مقاله پژوهشی

نشریه علمی تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران | شناسه دیجیتال (DOI): 10.22092/ijmapr.2021.125246.2504
جلد ۳۷، شماره ۴، صفحه ۵۶۲-۵۴۹ (۱۴۰۰) | شناسه دیجیتال (DOR): 20.1001.17350905.1400.37.4.11.8

اثر منابع مختلف منابع نیتروژنی بر برخی ویژگی‌های مورفوفیزیولوژیکی رزماری (*Rosmarinus officinalis* L.) در شرایط درون شیشه‌ای

اسماعیل چمنی[۱*]، فرحناز نریمانیان[۲]، یونس پوربیرامی‌هیر[۳] و حمیدرضا حیدری[۴]

۱*- نویسنده مسئول، استاد، گروه علوم باغبانی، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران، پست الکترونیک: echamani@uma.ac.ir
۲- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد، گروه علوم باغبانی، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران
۳- استادیار، گروه علوم باغبانی، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران
۴- دانش‌آموخته دکتری، گروه علوم باغبانی، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران

تاریخ دریافت: اسفند ۱۳۹۷ | تاریخ اصلاح نهایی: تیر ۱۴۰۰ | تاریخ پذیرش: تیر ۱۴۰۰

چکیده

این تحقیق به‌منظور بررسی تأثیر منابع نیتروژنی مختلف شامل نیترات آمونیوم، آسپاراژین و گلوتامین در پنج غلظت ۰، ۵۰، ۱۰۰،۱۵۰، و ۲۰۰ میلی‌گرم بر لیتر بر برخی ویژگی‌های فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی گیاه رزماری (*Rosmarinus officinalis* L.) در قالب طرح کاملاً تصادفی با پنج تکرار اجرا شد. شاخص‌های ارتفاع گیاه، میزان شاخه‌زایی، تعداد برگ، میزان برگ نکروزه، مقدار کلروفیل‌های *a*، *b* و کل، و مقدار کاروتنوئید، فنول و فلاونوئید اندازه‌گیری شدند. نتایج نشان داد که تأثیر منابع نیتروژنی بر بر تمامی شاخص‌های مورد بررسی به‌استثنای میزان برگ نکروزه در سطح احتمال ۱٪ معنی‌دار شد. نتایج حاصل از مقایسه میانگین داده‌ها نشان داد بیشترین میزان شاخه‌زایی و تعداد برگ در تیمار گلوتامین و آسپاراژین با غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر حاصل شد و بیشترین ارتفاع گیاه در غلظت ۲۰۰ میلی‌گرم بر لیتر نیترات آمونیوم بدست آمد. همچنین، بیشترین میزان رنگیزه‌های فتوسنتزی در تیمار آسپاراژین با غلظت ۵۰ میلی‌گرم در لیتر و بیشترین میزان فنول و فلاونوئید در تیمار گلوتامین با غلظت ۲۰۰ میلی‌گرم بر لیتر بدست آمد. در کل، نتایج نشان داد که منابع نتیروژنی مختلف مورد بررسی توانستند به‌طور مثبت و معنی‌داری سبب بهبود شاخص‌های مورفولوژیکی و فیزیولوژیکی رزماری در شرایط درون شیشه‌ای شوند.

واژه‌های کلیدی: آسپاراژین، گلوتامین، فنول، متابولیت‌های ثانویه، نیترات آمونیوم.

مقدمه

گیاهان دارویی یکی از منابع مهم تولید دارو هستند که بشر سالیان دراز از آنها استفاده نموده و روز به روز بر اهمیت آنها افزوده می‌گردد. در حال حاضر حداقل ۸۰٪ از جمعیت کشورهای در حال توسعه برای درمان و مراقبت‌های بهداشتی اولیه‌شان از گیاهان دارویی استفاده می‌کنند (Gedif & Hahn, 2002). طبق گزارش سازمان جهانی بهداشت میزان تجارت گیاهان دارویی تا سال

۲۰۵۰ میلادی بالغ بر پنج تریلیون دلار خواهد بود. در سال‌های اخیر استفاده از مواد طبیعی گیاهان دارویی به‌جای افزودنی‌های مصنوعی که دارای اثرهای جانبی می‌باشد مورد توجه زیادی قرار گرفته است (Paradiso *et al*., 2008). ازجمله گیاهان دارویی مهم، گیاهان تیره نعناعیان (Lamiaceae) است که دارای ۱۶۰ جنس و بیش از ۳۰۰۰ گونه می‌باشد. این گیاهان در بیشتر نواحی زمین پراکنده هستند، ولی بیشینه انتشار آنها در نواحی مدیترانه می‌باشد. در ایران ۴۷ جنس و حدود ۳۷۰ گونه از گیاهان این خانواده وجود دارد. یکی از مهمترین گونه‌های این خانواده، گونه *Rosmarinus officinalis* L. (رزماری) می‌باشد. رزماری (اکلیل کوهی) گیاه دارویی–زینتی پایا، بسیار معطر و دارای ساقه‌های چوبی می‌باشد و به‌دلیل محتوای فنلی و فعالیت آنتی‌اکسیدانتی بالای آن به شدت مورد استفاده قرار می‌گیرد (Bellumori *et al*., 2016). تکثیر گیاه رزماری از طریق کشت بذر، خوابانیدن و قلمه انجام می‌شود که روش قلمه معمول‌تر است. البته با استفاده از این روش، تعداد محدودی گیاه با توجه به حجم خزانه در دسترس خواهد بود و تعداد کمی پایه‌های مادری اولیه تولید می‌شود، ضمن اینکه کمّیت و کیفیت مواد مؤثره گیاهان کشت شده در مزرعه به‌دلیل قرار گرفتن در معرض تنش‌های حاصل از تغییرات فصلی یکنواخت نیست (Saltan & Ozaydin, 2013). ازدیاد رزماری از طریق بذر نیز زیاد مورد توجه نمی‌باشد. با توجه به اینکه در حالت تکثیر با این روش‌ها تعداد کمی پایه‌های مادری اولیه تولید می‌شود، بنابراین استفاده از تکنیک‌های کشت بافت می‌تواند راه حل کارآمد و مفیدی برای غلبه بر مشکلات تکثیر این گیاه باشد (Dellacassa *et al*., 1999). کشت بافت گیاهی به‌عنوان ابزاری برای حفاظت و تکثیر سریع گیاهان دارویی و همچنین فراهم نمودن منبعی برای تولید متابولیت‌های ثانویه است (Nagesh *et al*., 2010). نیتروژن یکی از مهمترین عناصر ضروری برای گیاهان به‌شمار می‌آید که در ساخت کلروفیل، تولید پروتئین‌ها، نوکلئیک اسیدها و کوآنزیم‌ها نقش اساسی دارد (Barker & Pilbeam, 2015). اسیدهای آمینه آسپاراژین و گلوتامین از بهترین منابع نیتروژنی به حساب می‌آیند که از طریق ریشه و سطح برگ جذب می‌شوند و بدون انجام عمل احیاء وارد ساختار پروتئین‌ها و اسکلت کربنی می‌گردند (Tsouvaltzis *et al*., 2014). اسید آمینه آسپاراژین و گلوتامین القاءکننده تشکیل بافت‌های گیاهی، سنتز کلروفیل، فرایند گرده‌افشانی و بهبود کیفیت رویش گیاهان می‌باشند. اسید گلوتامیک دارای ویژگی کلات‌کنندگی عناصر ریزمغذی بوده و جذب و انتقال عناصر ریزمغذی را به گیاه آسان‌تر می‌کند و نیترات آمونیوم میزان انشعابات شاخه را افزایش می‌دهد (Vasudevan *et al*., 2004). Liu و همکاران (۲۰۱۴) بیان کردند که سه ترکیب آسپاراژین، گلوتامین و نیترات آمونیوم بر فعالیت آنزیم‌های مؤثر در آسیمیلاسیون نیتروژن در گیاه تأثیر و منجر به کاهش تجمع نیترات در گیاه می‌شوند. در آزمایشی تأثیر آسپاراژین و گلوتامین بر میزان رشد و متابولیسم گیاه لوبیا (*Phaseolus volgaris*) در شرایط درون شیشه‌ای مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که پارامترهای رشدی، رنگیزه‌های فتوسنتزی، میزان جذب آمینواسیدها و نیتروژن پپتیدی در غلظت ۱ و ۲ میلی‌مولار، آسپاراژین و گلوتامین افزایش پیدا کردند (Haroun *et al*., 2010). نتایج بررسی تأثیر منابع نیتروژنی مختلف بر افزایش شاخه‌زایی گیاه خیار نشان داد، به‌ترتیب در گلوتامین (۰/۰۶۸ میلی‌مولار) سپس در آسپاراژین (۰/۰۶۶ میلی‌مولار)، همچنین در بین منابع نیتروژن آلی نیترات آمونیوم (۰/۱۲۴ میلی‌مولار) بیشترین تعداد شاخه‌زایی در هر ریزنمونه بدست آمد (Vasudevan *et al*., 2004). در تحقیقی Misra و Chaturvedi (۱۹۹۱) نشان دادند که اثر سیتوکنین در تمایز جوانه ساقه گیاه رزماری تا حد زیادی توسط نمک‌های معدنی تحت تأثیر قرار گرفته است. برای تمایز مطلوب جوانه ساقه، غلظت حداقل ۰/۲۵ میلی‌گرم بر لیتر BAP و ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر

IAA، ۱۰۰۰ میلی‌گرم بر لیتر NH_4NO_3 و ۱۵۰۰ میلی‌گرم بر لیتر KNO_3 به بهترین نتیجه منجر شد. ازاین‌رو با توجه به ارزش دارویی بالای گیاه رزماری و نیز با توجه به اینکه امروزه به‌دلیل مشکلات بسیار زیاد در تولید مزرعه‌ای گیاهان از قبیل کمبود منابع آبی، فرسایش خاک، کاهش کیفیت آب و خاک به‌دلیل مشکلات زیست محیطی، گرمایش زمین و مشکلات متعدد دیگر، استفاده از روش‌های جایگزین تولیدات مزرعه‌ای در اولویت اول کشورهای پیشرفته قرار دارد و از سوی دیگر افزایش باززایی و تولید درون شیشه‌ای گیاهان یکی از نیازهای اولیه برای بالا بردن میزان تولید متابولیت‌های ثانویه بوده و منابع مختلف نیتروژنی نیز یکی از مهمترین منابع برای افزایش باززایی گیاهان به‌شمار می‌رود. به نظر می‌رسد که انجام تحقیق در این زمینه به‌علت تحقیقات کم در رابطه با کشت درون شیشه‌ای این گیاه در دنیا و اینکه در ایران نیز هنوز تحقیق جامعی در این زمینه انجام نشده، ضروریست.

مواد و روش‌ها

این پژوهش در دانشگاه محقق اردبیلی واقع در استان اردبیل طی سال‌های ۱۳۹۵ و ۱۳۹۶ انجام شد. پژوهش مورد نظر به‌صورت آزمایش ساده در قالب طرح کاملاً تصادفی با پنج تکرار اجرا شد. تیمارهای آزمایشی شامل نیترات آمونیوم، آسپاراژین و گلوتامین بود که در چهار سطح ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم بر لیتر مورد بررسی قرار گرفتند. غلظت صفر به‌عنوان کنترل برای همه تیمارها در نظر گرفته شد. برای این منظور از سرشاخه‌های سرسبز و جوان انتهایی گیاه رزماری به‌عنوان ریزنمونه استفاده شد. به‌منظور گندزدایی، ریزنمونه‌ها به‌مدت ۵ دقیقه در آب حاوی مایع ظرفشویی غوطه‌ور گردیده و بعد به مدت ۲۰ دقیقه زیر آب جاری شسته شدند و پس از آن نمونه‌ها در زیر لامینار ایرفلو، ابتدا به‌مدت ۱ دقیقه با الکل ۷۰٪ حجمی ضدعفونی گردیدند و بعد از آبکشی با آب‌مقطر در محلول ۱/۵٪ حجمی هیپوکلریت سدیم به مدت ۲۰ دقیقه قرار گرفته و در پایان سه بار به‌مدت ۲، ۵ و ۱۰ دقیقه با آب‌مقطر استریل ضدعفونی شدند. در ابتدا تکثیر ریزنمونه‌ها با هدف افزایش تعداد گیاهچه‌های سالم، در محیط کشت MS فاقد هورمون انجام شد، سپس برای پرآوری ریزنمونه‌ها از هورمون BA با غلظت ۲ میلی‌گرم بر لیتر و IAA با غلظت ۰/۲ میلی‌گرم بر لیتر استفاده شد.

پس از فراهم شدن گیاهچه کافی از طریق پرآوری ریزنمونه‌ها، تیمارهای اصلی آزمایش در محیط‌های MS تغییر یافته (جدول ۱) انجام گردید. همچنین هورمون BA با غلظت یک میلی‌گرم بر لیتر و هورمون IAA با غلظت ۰/۲۵ میلی‌گرم بر لیتر به محلول اضافه گردید. سپس تیمارهای آزمایشی شامل نیترات آمونیوم، آسپاراژین و گلوتامین در غلظت‌های ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم بر لیتر به هر محیط اضافه شد. سپس کلیه مواد و ظروف و محیط‌های کشت در دمای ۱۲۰ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۲۰ دقیقه اتوکلاو گردید. آنگاه کشت‌ها در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و در ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی قرار گرفت. بررسی و ثبت نتایج به‌مدت ۶ ماه انجام شد و صفات مورد نظر شامل ارتفاع گیاه، میزان شاخه‌زایی، تعداد برگ، میزان برگ نکروزه، میزان کلروفیل a، b و کل، کاروتنوئید، فنول و فلاونوئید اندازه‌گیری شد. برای اندازه‌گیری میزان کلروفیل برگ از روش Arnon (۱۹۴۹) استفاده شد. ۵۰۰ میلی‌گرم از هر نمونه برگ تر در ۵ میلی‌لیتر استون (۸۰٪) هموژن گردید، آنگاه عصاره حاصل صاف و حجم آن با اضافه کردن استون به ۱۰ میلی‌لیتر رسانده شد. پس از استخراج عصاره آن به روش ذکرشده میزان جذب نور توسط عصاره با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر (Shimadzu UV 180) در طول موج ۶۶۳ (کلروفیل a) و ۶۴۵ (کلروفیل b) تعیین گردید. غلظت کلروفیل a و b و مجموع آنها (در این روابط V حجم نهایی نمونه استخراج شده و W وزن تر نمونه است) از طریق روابط زیر بدست آمد.

(W×۱۰۰۰)/V×{(جذب در ۶۴۵ نانومتر) ۲/۶۹–(جذب در ۶۶۳ نانومتر) ۱۲/۷}= میلی‌گرم کلروفیل a در هر گرم وزن تر

(W×۱۰۰۰)/V×{(جذب در ۶۶۳ نانومتر) ۴/۶۹–(جذب در ۶۴۵ نانومتر) ۲۲/۹}= میلی‌گرم کلروفیل b در هر گرم وزن تر

(W×۱۰۰۰)/V×{(جذب در ۶۶۳ نانومتر) ۸/۰۲–(جذب در ۶۴۵ نانومتر)۲۰/۲}= میلی‌گرم کلروفیل a و b در هر گرم وزن تر

(W×۱۰۰۰)/V×{(جذب در ۶۶۳ نانومتر) ۱۴/۹–(جذب در ۴۸۰ نانومتر)۷/۷}= میلی‌گرم کاروتنوئید در هر گرم وزن تر

برای سنجش فلاونوئیدها از روش Krizek و همکاران (۱۹۹۸) استفاده شد. سنجش فلاونوئیدها با دستگاه اسپکتروفتومتر (مدل Jenwey) در طول موج ۳۰۰ نانومتر قرائت گردید. برای محاسبه غلظت فلاونوئیدها در هر طول موج به‌صورت جداگانه از فرمول ضریب خاموشی استفاده شد.

$$A= \varepsilon bc$$

که در آن A: میزان جذب قرائت شده در طول موج تعیین شده، ε: ضریب خاموشی (۳۳۰۰۰ cm M)، c: غلظت فلاونوئید (بر حسب مولار) و b: عرض کووت (یک سانتی‌متر) می‌باشد. میزان ترکیب‌های فنلی موجود در عصاره گیاه براساس روش Slinkard و Singleton (۱۹۷۷) با استفاده از دستگاه اسپکتوفتومتر (مدل Jenway) در طول موج ۷۶۵ نانومتر قرائت شد.

تجزیه‌وتحلیل آماری این طرح با استفاده از نرم‌افزار SAS 9.4 و مقایسه میانگین‌ها براساس آزمون LSD در سطح احتمال ۵٪ انجام شد. برای رسم نمودارها از نرم‌افزار Excel استفاده شد.

نتایج

تعداد شاخه پرآوری شده

نتایج حاصل از تجزیه واریانس نشان از معنی‌داری تأثیر منابع نیتروژنی بر تعداد شاخه پرآوری شده رزماری در سطح احتمال ۱٪ داشت (جدول ۲). مقایسه میانگین تأثیر تیمار منابع نیتروژنی بر شاخص تعداد شاخه پرآوری شده نشان داد که بیشترین تعداد شاخه پرآوری شده (پنج عدد) مربوط به تیمار گلوتامین در غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر و آسپاراژین در غلظت ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر می‌باشد. کمترین میزان تعداد شاخه پرآوری شده در تیمار کنترل (بدون مصرف منابع نیتروژنی) بدست آمد (شکل ۱).

تعداد برگ

نتایج حاصل از تجزیه واریانس نشان از معنی‌داری تأثیر منابع نیتروژنی بر تعداد برگ گیاه رزماری در سطح احتمال ۱٪ داشت (جدول ۲). مقایسه میانگین تأثیر تیمار منابع نیتروژنی بر تعداد برگ نشان داد که بیشترین تعداد برگ مربوط به تیمار گلوتامین در غلظت ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر بود و کمترین میزان آن در تیمار کنترل (بدون مصرف منابع نیتروژنی) بدست آمد (شکل ۲).

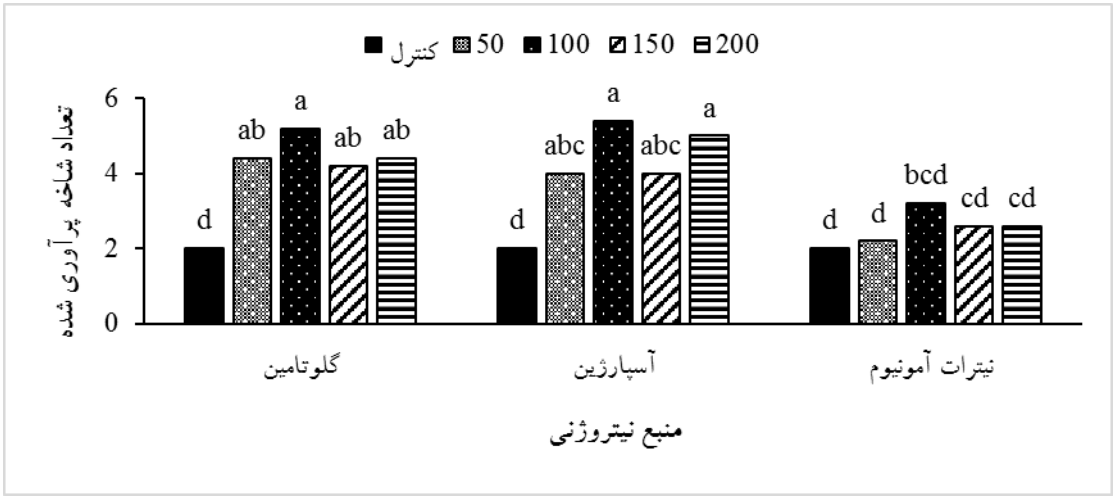
جدول ۱- ترکیب عناصر محیط کشت‌های مورد استفاده

ماده	MS	MS تغییر یافته
عناصر پرمصرف (mg/L)		
NH_4NO_3	۱۶۵۰	۰
$Ca(NO_3)_4.4H_2O$	–	–
$CaCl_2.2H_2O$	۳۳۲/۰۲	۳۱۲
$MgSO_4.7H_2O$	۱۸۰/۵۴	۳/۷
KNO_3	۱۹۰۰	۱۹
$KH_2.PO_4$	۱۷۰	۱/۷
K_2SO_4	–	–
NaH_2PO_4	–	۳۳۰/۶۰
عناصر کم مصرف (mg/L)		
H_3BO_3	۰/۰۶۲	۶/۲۰
$CuSO_4.5H_2O$	۰/۰۰۲۵	۰/۰۲۵
$Mn\ SO_4.H_2O$	۰/۲۲۳	۱۶/۹۰
$Na_2MoO_4.2H_2O$	۰/۰۲۵	۰/۲۵
$Zn\ SO_4.\ 7H_2O$	۰/۰۸۶	۸/۶۰
FeNa. EDTA	۰/۲۷۸	۷۳/۴۰
KI	۰/۰۸۳	۰/۳۰
$CoCl_2.\ 6H_2O$	۰/۰۰۲۵	۰/۰۲۵
مواد آلی (mg/L)		
Thiamine (B_1)	۰/۰۰۱	۰/۴۰
Nicotinic (B_3)	۰/۰۰۵	–
Pyrodoxine (B_6)	۰/۰۰۵	–
Glycine	۰/۰۲	–
Myo - inositol	۱	۱۰۰
Adninsulfat	–	۸۰
Sucrose(gl^{-1})	۳۰	۳۰
Agar(gl^{-1})	۷	۷

جدول ۲- تجزیه واریانس تأثیر منابع نیتروژنی در غلظت‌های مختلف بر صفات رزماری

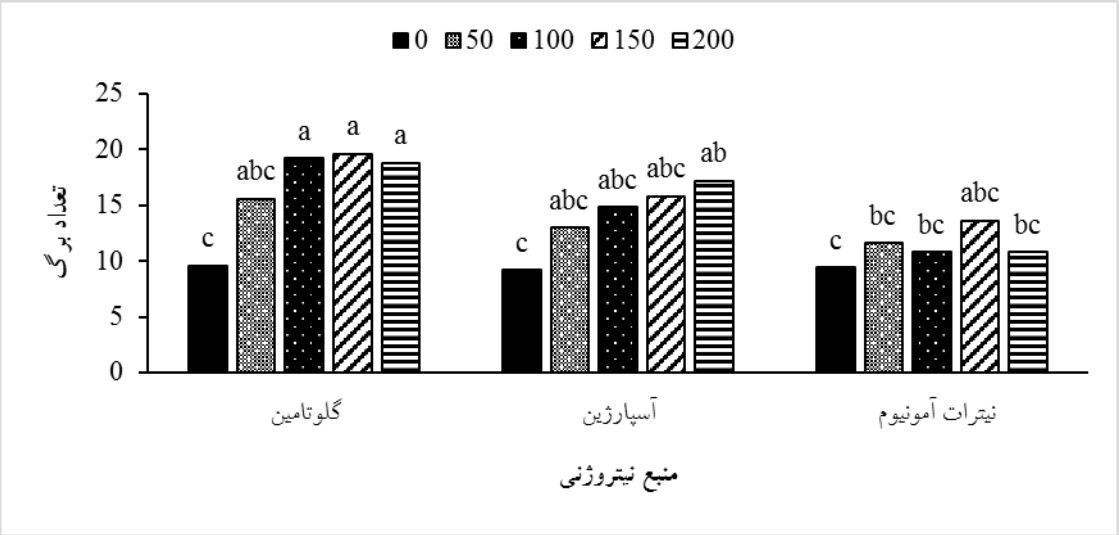
منابع تغییرات	درجه آزادی (df)	میانگین مربعات (MS)								
		تعداد برگ	میزان نکروزه	تعداد شاخه پرآوری شده	ارتفاع گیاه	کلروفیل a	کلروفیل b	کلروفیل کل	کاروتنوئید	فنول	فلاونوئید
تیمار	۱۲	۵۸/۱۰۵**	۳/۵۷**	۶/۴۸**	۱/۰۴**	۲۳/۷۶**	۲/۲۱**	۳۱/۵۶**	۱/۳۵**	۱/۲۸**	$۷/۵\times۱۰^{-۱۰}$**
خطای آزمایش	۵۲	۱۳/۳۷	۱/۱۰	۱/۱۰	۰/۱۴۴	۱/۲۶	۰/۳۲۸	۱/۷۱	۰/۲۰۸	۰/۰۶۰	$۱/۹\times۱۰^{-۱۱}$
ضریب تغییرات (٪)		۲۴/۹۷	۳۸/۴۳	۲۷/۷۱	۱۷/۲۲	۱۴/۵۶	۲۰/۵۵	۱۲/۵۰	۱۳/۰۱	۱۱/۵۹	۱۹/۴۳

**: معنی‌داری در سطح احتمال ۱٪



شکل ۱- مقایسه میانگین تأثیر منابع مختلف نیتروژنی در غلظت‌های مختلف بر تعداد شاخه پرآوری شده رزماری

ستون‌هایی که حداقل دارای یک حرف مشترک هستند اختلاف معنی‌داری براساس آزمون LSD در سطح احتمال ۱٪ ندارند.



شکل ۲- مقایسه میانگین تأثیر منابع مختلف نیتروژنی در غلظت‌های مختلف بر تعداد برگ رزماری

ستون‌هایی که حداقل دارای یک حرف مشترک هستند اختلاف معنی‌داری براساس آزمون LSD در سطح احتمال ۱٪ ندارند.

شکل ۳- مقایسه میانگین تأثیر منابع مختلف نیتروژنی در غلظت‌های مختلف بر تعداد برگ نکروزه رزماری

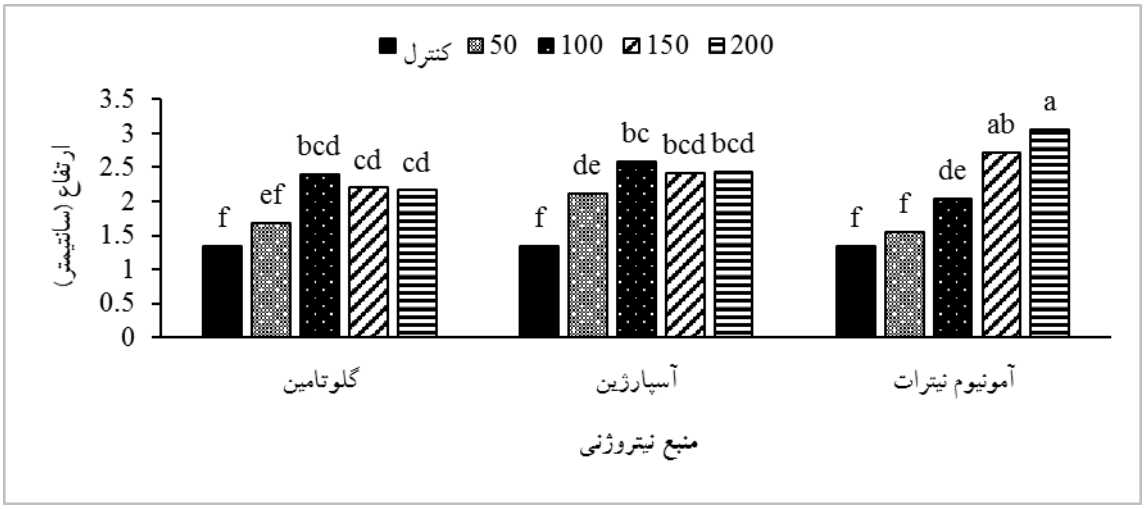
ستون‌هایی که حداقل دارای یک حرف مشترک هستند اختلاف معنی‌داری براساس آزمون LSD در سطح احتمال ۱٪ ندارند.

میزان نکروزگی برگ

تأثیر منابع مختلف نیتروژنی در غلظت‌های مختلف بر تعداد برگ نکروزه در سطح احتمال ۱٪ معنی‌دار بود (جدول ۲). کمترین میزان برگ نکروزه (۵ عدد) مربوط به تیمار آسپاراژین در غلظت ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر بود که در مقایسه با تیمار شاهد اختلاف معنی‌دار داشت. در حالی‌که بیشترین تعداد برگ نکروزه در نیترات آمونیوم در غلظت ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر مشاهده شد (شکل ۳).

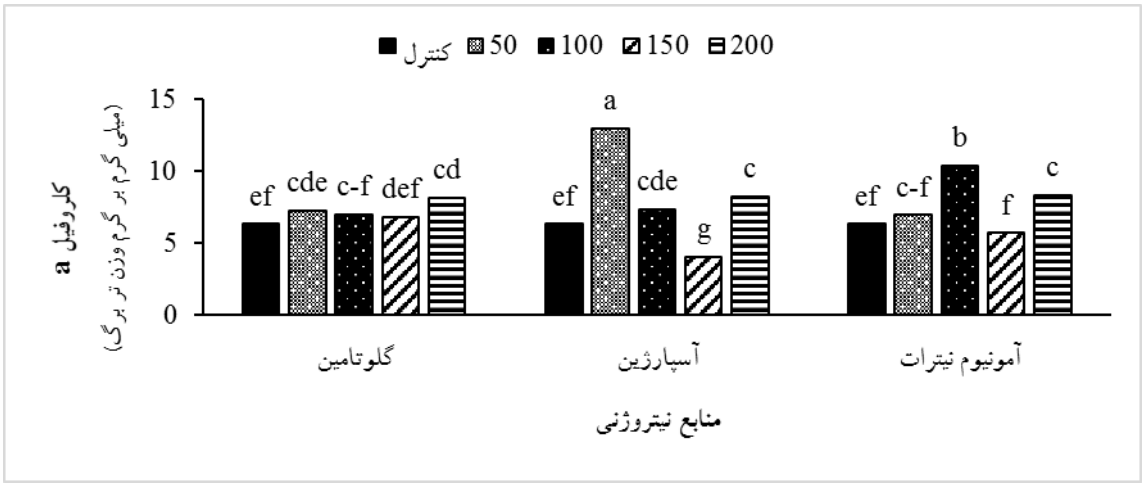
ارتفاع گیاه

میزان ارتفاع گیاه تحت تأثیر منابع مختلف نیتروژنی در سطح احتمال ۱٪ قرار گرفت (جدول ۲). مقایسه میانگین تأثیر منابع نیتروژنی بر ارتفاع گیاه نشان داد که بیشترین میزان ارتفاع (۳ سانتی‌متر) در غلظت ۲۰۰ میلی‌گرم بر لیتر نیترات آمونیوم مشاهده شد که در مقایسه با تیمار شاهد اختلاف معنی‌دار داشت و کمترین میزان آن در تیمار عدم مصرف منابع نیتروژنی بدست آمد (شکل ۴).



شکل ۴- مقایسه میانگین تأثیر منابع مختلف نیتروژنی در غلظت‌های مختلف بر ارتفاع گیاه رزماری

ستون‌هایی که حداقل دارای یک حرف مشترک هستند اختلاف معنی‌داری براساس آزمون LSD در سطح احتمال ۱٪ ندارند.

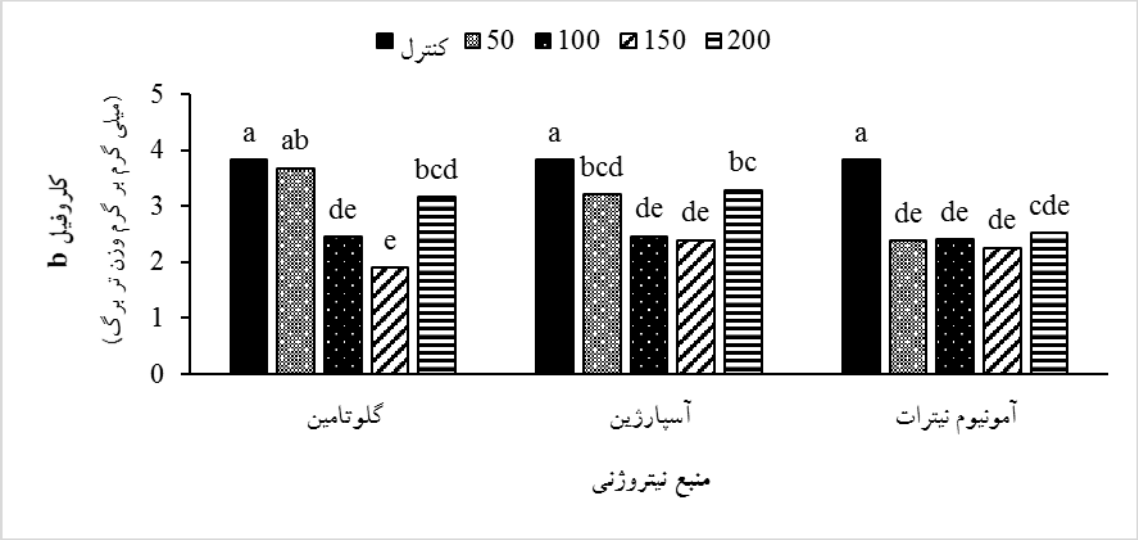


شکل ۵- مقایسه میانگین تأثیر منابع مختلف نیتروژنی در غلظت‌های مختلف بر کلروفیل a گیاه رزماری

ستون‌هایی که حداقل دارای یک حرف مشترک هستند اختلاف معنی‌داری براساس آزمون LSD در سطح احتمال ۱٪ ندارند.

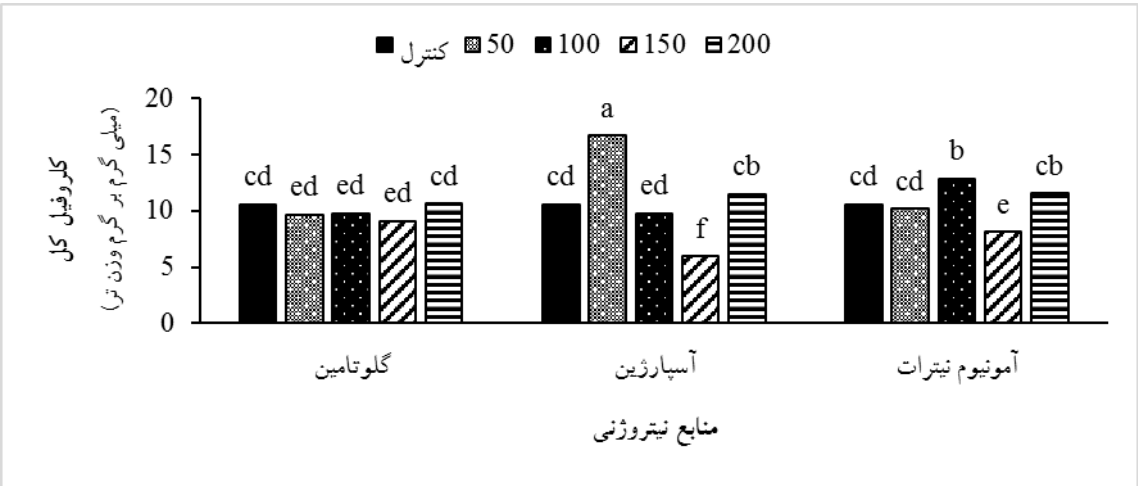
رنگیزه‌های فتوسنتزی

تأثیر تیمارهای آزمایش بر میزان رنگیزه‌های فتوسنتزی شامل کلروفیل a، b و کل و کاروتنوئید در سطح احتمال ۱٪ معنی‌دار بود (جدول ۲). براساس نتایج مقایسه میانگین بیشترین میزان کلروفیل a و کل و کاروتنوئید در تیمار ۵۰ میلی‌گرم در لیتر آسپاراژین و کمترین میزان آنها در تیمار ۱۵۰ میلی‌گرم در لیتر آسپاراژین حاصل شد (شکل ۵، ۷ و ۸). بیشترین میزان کلروفیل b در تیمار کنترل و کمترین میزان آن در تیمار گلوتامین ۱۵۰ میلی‌گرم در لیتر بدست آمد (شکل ۶).



شکل ۶- مقایسه میانگین تأثیر منابع مختلف نیتروژنی در غلظت‌های مختلف بر کلروفیل b گیاه رزماری

ستون‌هایی که حداقل دارای یک حرف مشترک هستند اختلاف معنی‌داری براساس آزمون LSD در سطح احتمال ۱٪ ندارند.



شکل ۷- مقایسه میانگین تأثیر منابع مختلف نیتروژنی در غلظت‌های مختلف بر کلروفیل کل گیاه رزماری

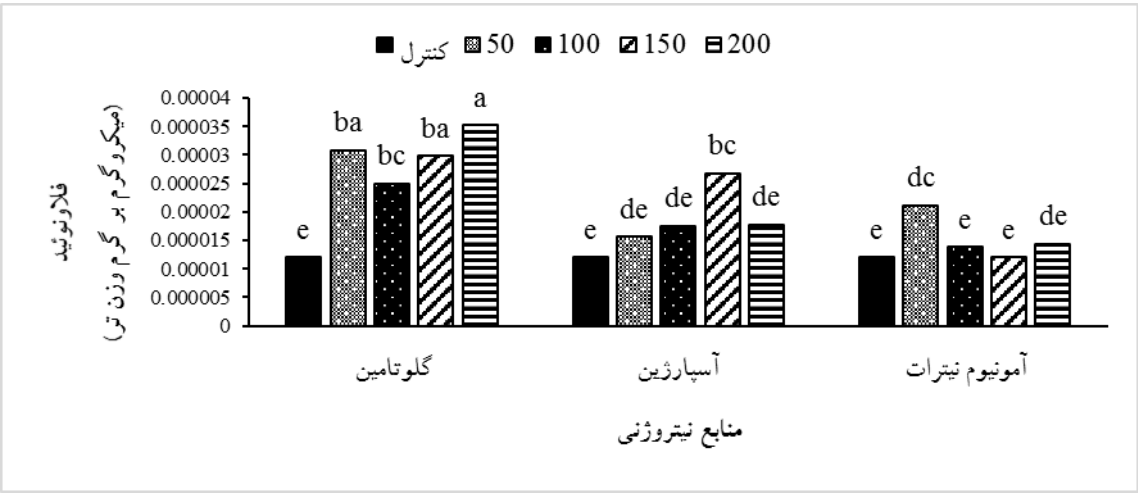
ستون‌هایی که حداقل دارای یک حرف مشترک هستند اختلاف معنی‌داری براساس آزمون LSD در سطح احتمال ۱٪ ندارند.

شکل ۸- مقایسه میانگین تأثیر منابع مختلف نیتروژنی در غلظت‌های مختلف بر کاروتنوئید گیاه رزماری

ستون‌هایی که حداقل دارای یک حرف مشترک هستند اختلاف معنی‌داری براساس آزمون LSD در سطح احتمال ۱٪ ندارند.

میزان فلاونوئید

تأثیر منابع مختلف نیتروژنی در سطح احتمال ۱٪ بر میزان فلاونوئید معنی‌دار بود (جدول ۲). مقایسه میانگین تأثیر منابع نیتروژنی بر میزان فلاونوئید گیاه نشان داد که بیشترین میزان فلاونوئید مربوط به تیمار گلوتامین در غلظت ۲۰۰ میلی‌گرم بر لیتر است که در مقایسه با تیمار شاهد اختلاف معنی‌دار داشت و کمترین میزان آن در تیمار عدم مصرف منبع نیتروژنی (کنترل) و تیمار آمونیوم نیترات در غلظت ۱۰۰ و ۱۵۰ میلی‌گرم در لیتر بدست آمد (شکل ۹).



شکل ۹- مقایسه میانگین تأثیر منابع مختلف نیتروژنی در غلظت‌های مختلف بر فلاونوئید گیاه رزماری

ستون‌هایی که حداقل دارای یک حرف مشترک هستند اختلاف معنی‌داری براساس آزمون LSD در سطح احتمال ۱٪ ندارند.

فنول

براساس نتایج حاصل از تجزیه واریانس تأثیر منابع مختلف نیتروژنی در سطح احتمال ۱٪ بر میزان فنول گیاه رزماری معنی‌دار بود (جدول ۲). بیشترین میزان فنول در تیمار گلوتامین در دو غلظت ۱۵۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر حاصل شد، به‌طوری که بین این دو تیمار اختلاف معنی‌داری وجود نداشت. همچنین بین این دو تیمار و تیمار نیترات آمونیوم در غلظت ۱۵۰ میلی‌گرم در لیتر تفاوت معنی‌داری وجود نداشت. کمترین میزان فنول نیز در تیمارهای کنترل (عدم مصرف) و آسپاراژین با غلظت‌های ۵۰، ۱۰۰ و ۱۵۰ میلی‌گرم در لیتر بدست آمد (شکل ۱۰).

شکل ۱۰- مقایسه میانگین تأثیر منابع مختلف نیتروژنی در غلظت‌های مختلف بر فنول گیاه رزماری

ستون‌هایی که حداقل دارای یک حرف مشترک هستند اختلاف معنی‌داری براساس آزمون LSD در سطح احتمال ۱٪ ندارند.

بحث

به‌طورکلی منابع نیتروژنی معدنی به‌علت تحرک بیشتر و مصرف انرژی کمتر برای بیوسنتز پروتئین، نسبت به منابع نیتروژنی آلی مؤثرتر واقع می‌شوند و در ریشه‌زایی، تشکیل شاخه و جنین‌زایی سوماتیکی برای گیاهان کارآمدتر هستند (Kim & Moon, 2007). اسیدهای آمینه به‌عنوان ترکیب محرک رشد کمّی و کیفی گیاه فعالیت می‌کنند. این ترکیب‌ها در بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه و هورمونی نقش مهمی دارند. به‌طور کلی اسیدهای آمینه موادی هستند که باعث تحریک متابولیسمی و متابولیکی برای افزایش کارآیی گیاهان می‌شوند. بنابراین کاربرد این مواد به‌عنوان محرک‌های زیستی می‌تواند یکی از مهمترین عوامل در کشت موفق یک گیاه باشد، چون علاوه‌بر شاخص‌های کمّی، بر شاخص‌های کیفی گیاه نیز اثر می‌گذارد و این تأثیر اسیدهای آمینه به‌دلیل فرمولاسیون محرک‌های زیستی است که با افزایش نسخه‌برداری mRNA تا میزان ۲/۵ برابر، با فعال‌سازی هورمون‌های مؤثر در رشد زایشی، فعال‌سازی فرایند تشکیل کربوهیدرات‌ها، افزایش جذب و انتقال عناصر و افزایش میزان پروتئین در گیاهان موجب بهبود ویژگی‌های کمّی و کیفی در مدت زمان کوتاه‌تر می‌شوند. اسیدهای آمینه با افزایش غلظت کلروفیل و در نتیجه تأثیر بر فتوسنتز، بر رشد و عملکرد گیاهان اثر می‌گذارند. بنابراین اسیدهای آمینه به‌صورت مستقیم و غیرمستقیم بر فعالیت‌های فیزیولوژیک و رشد و نمو گیاه اثر می‌گذارند. بیشترین تعداد شاخه پرآوری شده در تیمار گلوتامین با غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر بدست آمد. گلوتامین منبع نیتروژنی است که به سهولت جذب می‌شود و از آنجا که غیرسمّی است سلول را قادر می‌کند تا سرعت رشد خود را در مدت زمان طولانی حفظ بکند. همچنین گلوتامین سبب دستیابی به حداکثر میزان شاخه‌زایی در گیاه خیار شده است (Vasudevan *et al.*, 2004). تأثیر کاربردهای اسیدهای آمینه (آسپاراژین، گلوتامین

و ...) در گیاهان توسط پژوهشگران مختلفی مورد بررسی قرار گرفته است. اکنون مشخص شده است که گیاهان قادرند از اسیدهای آمینه به‌عنوان منبع نیتروژن استفاده کنند؛ اسیدهای آمینه از طریق ریشه و سطح برگ جذب می‌شوند و بدون انجام عمل احیاء وارد ساختار پروتئین‌ها می‌شوند (Tsouvaltzis *et al.*, 2014). اسید آمینه آسپاراژین و گلوتامین القاءکننده تشکیل بافت‌های گیاهی و سنتز کلروفیل، فرایند گرده‌افشانی و بهبود کیفیت رویش گیاهان می‌باشند. اسید گلوتامیک جذب و انتقال عناصر ریزمغذی را به گیاه آسان‌تر می‌کند و در بیشتر گزارش‌ها، اضافه کردن اسیدهای آمینه نقش مهمی در کشت بافت گیاهان دارد اما محیط‌های کشت مورد استفاده به ندرت با اسیدهای آمینه تکمیل شدند (Asad *et al.*, 2009). ترکیب‌های نیتروژن‌دار بیشترین اثر را در افزایش ماده خشک در برگ‌ها و ریشه دارند که این روند رابطه مستقیم با فتوسنتز و غلظت جذب نیتروژن دارد که با افزایش آنها نیتروژن کل در گیاه افزایش می‌یابد و تعداد برگ افزایش پیدا می‌کند، در نتیجه عملکرد آلکالوئیدها بیشتر می‌شود (Vasuki *et al.*, 1980). در پژوهشی Shirdel و همکاران (۲۰۱۱) گزارش نمودند، هنگامی که میزان نیترات در محیط کشت ریزازدیادی گل نسترن بیشتر از آمونیوم باشد، بیشترین طول ساقه و تعداد گره تولید می‌شود که با نتایج این پژوهش مطابقت دارد. Khanna و Raina (۱۹۹۷) در پژوهشی به‌منظور بررسی تأثیرات نیترات و آمونیوم بر روی برنج به این نتیجه دست یافتند که حضور آمونیوم و نیترات به تنهایی برای رشد ساقه کارآمد نیست، به‌طوری که افزایش غلظت آمونیوم باعث افزایش میزان نکروزگی می‌شود و همچنین تجمع بالای آمونیوم باعث افزایش اسیدی شدن محیط رشد گیاه می‌شود که نتایج آنان با نتایج حاصل از این تحقیق مطابقت داشت. اسیدهای آمینه به احتمال زیاد در افزایش تولید و فعالیت برخی آنزیم‌های محرک رشد در گیاه نقش مثبت داشته‌اند. از نقش مؤثر اسیدهای آمینه می‌توان به مواردی مانند تنظیم انتقال یون‌ها، تنظیم باز شدن روزنه‌ها، کاهش سمّیت فلزات سنگین، انجام عمل سیگنالینگ (Hausler *et al.*, 2014) و عمل به‌عنوان اسمولیت اشاره کرد (Anjum *et al.*, 2014). بیشترین میزان ارتفاع ساقه در تیمار ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر نیترات آمونیوم بدست آمد که با نتایج Ivanova و Staden (۲۰۱۱) در گیاه *Aloe polyphylla* همخوانی دارد. نیتروژن منبع تغذیه ضروری برای سلول‌های گیاهی است و در تولید پروتئین‌ها، نوکلئیک اسیدها و کوآنزیم‌ها نقش اساسی دارد. همچنین جزء سازنده مولکول‌های کلروفیل بوده، بنابراین نقش مهمی در فتوسنتز ایفاء می‌کند (Barker & Pilbeam, 2015). در این پژوهش بیشترین تأثیر منابع نیتروژنی در کلروفیل کل و کاروتنوئید مربوط به تیمار آسپاراژین در غلظت ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر حاصل شد که با تیمار شاهد اختلاف معنی‌داری داشت. اسیدآمینه آسپاراژین و گلوتامین القاءکننده تشکیل بافت‌های گیاهی و سنتز کلروفیل، فرایند گرده‌افشانی و بهبود کیفیت رویش گیاهان می‌باشند (Jan *et al.*, 2010). در آزمایشی Haroun و همکاران (۲۰۱۰) تأثیر آسپاراژین و گلوتامین بر میزان رشد و متابولیسم گیاه لوبیا را در شرایط درون شیشه‌ای مورد بررسی قرار دادند. به‌طور کلی همه پارامترهای رشدی در غلظت ۱ و ۲ میلی‌مولار آسپاراژین و گلوتامین افزایش پیدا کردند، در حالی که در پاسخ به غلظت‌های ۳، ۴ و ۵ میلی‌مولار کربوهیدرات و سایر پارامترهای رشدی کاهش مشاهده شد. روند تغییر در کلروفیل a، کلروفیل b و کاروتنوئید با تغییرات کربوهیدرات‌ها در غلظت‌های مختلف مشابه بود که با یافته‌های این پژوهش مطابقت داشت. در این پژوهش بیشترین میزان فنول کل و فلاونوئید مربوط به تیمار گلوتامین در غلظت ۲۰۰ میلی‌گرم بر لیتر بود. بیشتر موجودات زنده قادر به جذب آمونیاک به‌صورت اسیدآمینه گلوتامین هستند که منبع مستقیم نیتروژن برای بلوک‌های ساختاری ماکرومولکول‌ها و سایر ترکیب‌های بیولوژیکی است (Sungdae, 2002). گلوتامین منبع نیتروژنی است که به سهولت جذب می‌شود و از آنجا که نسبتاً غیرسمّی است سلول را قادر می‌کند تا سرعت رشد خود را در مدت زمان طولانی حفظ کند و براساس گزارش‌های گلوتامین (۰/۰۶۸ میلی‌مولار) حداکثر باززایی شاخساره را در کشت بافت منجر می‌شود (Vasudevan *et al.*, 2004).

منابع مورد استفاده

- Anjum, N.A., Gill, S.S. and Gill, R., 2014. Plant Adaptation to Environmental Change: Significance of Amino Acids and their Derivatives. Published by CABI, Oxfordshire, UK, 344p.
- Arnon, D.I., 1949. Copper enzymes in isolated chloroplasts: Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. Plant Physiology, 24(1): 1.
- Asad, S., Arshad, M., Mansoor, S. and Zafar, Y., 2009. Effect of various amino acids on shoot regeneration of sugarcane (*Sacchrum officinarum* L.). African Journal of Biotechnology, 8(7): 1214-1218.
- Barker, A.V. and Pilbeam, D.J., 2015. Handbook of Plant Nutrition. CRC press, 774p.
- Bellumori, M., Innocenti, M., Binello, A., Boffa, L., Mulinacci, N. and Cravotto, G., 2016. Selective recovery of rosmarinic and carnosic acids from rosemary leaves under ultrasound-and microwave-assisted extraction procedures. Comptes Rendus Chimie, 19(6): 699-706.
- Dellacassa, E., Lorenzo, D., Moyna, P., Frizzo, C. D., Serafini, L.A. and Dugo, P., 1999. *Rosmarinus officinalis* L. (Labiatae) essential oils from the South of Brazil and Uruguay. Journal of Essential Oil Research, 11(1): 27-30.
- Gedif, T. and Hahn, H.J., 2002. Herbalists in Addis Ababa and Butajira, Central Ethiopia: Mode of service delivery and traditional pharmaceutical practice. Ethiopian Journal of Health Development, 16(2): 183-189.
- Haroun, S.A., Shukry, W.M. and El-Sawy, O., 2010. Effect of asparagine or glutamine on growth and metabolic changes in *Phaseolus vulgaris* under in vitro conditions. Bioscience Research, 7(1): 1-21.
- Hausler, R.E., Ludewig, F. and Krueger, S., 2014. Amino acids - a life between metabolism and signaling. Plant Science, 229: 225-237.
- Ivanova, M. and Van Staden, J., 2010. Influence of gelling agent and cytokinins on the control of hyperhydricity in *Aloe polyphylla*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 104: 13-21.
- Jan, A., Hartley, D.M. and Lashuel, H.A., 2010. Preparation and characterization of toxic Aβ aggregates for structural and functional studies in Alzheimer's disease research. Nature Protocols, 5(6): 1186-1209.
- Khanna, H. and Raina, S.K., 1997. Enhanced in vitro plantlet regeneration from embryo-derived primary callus of Basmati rice cultivar through modification of nitrate-nitrogen and ammonium-nitrogen concentrations. Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology, 6(2): 85-89.
- Kim, Y.W. and Moon, H.K., 2007. Enhancement of somatic embryogenesis and plant regeneration in Japanese larch (*Larix leptolepis*). Plant Cell Tissue and Organ Culture, 88(3): 241-245.
- Krizek, D.T., Britz, S.J. and Mirecki, R.M., 1998. Inhibitory effects of ambient levels of solar UV-A and UV-B radiation on growth of cv. new red fire lettuce. Physiologia Plantarum, 103: 1-7.
- Liu, C.W., Sung, Y., Chen, B. and Lai, H., 2014. Effects of nitrogen fertilizers on the growth and nitrate content of lettuce (*Lactuca sativa* L.). International Journal of Environmental Research and Public Health, 114(4): 4427-4440.
- Misra, P. and Chaturvedi, H.C., 1991. Influence of inorganic salts on cytokinin induced caulogenesis in leaf segments of *Rosmarinus officinalis* L. Plant Science, 79(2): 229-235.
- Nagesh, K.S., Shanthamma, C. and Pullaiah, T., 2010. Somatic embryogenesis and plant regeneration from callus cultures of *Curculigo orchioides* Gaertn. Indian Journal of Biotechnology, 9(4): 408-413.
- Paradiso, V.M., Summo, C., Trani, A. and Caponio, F., 2008. An effort to improve the shelf life of breakfast cereals using natural mixed tocopherols. Journal of Cereal Science, 47(2): 322-330.
- Saltan, F.Z. and Ozaydin, O., 2013. Ethnobotany of Eskisehir and its environs. Pakistan Journal of Botany, 45(1), 207-214.
- Shirdel, M., Motallebi-Azar1, A., Masiha, S. and Mortazavi, N., 2011. Effects of inorganic nitrogen source and NH^{4+}: NO^{3-} ratio on proliferation of dog rose (*Rosa canina*). Journal of Medicinal Plants Research, 518: 4605-4609.
- Slinkard, K. and Singleton, V., 1997. Total phenol analysis: automation and comparison with manual methods. American Journal of Enology and Viticulture, 28: 49-55.
- Sungdae, P., 2002. Structural studies on *Sinorhizobium meliloti* Dctd related to ATP binding and activation. Thesis of Ph.D., The Pennsylvania State University.
- Tsouvaltzis, P., Koukounaras, A. and Siomos, A.S., 2014. Application of amino acids improves lettuce crop uniformity and inhibits nitrate accumulation induced by the supplemental inorganic nitrogen International Journal of Agriculture and Biology, 16(5): 951-955.
- Vasudevan, A., Selvaraj, N., Ganapathi, A., Kasthurirengan, S., Anbazhagan, V.R. and Manickavasagam, M., 2004. Glutamine: a suitable nitrogen source for enhanced shoot multiplication in *Cucumis sativus* L. Biologia Plantarum, 481: 125-128.
- Vasuki, K.S., Rao, V.S. and Rao, K.V.N., 1980. Effect of micronutrients and their interactions on growth and alkaloid production in *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. Plant Sciences, 89(3): 197-201.

Effects of various nitrogen sources on some morpho-physiological characteristics of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) under *in vitro* conditions

E. Chamani[1*], F. Narimaniyan[2], Y. Pourbeyrami Hir[3] and H. Heydari[4]

1*- Corresponding author, Horticulture Department of Ardabil Mohaghegh University, Ardabil, Iran
E-mail: echamani@uma.ac.ir
2- M.Sc. graduate, Horticulture Department of Ardabil Mohaghegh University, Ardabil, Iran
3- Horticulture Department of Ardabil Mohaghegh University, Ardabil, Iran
4- Ph.D. graduate, Horticulture Department of Ardabil Mohaghegh University, Ardabil, Iran

Received: March 2019 Revised: June 2021 Accepted: June 2021

Abstract

To investigate the effects of different nitrogen sources including ammonium nitrate, asparagine, and glutamine in five concentrations of 0, 50, 100, 150, and 200 mg l^{-1} on some physiological and biochemical characteristics of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.), an experiment was conducted in a completely randomized design with five repliacations. The indices including plant height, shooting rate, number of leaves, necrotic leaf size, chlorophylls *a*, *b*, and total chlorophyll content, and the content of carotenoids, phenols, and flavonoids were measured. The results showed that the nitrogen sources significantly ($P\leq0.01$) affected the all measured indices except the necrotic leaf size. The results of means comparison showed that the highest shooting rate and number of leaves were obtained at 100 mg l^{-1} of glutamine and asparagine and the highest plant height was obtained at 200 mg l^{-1} of ammonium nitrate. Also, the highest amount of photosynthetic pigments was obtained at 50 mg l^{-1} of asparagine and the highest amount of phenols and flavonoids was related to 200 mg l^{-1} of glutamine. In general, the results showed that the various nitrogen sources studied could positively and significantly improve the morphological and physiological characteristics of rosemary under *in vitro* conditions.

Keywords: Asparagine, glutamine, phenol, secondary metabolites, ammonium nitrate.