه دکترای داروسازی، دانشکدهٔ داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان.

۶. ملکوتی، م. ج. ۱۳۸۰. کشاورزی پایدار و افزایش عملکرد با بهینه‌سازی و مصرف کود در ایران. نشر آموزش کشاورزی، معاونت شورای عالی سیاست‌گذاری کاهش مصرف سموم و مصرف بهینه کودهای شیمیایی، وزارت جهاد کشاورزی ایران، چاپ دوم.

7. Adatia, M. H. and R. T. Besford. 1986. The effects of silicon on cucumber plants grown in recirculating nutrient solution. Ann. Bot. 58: 343-351.
8. Akinwunmi, O. 2001. The plant defense activator Acibenzolar-S-Methyl primes cowpea [*Vigna unguiculata* (L.) Walp] seedlings for rapid induction of resistance. Physiol. Mole. Plant Pathol. 58: 199-208.
9. Al-aghabary, K., Z. Zhujun and S. Qinhua. 2004. Influence of silicon supply on chlorophyll content, chlorophyll fluorescence, and antioxidative enzyme activities in tomato plants under salt stress. J. Plant Nutr. 27: 2101-2115.
10. Bates, L., R. P. Waldern and I. D. Teare. 1973. Rapid determination of free proline for water stress studies. Plant Soil 29: 205-207.
11. Bhattarai, S., L. Pendergast and D. J. Midmore. 2006. Root aeration improves yield and water use efficiency of tomato in heavy clay and saline soils. Sci. Hort. 108: 278-288.
12. Chaoui, A., S. Mazhoudi, M. H. Ghorbal and E. L. Ferjani. 1997. Cadmium and zinc induction of lipid peroxidation and effects on antioxidant enzyme activities in bean (*Phaseolus vulgaris* L.). Plant Sci. 127: 139-147.
13. Cherf, M., J. G. Menzies, D. L. Ehret, C. Bopgdanoff, R. R Belanger. 1994. Yield of cucumber infected with *Pythium aphanidermatum* when grown with soluble silicon. Hort. Sci. 29: 896-897.
14. Christie, P. J., M. R. Alfenito and V. Walbot. 1994. Impact of low-temperature stress on general phenylpropanoid and anthocyanin pathways: Enhancement of transcript abundance and anthocyanin pigmentation in maize seedlings. Planta 194: 541-549.
15. Deikman, J. and P. E. Hammer. 1995. Induction of anthocyanin accumulation by cytokinin in *Arabidopsis thaliana*. Plant Physiol. 108(1): 47-57.
16. Flowers, T. J., P. F. Troke and A. R. Yeo. 1977. The mechanism of salt tolerance in halophytes. Ann. Review Plant Physiol. 28: 89-121.
17. Guo, T., G. Zhang, M. Zhou, F. Wu and J. Chen. 2004. Effects of aluminum and cadmium toxicity on growth and antioxidant enzyme activities of two barley genotypes with different Al resistance. Plant Soil 258: 241-248.
18. Heath, R. and L. Packer. 1968. Photoperoxidation in isolated chloroplast. I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. Arch. Biochem. Biophys. 125: 189-198.
19. Heim, D., R. L. Nicholson, S. F. Pascholati, A. E. Hagerman and W. Billet. 1983. Etiolated maize mesocotyls: A tool for investigating disease interactions. Phytopathology. 73: 424-428.
20. Helal Ragab, M. 2006. Influence of exogenous application of silicon on physiological response of salt-stressed maize (*Zea mays* L.). Intl. J. Agric. Biol. 8(2): 293-297.
21. Hipskind, J., K. Wood and R. L. Nicholson. 1996. Localized stimulation of anthocyanin accumulation and delineation of pathogen ingress in maize genetically resistant to *Bipolaris maydis* Race O. Physiol. Mol. Plant Pathol. 49: 247-256.
22. Huany, B. and J. W. Johnson. 1995. Root respiration and carbohydrate status of two wheat genotypes in response to hypoxia. Ann. Bot. 75: 427-432.
23. Liang, Y. C. 1998. Effects of Si on leaf ultrastructure, chlorophyll content and photosynthetic activity in barley under salt stress. Pedosphere 8: 289-296.
24. Liang, Y. 1999. Effects of silicon on enzyme activity and sodium, potassium and calcium concentration in barley under salt stress. Plant Soil 209: 217-224.
25. Liang, Y. C., Q. R. Shen, Z. G. Shen and T. S. Ma. 1996. Effects of silicon on salinity tolerance of two barley cultivars. J. Plant Nutr. 19: 173-183.
26. Marschner, H. 1995. Mineral Nutrition of Higher Plants. 2nd ed., Academic Press Ltd., London, UK, pp. 7-78.

[Downloaded from jspi.iut.ac.ir on 2024-08-17]

[DOR: 20.1001.1.20089082.1391.3.4.4.8]

27. Matysik, J., B. Alia Balu and P. Mohanty. 2002. Molecular mechanisms of quenching of reactive oxygen species by proline under stress in plants. Current Sci. 82: 525-531.
28. Mealem- Beno, D., G. Tamari, Y. L. Leitner- Dagan, A. Borochov and D. Weiss. 1997. Sugar- dependent gibberellin-i chalcone synthase gene expression in *Petunia corollas*. Plant Physiol. 113: 419-424.
29. Mulholland, B. J., I. B. Taylor, A. C. Jackson and A. J. Thompson. 2003. Can ABA mediate response of salinity stressed tomato. Environ. Exp. Bot. 50:17-28.
30. Rabinowitch, H. D. and I. Fridovich. 1983. Superoxide radical, superoxide dismutase and oxygen toxicity in plants. Photochem. Photobiol. 188: 206-213.
31. Reddy, V. S., K. V. Gould, R. Sharma and A. R. Reddy. 1994. Ultraviolet-B-responsive anthocyanin production in rice is associated with a specific phase of phenylalanine ammonia lyase biosynthesis. Plant Physiol. 105: 1059-1066.
32. Samuels, A. L., A. D. Glass, M. D. L. Ehret and J. G. Menzies. 1993. The effects of silicon supplementation on cucumber fruit: Changes in surface characteristics. Ann. Bot. 72: 433-440.
33. Somogy, M. 1952. Notes on sugar determination. J. Biol. Chem. 195: 19-29.
34. Stewart, C. R. 1972. Proline content and metabolism during rehydration of wilted excised leaves in the dark. Plant Physiol. 50: 679-681.
35. Sudhakar, C., P. S. Reddy and K. Veeranjaneyulu. 1993. Effect of salt stress on the enzymes of proline synthesis and oxidation in green gram seedling. J. Plant Physiol. 141: 621-623.
36. Szaboilcs, I. 1987. The global problems of salt-affected soils. Acta Agron. Hungar. 36:159-172.
37. Tattini, M., R. Gucci, A. Romani, A. Baldi and J. D. Everard. 1996. Changes in non structural carbohydrates in olive leaves during root zone salinity stress. Physiol. Plantarum 98: 117-124.
38. Verma, S. and R. S. Dubeym. 2001. Effect of cadmium on soluble sugars and enzymes of their metabolism in rice, Biol. Plantarum 1: 117-123.
39. Wagner, G. J. 1979. Content and vacuole/extra vacuoles distribution of neutral sugars, free amino acids, and anthocyanins in protoplast. Plant Physiol. 64: 88-93.
40. Wanichan, p., C. Kirdmanee and C. Vutyano. 2003. Effect of salinity on biochemical and physiological characteristics in correlation to selection of salt tolerance in Aromatic rice (*Oryza sativa* L.). Sci. Asia 29: 333-330.
41. Woltering, E. J. and D. Somhorst. 1990. Regulation of anthocyanin synthesis in cymbidium flowers: Effects of emasculation and ethylene. J. Plant Physiol. 136: 295-299.
42. Xiao-dong, W. 2010. Effects of exogenous silicon on seed germination and antioxidant enzyme activities of *Momordica charantia* under salt stress. J. Anim. Plant Sci. 6: 700-708.
43. Zafar, S., M. Y. Ashraf, G. Sarvar, S. Mahmood and I. Ali. 2004. Variation in growth and ion uptake in salt tolerant and sensitive rice cultivars under NaCl salinity. Plant Sci. 3: 156-158.

[Downloaded from jspi.iut.ac.ir on 2024-08-17]

[DOR: 20.1001.1.20089082.1391.3.4.4.8]