

مقاله پژوهشی

مطالعه پتانسیل دگرآسیبی ترکیب فنلی حاصل از عصاره متانولی علف‌هرز سوروف
(*Echinochloa crus-galli*) بر صفات جوانه‌زنی و رفتارهای سیتوژنتیک برنج

ابراهیم غلامعلی پور علمداری^{۱*}، امیر قربانی^۲، حسین صبوری^۳، میثم حبیبی^۴

چکیده مبسوط

مقدمه: بدون شک دگرآسیبی گیاهان یکی از عوامل مهم در مشخص نمودن توزیع و فراوانی بعضی از گونه‌ها در داخل جامعه گیاهی است. هدف از این آزمایش، ارزیابی اثر ترکیب فنلی حاصل از عصاره متانولی علف‌هرز سوروف بر صفات جوانه‌زنی و رفتارهای سیتوژنتیک برنج است.

مواد و روش‌ها: این آزمایش به منظور بررسی پتانسیل دگرآسیبی غلظت‌های مختلف (۰، ۰/۰۲۴، ۰/۰۴۸، ۰/۰۷۶ و ۰/۱ میلی‌مولار) ترکیب فنلی به دست آمده از عصاره متانولی کل اندام سوروف (*Echinochloa crus-galli*) بر صفات جوانه‌زنی برنج و همچنین تقسیم میتوزی سلول‌های مریستمی ریشه‌چه به صورت طرح کاملاً تصادفی به اجرا درآمد. استخراج ترکیب فنلی از روش عصاره‌گیری گرم با کمک حلال متانول انجام شد. به منظور مطالعه تقسیم میتوزی، ابتدا بذور برنج جوانه‌دار گردید. سپس بر روی قسمت انتهایی ریشه‌چه‌ها هر یک از مراحل نظیر تثبیت، هیدرولیز، رنگ آمیزی، له نمودن و بررسی میکروسکوپی نمونه‌ها انجام شد. شاخص‌های میتوزی و درصد ممانعت میتوزی محاسبه و همچنین درصد هر کدام از ناهنجاری‌های کروموزومی در چهار مرحله پروفاز، متافاز، آنافاز و تلوفاز نسبت به کل سلول‌ها محاسبه شد.

یافته‌ها: کمترین میزان درصد و سرعت جوانه‌زنی و درصد جوانه‌زنی نسبی مربوط به دو غلظت ۰/۰۷۶ و ۰/۱ میلی‌مولار ترکیب فنلی سوروف بود، به طوری که در این تیمارها جوانه‌زنی مشاهده نشد. در این مطالعه، تقسیم میتوز در نمونه‌های شاهد کاملاً طبیعی بود. طوری که گیاه برنج، ۱۲ کروموزوم را در مرحله متافاز نشان داد. همچنین کروموزوم‌ها در مرحله تلوفاز نیز حالت طبیعی داشتند و بی‌نظمی‌های کروموزومی در سلول‌های مریستمی نوک ریشه‌چه در تیمار شاهد مشاهده نشد. کمترین میزان شاخص‌های میتوزی و تعداد سلول‌های در حال تقسیم مربوط به غلظت ۰/۰۴۸ میلی‌مولار به ترتیب ۳۰/۱۹ و ۳۸۵ سلول بود. در مطالعه حاضر، میزان بی‌نظمی‌های کروموزومی در مراحل متافاز، آنافاز و تلوفاز با افزایش غلظت‌های ترکیب فنلی افزایش نشان داد، به گونه‌ای که در تیمار با غلظت ۰/۰۴۸ میلی‌مولار ترکیب فنلی به ترتیب ۲۸/۸۵ و ۱۶/۹۵ درصد بود. بیشترین بی‌نظمی‌های کروموزومی از نوع چسبندگی و کروموزوم‌های سرگردان مربوط به غلظت ۰/۰۴۸ میلی‌مولار ترکیب فنلی به ترتیب ۳۹/۸۳ و ۳۲/۲۵ درصد بود. از طرفی بیشترین پل‌های کروموزومی و توده‌ای شدن کروموزوم‌ها در تیمار ۰/۰۲۴ میلی‌مولار ترکیب فنلی به ترتیب، ۱۹/۲۷ و ۲۹/۸۳ درصد به دست آمد.

نتیجه‌گیری: در این مطالعه، ترکیب فنلی حاصل از عصاره متانولی سوروف اثر بازدارندگی معنی‌داری بر صفات جوانه‌زنی بذر، تقسیم میتوزی در سلول‌های نوک ریشه‌چه برنج داشتند. لذا در کشت مستقیم و یا نشایی برنج می‌بایست میزان بقایای حاصل از علف‌هرز سوروف را در مزرعه مورد کاشت این گیاه مد نظر قرار داد.

واژه‌های کلیدی: بی‌نظمی‌های کروموزومی، پل‌های کروموزومی، ترکیب فنلی، درصد جوانه‌زنی نسبی

جنبه‌های نوآوری:

۱- تفاوت در تاثیر غلظت‌های مختلف ترکیب فنلی حاصل از عصاره متانولی علف‌هرز سوروف بر جوانه‌زنی و کاهش رفتارهای سیتوژنتیک برنج مربوط به حد آستانه غلظت آن‌ها است.

۲- کاشت ارقام مقام برنج در کشت مستقیم و یا در شرایط خزانه به ترکیبات دگرآسیب بقایای علف‌هرز سوروف پیشنهاد می‌گردد.

^۱ استادیار گروه تولیدات گیاهی دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه گنبدکاووس

^۲ دانش آموخته کارشناسی ارشد رشته شناسایی و مبارزه با علف‌های

هرز دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه گنبدکاووس

^۳ دانشیار گروه تولیدات گیاهی دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه گنبدکاووس

^۴ مربی گروه زیست شناسی دانشکده علوم پایه دانشگاه گنبدکاووس



مقدمه

برنج با نام علمی *Oryza sativa* L. از تیره غلات بعد از گندم مهم‌ترین محصول کشاورزی جهان است و نقش مهمی در تغذیهٔ بیش از نیمی از جمعیت جهان دارد. ۹۰ درصد سطح زیر کشت جهانی برنج در آسیا قرار دارد. همگام با افزایش جمعیت، تولید جهانی برنج نیاز به افزایش قابل توجهی در ۱۰ سال بعدی دارد (پاندی و ولاسکو، ۲۰۰۵). یکی از مهمترین موانع زیستی در تولید برنج، علف‌های هرز هستند که بخش قابل توجهی از هزینه‌های تولید را به خود اختصاص داده و عامل بازدارنده کلیدی در صرف وقت و تولید می‌باشند (آزادبخت و همکاران، ۲۰۱۲). علف‌های هرز اغلب باعث آماده‌سازی نامناسب زمین، مشکلات آبیاری، کاهش حاصلخیزی خاک و مدیریت محصول می‌شوند (رودنبرگ و دمنت، ۲۰۰۹) و عملکرد برنج را ۱۵ تا ۲۰ درصد و در موارد شدیدتر تا بیش از ۵۰ درصد، بسته به گونه و تراکم علف هرز کاهش می‌دهند (حسانی‌زامن^۱ و همکاران، ۲۰۰۹). در این بین دو علف هرز سوروف (*Echinochloa crus-galli* (L.) Beauv) و اویارسلام (*Cyperus difformis* L.) به‌عنوان مهمترین علف‌های هرز مزارع برنج محسوب شده و خسارت قابل توجهی را به دلایل شباهت مورفولوژیکی و اکولوژیکی که با برنج دارند به این گیاه وارد می‌سازند. خسارت این علف‌های هرز در مزارع برنج تا ۶۰ درصد گزارش شده است (عرفانی^۲، ۲۰۰۰). بدون شک تداخل مواد دگرآسیب یکی از فاکتورهای مهم در مشخص نمودن توزیع و فراوانی بعضی از گونه‌ها در داخل جامعه گیاهی است. در حقیقت کاهش عملکرد گیاهان زراعی توسط علف‌های هرز می‌تواند نتیجه مستقیم رقابت و دگرآسیبی و یا فعالیت توام آن دو با هم باشد (کیدیلو و یانر^۳، ۲۰۰۴).

برخی از گیاهان گروه بزرگ و متنوعی از ترکیبات

آلی به‌نام متابولیت‌های ثانویه را تولید می‌کنند، طوری که

تاکنون بیش از ۱۰۰۰۰۰ متابولیت ثانویه شناسایی شده‌اند و هنوز هم تعداد بیشتری در حال اضافه شدن و بررسی هستند (اکسمن کالدنتی و اینز^۴، ۲۰۰۴). پیش‌ماده‌های ساختاری متابولیت‌های ثانویه از متابولیت‌های اولیه حاصل می‌شوند. مواد دگرآسیب ترشح شده از اندام‌های مختلف یک گونه گیاهی نه تنها بر گونه‌های گیاهی دیگر، بلکه بر خود گونه نیز می‌تواند تأثیر گذاشته و موجب کاهش رشد و عملکرد آن در سال‌های بعد گردد (خراسانی‌نژاد^۵ و همکاران، ۲۰۰۹). اصولاً ترکیبات شیمیایی، به‌خصوص ترکیبات ثانویه، با دارا بودن اثر دگرآسیبی آللوکمیkal^۶ نامیده می‌شوند (مونیکا^۷ و همکاران، ۲۰۰۷). به‌طور کلی ترکیبات دگرآسیب به چهار دسته آلکالوئیدها، روغن‌های ضروری، گلیکوزوئیدها و غیره نظیر فنل‌ها، اسیدهای آلی و دیگر ترکیبات طبقه‌بندی می‌شوند (امیدبیگی^۸، ۲۰۰۹). بیش از ۸۰۰۰ نوع ترکیبات فنلی از محصولات گیاهی مختلف استخراج شده است که شامل فلاونوئیدها، اسیدهای فنلی، کومارین‌ها و تانن‌هاست که هر گروه به زیرگروه‌هایی تقسیم می‌شوند (اردمن^۹ و همکاران، ۲۰۰۷). کروز- اورتگا^{۱۰} و همکاران (۲۰۰۷) نشان دادند که آللوکمیkal‌های آزاد شده از گیاهان دگرآسیب باعث افزایش انواع اکسیژن واکنشگر در گیاهان پذیرنده و در نتیجه فعال شدن یا تغییر در نحوه فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان می‌شوند. ترکیب فنلی از ترکیبات موثر در پدیده دگرآسیبی هستند که در ساختمان شیمیایی خود واجد یک حلقه آروماتیک همراه یک یا چند عامل هیدروکسیل می‌باشند (کازمی^{۱۱} و همکاران، ۲۰۱۷). در دهه‌های اخیر محققان بسیاری اثرات گوناگون آللوکمیkal‌های گیاهان مختلف را بر فرآیندهای فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی گزارش کرده‌اند (عبدو رثوف و سیدیکو^{۱۲}، ۲۰۱۳، ۲۰۱۲؛ سشاه^{۱۳} و همکاران، ۲۰۰۷؛

⁷ Oksman-Caldentey and Inzé

⁸ Khorasani Nezhad

⁹ Allelochemicals

¹⁰ Monica

¹¹ Omidbeigi

¹² Erdman

¹³ Cruz- Ortega

¹⁴ Kazemi

¹⁵ Abdul Rauf and Siddiqui

¹⁶ Setia

¹ Pandey and Velasco

² Azadbakht

³ Rodenburg and Demont

⁴ Hasanuzzaman

⁵ Erfani

⁶ Kadiolu and Yanar

(تقسیم میتوز) بذر باقلا را بررسی نمودند. نتایج آن‌ها نشان داد که شاخص میزان جوانه‌زنی، رشد گیاهچه‌ای و شاخص میتوزی با افزایش غلظت ترکیب پارتنین، کاهش نشان داد. در مقابل میزان بی‌نظمی‌های کروموزومی افزایش یافت.

علف‌هرز درجه اول برنج، گیاه سوروف است و مشکلات جدی را برای برنج‌کاران در سال‌های اخیر ایجاد نموده و کشاورز به دلیل وجود تهاجم این علف‌هرز مجبور به استفاده زیادی از علف‌کش‌های شیمیایی است که این امر موجب شکل‌گیری بیوتیپ‌های مقاوم و آلودگی شدید محیط زیست می‌گردد. بنابراین جستجو و توسعه علف‌کش‌های جدید از گیاهان دارای توان دگرآسیبی روشی مؤثر جهت تولید علف‌کش‌ها با منشاء زیستی و یا کنترل زیستی علف‌های هرز است که با شناسایی توان دگرآسیبی گیاهان آغاز می‌شود. از طرف دیگر با توجه به تحقیقات انجام شده، عصاره متانولی علف‌هرز سوروف دارای حداکثر قابلیت در استخراج متابولیت ثانویه فنل نسبت به سایر حلال‌ها است (ساتس و همکاران، ۲۰۱۳). بنابراین هدف از این آزمایش، ارزیابی اثر ترکیب فنلی حاصل از عصاره متانولی علف‌هرز سوروف بر صفات جوانه‌زنی و رفتارهای سیتوژنتیک برنج در کشت مستقیم و یا در شرایط خزانه بود.

مواد و روش‌ها

شرایط اقلیمی و جغرافیایی محل جمع‌آوری نمونه‌های علف‌های هرز، شناسایی و آماده‌سازی آن‌ها

این آزمایش برای ارزیابی توانایی دگرآسیبی غلظت‌های مختلف ترکیب فنلی حاصل از عصاره متانولی علف‌هرز سوروف (*Echinochloa crus-galli*) بر صفات جوانه‌زنی برنج و اثر آن‌ها بر تقسیم میتوزی سلول‌های مریستمی ریشه‌چه به صورت طرح کاملاً تصادفی در آزمایشگاه علوم علف‌های هرز و زیست‌شناسی دانشگاه گنبدکاووس در سال ۱۳۹۴ به اجرا در آمد. ابتدا نمونه‌های علف‌هرز سوروف در نیمه اول اردیبهشت از روستای تسبیح‌کلا از توابع منطقه شهر چمستان نور استان مازندران در مرحله گیاهچه‌ای جمع‌آوری شد.

یانگ^۱ و همکاران، ۲۰۰۲؛ اینهلگ^۲، ۲۰۰۲. در این راستا تاکنون تحقیقات مختلفی در مورد شناسایی و ارزیابی توان دگرآسیبی علف‌های هرز مانند سوروف بر مهار رشد برنج به طور گسترده انجام شده است، اما گزارش‌ها در مورد اثرات آلوکمیکال‌ها از جمله ترکیب فنلی حاصل از عصاره آلی سوروف بر سیتولوژی گیاهان به‌ویژه برنج بسیار اندک است. ساتس^۳ و همکاران (۲۰۱۳) با مطالعه غربالگری ترکیبات پلی فنلی عصاره‌های آلی علف‌هرز سوروف (*Echinochloa crusgalli* Roxb) به‌وسیله روش‌های کروماتوگرافی، گزارش نمودند که عصاره متانولی این علف‌هرز از بیشترین مقدار فنل کل (۰/۶۷ ± میلی‌گرم گالیک اسید بر ۱۰۰ گرم نمونه) برخوردار بود. ۱۱ ترکیب در عصاره علف‌هرز سوروف به‌وسیله روش‌های کروماتوگرافی مورد شناسایی قرار گرفت، طوری که فلاونوئیدها و اسیدهای کربوکسیلیک فنلی از مهمترین این ترکیبات بودند. تحقیقات حیدرزاده^۴ و همکاران (۲۰۱۲) نشان داد که ترشحات ریشه حاصل از سوروف اثر فیتوتوکسی روی ارقام برنج دارد.

سیتوژنتیک علمی است که از ترکیب سیتولوژی و ژنتیک به‌وجود آمده است. این علم شامل کار با کروموزوم‌ها (روش‌های رنگ‌آمیزی کروموزوم‌ها)، عمل و حرکت کروموزوم‌ها (تقسیم سلولی میتوزی و میوزی)، تعداد و ساختمان کروموزوم‌ها (تجزیه کاریوتایپ) و تغییرات متعدد ساختمانی و رفتارهای مربوط به نوترکیبی، انتقال و بیان ژن‌هاست. اصول پایه برای مطالعه کروموزوم‌های میتوزی و میوزی در همه گونه‌های گیاهی مشابه بوده و شامل جمع‌آوری نمونه‌ها، تثبیت و رنگ‌آمیزی است (بخشی خانیکی^۵، ۲۰۱۰). عبدو رئوف و سیدیکو (۲۰۱۳) اثر دگرآسیبی ترکیب سمی پارتنین (جزء دسته ترپنوئیدها) استخراج شده از گونه علف‌ستاره‌ای (*Parthenium hysterophorus*) در چهار غلظت ۱۰۰، ۲۰۰، ۳۰۰ و ۴۰۰ میکرومول پارتنین به مدت ۸ ساعت بر صفات سیتومورفولوژی

¹ Yang

² Einhellig

³ Sathis

⁴ Heidarzade

⁵ Bakhshi Khaniki

Biochrom libera-S 22 در نقطه جذب ۶۵۰ نانومتر خوانده شد. در نهایت، میزان فنل کل بر حسب میلی‌گرم گالیک اسید در ۱۰۰ گرم نمونه خشک محاسبه شد (مالیک و سینگ^۴، ۱۹۸۰). با توجه به غلظت محاسبه شده از روی نمودار استاندارد اسید گالیک و جرم مولی گالیک (۱۷۰/۱۲) گرم بر مول، غلظت فنلی اسید عصاره ۲۰۰۰ میلی‌گرم در ۱۰۰ گرم نمونه به‌دست آمد. سپس محلول‌های ۰/۱، ۰/۰۷۶، ۰/۰۴۸ و ۰/۰۲۴ درصد از ترکیب فنلی بر حسب میلی‌مول اسید گالیک در ۱ گرم نمونه خشک محاسبه گردید. متانول موجود در عصاره از طریق تفاوت نقطه جوش خارج گردید، طوری که نقطه جوش متانول و فنل به ترتیب ۶۵ و ۱۸۱/۷ درجه سلسیوس است.

آزمایش‌های جوانه‌زنی

ابتدا بذره‌های خشک و سالم برنج با هیپوکلریت سدیم ۰/۵ درصد به مدت یک دقیقه ضدعفونی سطحی گردید، سپس به‌طور کامل با آب مقطر شستشو داده شد. بذرها به مدت ۸ ساعت در لوله‌های آزمایش حاوی ۲۵ میلی‌لیتر محلول فنلی با غلظت‌های مختلف مورد بررسی خیس‌انده شدند. نمونه شاهد در آب مقطر تیمار شد. هر غلظت شامل ۱۰۰ عدد بذر بودند. در مرحله بعد تمام بذره‌های مربوط به هر تیمار سه بار با آب مقطر شستشو داده شد. بذرها در کاغذ صافی مرطوب و در پتری با قطر ۱۵ سانتی‌متر قرار داده شد. هر تیمار با چهار تکرار و هر تکرار شامل ۲۵ عدد بذر برنج رقم دمسیاه بود. پتری‌های حاوی بذر در اتاقک رشد و در دمای ۲۵±۳ درجه سلسیوس و دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی نگهداری شدند (محمدزاده^۵ و همکاران، ۲۰۰۹). از روز دوم تعداد بذره‌های جوانه‌زده در هر روز تا روز هفتم مورد شمارش قرار گرفت. سپس در انتهای روز هفتم صفات ذیل مورد اندازه‌گیری قرار گرفت:

برای محاسبه درصد جوانه‌زنی، بذور جوانه‌زدها با ریشه بلندتر از دو میلی‌متر شمارش شدند (هاردگری و

در ابتدا نمونه گیاهی مورد بررسی با کمک فلور علف‌های هرز استان مازندران مورد شناسایی و سپس جهت برداشتن گرد و غبار با آب مقطر برای مدت کوتاهی مورد شستشو قرار گرفت. نمونه‌های گیاهی پس از پژمرده شدن در شرایط سایه در آون با دمای ۶۰ درجه سلسیوس تا رسیدن به وزن ثابت (۱۰ درصد بر وزن پایه‌تر) خشک شدند (کسر^۱، ۲۰۰۰) و سپس توسط آسیاب پودر گردیدند. نمونه‌ها تا قبل از استفاده در کیسه‌های پلاستیکی نگهداری شدند.

استخراج ترکیب فنلی از عصاره متانولی علف‌هرز سوروف

برای استخراج ترکیب فنلی از روش عصاره‌گیری گرم استفاده شد. با توجه به این‌که عصاره آلی متانولی علف‌هرز سوروف دارای حداکثر قابلیت استخراج ترکیب فنلی نسبت به سایر حلال‌ها است (ساتس و همکاران، ۲۰۱۳)، این در حالی است که حلال آب از کمترین قابلیت جهت استخراج این ترکیب برخوردار است (داوری‌نژاد و همکاران، ۲۰۱۷). بدین منظور، مقدار ۰/۱ گرم از پودر کل اندام سوروف با ترازوی دیجیتال با دقت یک ده هزارم توزین شده و بر آن ۲۰ میلی‌لیتر متانول ۸۰ درصد ریخته، مخلوط حاصل به مدت ۶ ساعت در دستگاه لرزاننده قرار داده شد. سپس به مدت ۲ ساعت در بن‌ماری با دمای ۵۰ درجه سلسیوس قرار گرفت. پس از گذشت این مدت، عصاره‌ها توسط کاغذ صافی فیلتر و در بالن ژوژه ۲۵ میلی‌لیتری با حلال متانول ۸۰ درصد به حجم رسانده شد (حاجی مهدی‌پور^۳ و همکاران، ۲۰۱۰). جهت اندازه‌گیری مقدار فنل کل، نیم میلی‌لیتر از محلول حاصل با ۲/۵ میلی‌لیتر آب مقطر به حجم سه میلی‌لیتر رسانده شد، سپس روی محلول به‌دست آمده نیم میلی‌لیتر معرف فولین سیوکالتو ۵۰ درصد اضافه شد و بعد از سه دقیقه، دو میلی‌لیتر کربنات سدیم ۲۰ درصد به آن افزوده گردید. محلول حاصل به مدت ۱۰ دقیقه در حمام آب جوش قرار داده و پس از سرد شدن، میزان جذب نوری به‌وسیله دستگاه اسپکتروفتومتر با مدل

¹ Caceres

² Davarynejad

³ Haji Mehdipour

⁴ Malick and singh

⁵ Mohammadzadeh

ریشه‌چه به‌طول تقریبی ۰/۵ تا ۱ سانتی‌متر بود. سپس جهت مطالعه، مراحل به‌شرح ذیل انجام شد.

تثبیت^۶ سلول‌ها و محتویات آن‌ها

به‌منظور حفظ و نگهداری اشکال سلول‌ها و محتویات آن‌ها از جمله کروموزوم‌ها و ممانعت از تغییرات احتمالی از محلول‌های تثبیت‌کننده استفاده شد. در ابتدا قسمت انتهایی ریشه‌چه‌ها در ساعات مختلف روز (۹ صبح تا ۵ بعد از ظهر) قطع و در محلول ۸- هیدروکسی کینولین ۰/۰۰۲ مولار به مدت ۳ ساعت پیش‌تیمار شدند. سپس ریشه‌چه‌ها به مدت ۳۰ دقیقه با آب مقطر شستشو داده و سپس وارد محلول تثبیت‌کننده شد. برای تثبیت از محلول فارمر (استیک اسید گلاسیال و اتانول به نسبت یک به سه) به‌مدت ۲۴ ساعت استفاده شد.

نگهداری^۷ مریستم انتهایی ریشه‌چه

جهت نمونه‌برداری از مریستم انتهایی ریشه‌چه، پس از خارج کردن از محلول تثبیت‌کننده فارمر، با آب مقطر چند مرتبه شستشو و آب اضافی ریشه‌چه‌ها با کاغذ خشک‌کن حذف شد. سپس بلافاصله در محلول اتانول ۷۰ درصد قرار داده و در دمای چهار تا پنج درجه سلسیوس در یخچال نگهداری شد. این امر جهت نگهداری ریشه‌چه‌ها برای مدت طولانی و استفاده در فرصت مناسب صورت گرفت.

له و نرم کردن بافت مریستم انتهایی ریشه‌چه (هیدرولیز)^۸

بدین منظور پس از خارج کردن ریشه‌چه‌ها از اتانول ۷۰ درصد، چندین مرتبه با آب مقطر شستشو داده شد و سپس در محلول هیدرولیز کننده اسید هیدروکلریک یک نرمال قرار داده و در نهایت با کمک چراغ الکلی در دمای ۶۰ درجه سلسیوس به‌مدت ۱۰ دقیقه حرارت داده شد. ریشه‌چه‌ها پس از انتقال به اسید هیدروکلریک یک نرمال، به مدت پنج دقیقه در روی شعله چراغ الکلی (با حرارت حدود ۶۰ درجه سلسیوس) به‌صورت متناوب

ون وکتور^۱، ۲۰۰۰). درصد جوانه‌زنی از رابطه (۱) محاسبه شد
رابطه ۱:

$$GP = \frac{\sum_{i=0}^n n_i}{N} \times 100$$

در این رابطه n_i تعداد بذره‌های جوانه زده و N تعداد کل بذره‌های کشت شده است.

جهت اندازه‌گیری سرعت جوانه‌زنی، از روز دوم آزمایش تعداد بذره‌های جوانه‌زده به‌صورت روزانه تا روز هفتم در زمان معین ثبت شد و سپس با استفاده از روش مگوتر^۲ (۱۹۶۲) (رابطه ۲) محاسبه شد. بدین صورت‌که در آن N_i تعداد بذره‌های جوانه‌زده در هر روز و T_i تعداد روزهای پس از زمان شروع آزمایش است (روز اول تا روز هفتم).

$$GR = \sum_{i=0}^n \frac{N_i}{T_i} \quad \text{رابطه ۲:}$$

درصد جوانه‌زنی نسبی^۳ از رابطه ۳ محاسبه شد (رو و کیل^۴، ۱۹۸۶).

$$RG = \frac{TGS}{CGS} \times 100 \quad \text{رابطه ۳:}$$

در این رابطه RG : درصد جوانه‌زنی نسبی، TGS : تعداد بذره‌های جوانه‌زده تیمار، CGS = تعداد بذره‌های جوانه‌زده شاهد

محاسبه درصد ممانعت از جوانه‌زنی بذر^۵ با استفاده از رابطه ۴ برآورد شد.

$$PISG = \frac{R_2 - R_1}{R_1} \times 100 \quad \text{رابطه ۴:}$$

که در آن $PISG$ درصد ممانعت از جوانه‌زنی، R_1 شاهد و R_2 تیمار است.

مطالعات میتوزی

به‌منظور بررسی اثر غلظت‌های مختلف عصاره متانولی حاصل از علف‌هرز سوروف بر رفتارهای سیتوژنتیک برنج (رقم دم‌سیاه)، ابتدا بذره‌های برنج جوانه‌دار گردیده است. ملاک جوانه‌زنی، ظهور جزئی

¹ Hardgree and Van Vactor

² Maguire

³ Relative Germination Percentage

⁴ Rho and Kil

⁵ Percentage Inhibition in Seed Germination

⁶ Fixation cells

⁷ Storage

⁸ Hydrolysis

رابطه ۵:

$$100 \times \frac{\text{تعداد کل سلول‌های در حال تقسیم}}{\text{تعداد کل سلول‌های شمارش شده}} = \text{شاخص میتوزی}$$

رابطه ۶:

$$100 \times \frac{\text{شاخص میتوزی در تیمار} - \text{شاخص میتوزی در شاهد}}{\text{شاخص میتوزی در شاهد}} = \text{ممانعت میتوزی}$$

درصد هر کدام از ناهنجاری‌های کروموزومی در چهار مرحله پروفاز، متافاز، آنافاز و تلوفاز نسبت به کل سلول‌های شمارش شده، محاسبه و مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت (تیررک و همکاران، ۲۰۱۰؛ گلنسکا^۶ و همکاران، ۲۰۰۷؛ گبرا^۷ و همکاران، ۲۰۰۶). تصاویر میکروسکوپ نوری برخی از ناهنجاری‌ها نیز ارائه شد.

تجزیه و تحلیل داده‌ها

ابتدا نرمال بودن داده‌ها توسط نرم افزار Minitab با نسخه ۱۴ انجام شد. تجزیه واریانس داده‌ها با کمک نرم افزار SAS با نسخه ۹/۱ و مقایسه میانگین داده‌ها با کمک آزمون کمترین اختلاف معنی‌دار حفاظت شده (در جایی که آماره F معنی‌دار) در سطح احتمال ۵ درصد انجام شد (سلطانی و ترابی^۸، ۲۰۱۴).

نتایج و بحث

نتایج حاصل از اثر غلظت‌های مختلف ترکیب فنلی حاصل از عصاره متانولی علف‌هرز سوروف بر صفات جوانه‌زنی بذر برنج:

سرعت جوانه‌زنی

نتایج نشان داد که تیمارهای مختلف ترکیب فنلی حاصل از عصاره متانولی از گیاه سوروف اثرات معنی‌داری ($p < 0.01$) بر سرعت جوانه‌زنی برنج داشتند (جدول ۱). بر اساس جدول ۲، بیشترین سرعت جوانه‌زنی مربوط به تیمار شاهد به میزان ۴/۱۷ بذر در روز بود. در حالی که کمترین سرعت جوانه‌زنی به هر دو تیمار ۰/۷۶ و ۰/۱ میلی‌مولار ترکیب فنلی عصاره متانولی علف‌هرز سوروف بود، طوری که در این تیمارها

حرارت داده شدند. باید دقت نمود که اسید هیدروکلریک نجوشد و یا تولید بخار ننماید زیرا در این صورت بافت ریشه‌چه تخریب می‌گردد.

رنگ آمیزی^۱ منطقه مریستمی نوک ریشه‌چه

پس از هیدرولیز ریشه‌چه‌ها، چندین مرتبه با آب به‌خوبی شستشو داده شد. سپس منطقه مریستمی نوک ریشه‌چه جدا و روی لام قرار گرفت. در مرحله بعدی، یک قطره رنگ استوکارمن دو درصد (دو گرم پودر کارمن + ۱۰۰ میلی‌لیتر اسید استیک ۴۵ درصد) به آن اضافه شد.

له نمودن^۲ نمونه جهت پخش سلول‌ها در یک سطح

پس از اضافه کردن رنگ روی نمونه یک لامل روی آن قرار داده شد. سپس با نوک سوزن چند ضربه آرام روی لامل وارد شد تا سلول‌ها کاملاً پخش شوند. جهت رنگ‌آمیزی بهتر لام به‌طور متناوب حرارت داده شد (زیر نقطه جوش). در نهایت برای این‌که سلول‌ها به‌خوبی پخش و در یک سطح قرار گرفته و زمینه لام بی‌رنگ شود با نوک انگشت فشار یکسانی روی لام وارد شد. برای جلوگیری از خشک شدن نمونه و نیز بررسی با لنز ۱۰۰× میکروسکوپ نوری، دور لامل با پارافین گرم، محصور شد (شیدایی^۳ و همکاران، ۲۰۰۹).

بررسی میکروسکوپی

از اسلایدهای تهیه شده با میکروسکوپ نوری Olympus مدل E ۱۰۰ در بزرگ‌نمایی ۱۰۰ با دوربین دیجیتال Canon مدل G6 عکس‌برداری و مطالعه انجام شد. از روی تصاویر تهیه شده، شاخص میتوزی، درصد ممانعت از شاخص میتوزی و ناهنجاری‌های کروموزومی (در چهار مرحله پروفاز، متافاز، آنافاز و تلوفاز) مورد بررسی قرار گرفت.

شاخص میتوزی و درصد ممانعت میتوزی طبق رابطه‌های ۵ و ۶ محاسبه شدند (تیررک^۴ و همکاران، ۲۰۱۰؛ محمدال-اشری^۵، ۲۰۱۲).

¹ Staining

² Squashing

³ Sheidai

⁴ Teerarak

⁵ Mohamed and El-Ashry

⁶ Glin'ska

⁷ Gabara

⁸ Soltani and Torabi

جوانه‌زنی مشاهده نشد.

و کوئینون‌ها به‌عنوان مهمترین مواد دگرآسیب مطرح می‌باشند. فنل‌ها، تانن‌ها، فلاونوئیدها و گلیکوزیدها را به‌عنوان ترکیب‌های بازدارنده جوانه‌زنی معرفی کرده‌اند (کوهلی^۳ و همکاران، ۲۰۰۱). تأثیرات شناخته شده آللوکمیکال‌ها شامل ناهنجاری‌های آناتومیکی، کاهش جذب آب، کاهش جوانه‌زنی، کاهش رشد جوانه و کلروزه شدن است. میزان بازدارندگی این مواد به غلظت عصاره آبی گیاه مورد آزمایش بستگی دارد (ال-شورا و عبدالگاواد^۴، ۲۰۱۵؛ میشر^۵، ۲۰۱۵).

درصد جوانه‌زنی نسبی

بر اساس جدول ۱، تیمارهای مختلف ترکیب فنلی حاصل از عصاره متانولی علف‌هرز سوروف اثر معنی‌داری بر درصد جوانه‌زنی نسبی داشتند ($p < 0.01$). بیشترین درصد جوانه‌زنی نسبی به تیمار شاهد اختصاص داشت. در مقابل به‌دلیل عدم مشاهده جوانه‌زنی برنج تحت دو تیمار ۰/۰۷۶ و ۰/۱ میلی‌مولار از ترکیب فنلی ناشی از عصاره متانولی علف‌هرز سوروف، این میزان صفر گزارش گردید (جدول ۲). با توجه به این‌که درصد جوانه‌زنی نسبی بیانگر تعداد بذرهای جوانه‌زده تیمار به تعداد بذرهای جوانه‌زده شاهد است و از طرفی تمام بذرهای کشت شده در نمونه شاهد جوانه‌زدند، بنابراین می‌توان استنباط نمود که بذرهای برنج مورد مطالعه از کیفیت مناسبی برخوردار بودند طوری‌که تحت تاثیر کاهنده غلظت‌های مختلف ترکیب فنلی حاصل از عصاره متانولی علف‌هرز سوروف قرار گرفتند.

درصد جوانه‌زنی

بر اساس جدول ۱، درصد جوانه‌زنی به‌طور معنی‌داری تحت تاثیر غلظت‌های مختلف ترکیب فنلی حاصل از عصاره متانولی علف‌هرز سوروف قرار گرفت. ترتیب درصد جوانه‌زنی در تیمارهای مختلف به‌صورت $0.24 < 0.48 < 0.76 = 1$ میلی‌مولار بود (جدول ۲). این نتیجه را می‌توان این‌گونه توجیه نمود که تفاوت در تاثیر غلظت‌های مختلف ترکیب فنلی حاصل از عصاره متانولی علف‌هرز سوروف بر درصد و سرعت جوانه‌زنی مربوط به تفاوت در حد آستانه غلظت آن‌ها است. با توجه به نتایج بالا، علت کاهش مولفه‌های جوانه‌زنی برنج می‌تواند افزایش میزان ترکیب فنلی در عصاره متانولی علف‌هرز سوروف و سمیت ناشی از آن‌ها باشد. البته ممکن است که مولفه‌های پتانسیل اسمزی غلظت عصاره و فشار ناشی از آن‌ها در تشدید اثر آللوکمیکال ترکیب فنلی در محیط کشت بذرهای مرتبط باشد که موجب تنش اکسیداتیو در سلول‌ها می‌گردند. در این مطالعه، غلظت‌های ۰/۰۷۶ و ۰/۱ میلی‌مولار از ترکیب فنلی حاصل از عصاره متانولی سوروف حداکثر ممانعت از جوانه‌زنی بذرهای برنج را نشان دادند. بنابراین می‌توان استنباط نمود این دامنه از ترکیبات فنلی سوروف برای بذر برنج رقم دمسیاه کشنده بوده است، لذا کاشت ارقام مقاوم به بقایای ترکیبات حاوی مواد دگرآسیب علف‌هرز سوروف پیشنهاد می‌گردد. میقانی^۱ (۲۰۰۳) گزارش نمودند که اسیدهای فنلی، فعالیت آنزیم اکسین اکسیداز را تنظیم می‌نمایند، تانن‌ها و بسیاری از ترکیبات فنلی دیگر، فعالیت آمیلاز، سلولاز، پلی گالاکتوروناز، پپسین، پروتئینازها، دهیدروژنازها، دکربوکسیلازها و غیره را باز می‌دارند. ریگوسا و پدرول^۲ (۲۰۰۲) گزارش نمودند که پدیده دگرآسیبی به نوع مواد آللوکمیکال، غلظت مواد آللوشمیایی و حساسیت گیاه هدف بسیار وابسته است. در میان آللوکمیکال‌ها ترکیبات حلقوی نظیر فنل‌ها، کومارین‌ها، فلاونوئیدها، تانن‌ها، مشتقات سینامیک اسید

³ Kohli

⁴ El- Shora and Abd El- Gawad

⁵ Mishra

¹ Mighani

² Regosa and Pedrol

جدول ۱. تجزیه واریانس (میانگین مربعات) اثر غلظت‌های مختلف ترکیب فنلی حاصل از عصاره متانولی علف‌هرز سوروف بر صفات جوانه‌زنی برنج

Table 1. Analysis of variance (mean square) for different concentrations of the phenolic compound obtained from the methanol extract of *E. crus-galli* on seed germination traits of rice

منابع تغییرات S.O.V	درجه آزادی df	درصد جوانه‌زنی Germination percentage	سرعت جوانه‌زنی Germination rate	درصد جوانه‌زنی نسبی Relative germination percentage
Treatment تیمار	4	15.04**	1.874**	15.04**
Error خطا	15	0.0104	0.0109	0.0104
ضریب تغییرات (C.V) Coefficient of variance (%)	-	5.460	23.44	5.460

** : نشان‌دهنده معنی‌داری در سطح احتمال یک درصد

** : indicates significant at 1% confidence level

جدول ۲. مقایسه میانگین اثر غلظت‌های مختلف ترکیبات فنلی حاصل از عصاره متانولی علف‌هرز *E. crus-galli* بر صفات جوانه‌زنی برنج

Table 2. Mean comparison of different concentrations of the phenolic compounds obtained from the methanol extract of *E. crus-galli* on seed germination percentage of rice

غلظت‌های فنلی (میلی‌مولار) Phenol concentrations (mM)	درصد جوانه‌زنی Germination percentage	سرعت جوانه‌زنی (بذر در روز) Germination rate (Seed/day)	درصد جوانه‌زنی نسبی Relative germination percentage	درصد ممانعت از جوانه‌زنی بذر Percentage inhibition in seed germination
T1	100 ^a	4.170 ^a	100 ^a	0
T2	10.25 ^b	0.4175 ^b	10.25 ^b	89.75
T3	9.50 ^b	0.290 ^b	9.50 ^b	90.50
T4	0.00 ^c	0.00 ^c	0.00 ^c	100
T5	0.00 ^c	0.00 ^c	0.00 ^c	100
LSD5%	0.1539	0.1574	0.1539	-

T1: شاهد، T2: 0.024، T3: 0.048، T4: 0.076، T5: 0.1 میلی‌مولار

میانگین‌های دارای حروف متفاوت در هر ستون، از نظر آماری در سطح احتمال ۵ درصد اختلاف معنی‌داری دارند (PLSD).

Means with non-similar letters at each column are significantly different at 5% confidence level using PLSD test

میلی‌مولار (۳۸۵) و نمونه شاهد (۴۹۲) بود. بر اساس این جدول، تقسیم میتوز در نمونه شاهد کاملاً طبیعی بود. گیاه برنج ۱۲ کروموزوم را در مرحله متافاز نشان داد، طوری که در مرحله آنافاز به نسبت ۱۲:۱۲ از یکدیگر جدا شدند. همچنین تیمار شاهد در مرحله تلوفاز نیز از روند طبیعی برخوردار بود و بی‌نظمی‌های کروموزومی در سلول‌های مریستمی نوک ریشه‌چه مشاهده نگردید. در این مطالعه، میزان بی‌نظمی‌های کروموزومی در مراحل متافاز، آنافاز و تلوفاز با افزایش غلظت‌های ترکیب فنلی حاصل از عصاره متانولی افزایش نشان داد، به گونه‌ای که در تیمار با غلظت ۰/۰۴۸ میلی‌مولار ترکیب فنلی به ترتیب ۲۸/۸۵ و ۱۶/۹۵ درصد بود (جدول ۳). این امر احتمالاً به واسطه اثر منفی

میزان بی‌نظمی‌های کروموزومی در تقسیم میتوز تحت غلظت‌های مختلف ترکیب فنلی حاصل از عصاره متانولی علف‌هرز سوروف نتایج به دست آمده از تجزیه و تحلیل سیتوژنتیکی نشان داد که ترکیب فنلی حاصل از عصاره متانولی سوروف بر فرآیند تقسیم میتوز اثرگذار بوده و بی‌نظمی‌های کروموزومی را القاء کرد. بررسی‌ها نشان داد که بالاترین مقدار شاخص میتوزی در شاهد و کمترین میزان آن در غلظت ۰/۰۴۸ میلی‌مولار (۳۰/۱۹) است (جدول ۳). در این مرحله غلظت‌های ۰/۰۷۶ و ۰/۱ میلی‌مولار به دلیل عدم جوانه‌زنی بذرهای جدول حذف گردید. همچنین کمترین و بیشترین تعداد کل سلول‌های در حال تقسیم در مراحل مختلف پروفاز، متافاز، آنافاز و تلوفاز به ترتیب مربوط به تیمار ۰/۰۴۸

۱۹/۲۷ و ۲۹/۸۳ درصد به دست آمد. همان طوری که در قسمت (الف) در شکل ۱ مشاهده می‌شود سلول‌های سوماتیکی در مرحله متافاز طبیعی بوده است. در قسمت (ب)، پدیده کشیده شدن کروموزوم و ایجاد پل کروموزومی تا حدودی مشهود است. همچنین در قسمت (ج) همین شکل توده‌ای شدن کروموزوم‌ها در مرحله متافاز و در قسمت (د) کروموزوم‌های سرگردان را نشان می‌دهد. در حقیقت بی‌نظمی‌های از نوع چسبندگی ممکن است به دلیل اثر گذاری ترکیب فنلی حاصل از عصاره متانولی سوروف بر اسیدهای نوکلئیک باشد که موجب دی پلی‌میزه شدن و انحلال بخشی از نوکلئوپروتئین‌ها، شکستن و تغییرات واحد کروماتیدی و در نتیجه بلوکه نمودن سنتز پروتئین‌ها باشد. سینگ^۷ (۲۰۰۳) اظهار نموده است که وجود کروموزوم‌های قطعه قطعه شده نشان‌دهنده شکستن کروموزوم‌ها و در نتیجه منجر به پل‌های کروموزومی در مرحله آنافاز و تلوفاژ است. این ناهنجاری‌های کروموزومی برای اثرات سمی عصاره‌های برگ تلخ (*Vernonia amygdalina*) و آتازی (*Gongronema latifolium*) (نوکانما^۸ و همکاران، ۲۰۰۹) و تاثیر فعالیت آنتی میتوزی ترکیب شیمیایی ایزوپروتون در جو (*Hordeum vulgare*) و پیاز (*Allium cepa*) گزارش شده است (بادر و الکینتن^۹، ۱۹۸۲). کای و میو^{۱۰} (۲۰۱۲) گزارش نمودند که غلظت‌های بالای عصاره برگ تانوره (*Datura stramonium*) از تقسیم سلولی در نوک ریشه، طولی شدن و توسعه ریشه اولیه و جانبی، طول و تراکم ریشه جانبی سویا جلوگیری نمود. همچنین شاخص انحراف کروموزومی را افزایش داد. فازی^{۱۱} و همکاران (۲۰۱۲) با مطالعه اثر سیتوژنتیکی آللوکمیkal‌های حاصل از غلظت‌های ۰/۲۵، ۰/۵۰ و ۱ درصد عصاره خردل وحشی (*Pisum sativum* L.) بر نخود (*Brassica nigra* L.) گزارش نمودند که عصاره خردل وحشی از تقسیم سلولی نخود جلوگیری نمود و درصد ناهنجاری‌های کروموزومی در هر دو تقسیم سلولی میتوز و میوز افزایش یافت.

آللوکمیkal‌های فنل‌ها به علاوه ترکیباتی نظیر ترپن‌ها، استروئیدها، لاکتون‌ها و اسیدهای چرب با زنجیره طولانی موجود در سوروف (دنگ‌خان^۱ و همکاران، ۲۰۱۸) بوده که رشته‌های دوک میتوزی را از فرم طبیعی خارج می‌نمایند و در نتیجه موجب بهم‌زدن استقرار ریزلوله‌های سانترومری و بدنبال آن هسته‌های دختری از یکدیگر جدا نمی‌گردند و به سبب پلی‌پلوئیدی سلول‌ها می‌میرند. تیرک^۲ و همکاران (۲۰۱۲) اظهار نمودند که آللوکمیkal اتیل استات استخراج شده از برگ‌های *Aglaia odorata Lour* از تقسیم میتوزی پیاز (*Allium cepa*) جلوگیری نمود و سبب ناهنجاری‌های میتوزی در ریشه پیاز به وسیله آسیب زدن به ساختمان کروماتین و دوک میتوزی در ریشه معرض این آللوکمیkal شد. عبدو رثوف و سیدیکو (۲۰۱۳) دلیل اصلی ایجاد بی‌نظمی‌های کروموزومی را اثر ممانعتی آللوکمیkal‌ها در تشکیل دوک در تقسیم سلولی و ساماندهی کروماتین‌ها بیان کردند. محمد و العشری (۲۰۱۲) نشان دادند که افزایش غلظت عصاره آبی خردل سیاه (*Brassica nigra*) از جوانه‌زنی نخود فرنگی ممانعت به عمل آورد. همچنین میزان تقسیم سلولی کاهش و درصد بی‌نظمی‌های کروموزومی در هر دو نوع تقسیم میوز و میتوز افزایش یافت.

اثر غلظت‌های مختلف ترکیب فنلی حاصل از عصاره متانولی علف‌هرز سوروف بر درصد و ایجاد انواع بی‌نظمی‌های کروموزومی همان طوری که در جدول ۴ و شکل ۱ مشاهده می‌شود بی‌نظمی‌های مشاهده شده در این مطالعه از نوع چسبندگی کروموزومی^۳، پدیده کروموزوم‌های سرگردان^۴، ایجاد پل‌های کروموزومی^۵ و توده‌ای شدن کروموزوم‌ها^۶ بود. بیشترین بی‌نظمی کروموزومی از نوع چسبندگی و کروموزوم‌های سرگردان مربوط به تیمار ۰/۰۴۸ میلی‌مولار ترکیب فنلی حاصل از عصاره متانولی به ترتیب ۳۹/۸۳ و ۳۲/۲۵ درصد بود. از طرفی بیشترین پل‌های کروموزومی و توده‌ای شدن کروموزوم‌ها در تیمار ۰/۰۲۴ میلی‌مولار به ترتیب،

¹ Dang Khanh.

² Teerarak

³ Stickness

⁴ Laggard

⁵ Bridges

⁶ Clumping

⁷ Singh

⁸ Nwakanma

⁹ Badr and Elkington

¹⁰ Cai and Mu

¹¹ Fawzia

پل‌های کروموزومی بود. در مجموع با توجه به مشاهده پدیده کروموزوم‌های سرگردان، ایجاد پل‌های کروموزومی و توده‌ای شدن کروموزوم‌ها در مریستم راسی ریشه‌چه برنج تحت تیمارهای مختلف ترکیب فنلی حاصل از عصاره متانولی سوروف می‌توان نتیجه‌گیری نمود که این ترکیب مانع رفتار طبیعی میتوزی سلول و آسیب به جوانه‌زنی بذرها شده است.

کمترین و بیشترین اثر بازدارندگی به ترتیب مربوط به غلظت ۰/۲۵ و ۱ درصد معادل ۷/۴۴ و ۷/۹۹ زمانی که نخود برای ۳ تا ۶ ماه انبار گردید. همچنین درصد ناهنجاری‌های کروموزومی در میتوز بعد از ۳ الی ۶ ماه انبارداری به ترتیب معادل ۱۴/۹۲ و ۱۲/۹۴ درصد در غلظت یک درصد نسبت به کنترل (۰/۹۸ و ۰/۴۸ درصد) بود. نوع بی‌نظمی مورد مشاهده در هر دو روش میتوز و میوز از نوع کروموزوم سرگردان، چسبندگی و



الف



ب



ج



د

شکل ۱. بی‌نظمی‌های کروموزومی متفاوت در سلول‌های نوک ریشه برنج. الف: سلول‌های سوماتیکی در مرحله متافاز طبیعی، ب: پل‌های کروموزومی در تلوفاز Bridge، ج: توده‌ای شدن کروموزوم‌ها در متافاز Clumping، د: کروموزوم سرگردان در تلوفاز Laggard.

Fig. 1. Various chromosomal abnormalities in cells of rice root tip. A: somatic cells in the natural metaphase stage. B: bridge chromosome in telophase C: Clumping chromosomes in telophase D: laggard chromosome in telophase

جدول ۳. اثر غلظت‌های مختلف ترکیب فنلی حاصل از عصاره متانولی علف‌سوز سوروف بر شاخص میتوزی و درصد بی‌نظمی‌های کروموزومی در مراحل مختلف تقسیم میتوز در مریستم رأسی ریشه برنج
Table 3. The effect of various concentrations of the phenolic composition obtained from the methanol extract of *E. crus-galli* on mitosis index and percentage of chromosomal abnormalities in different stages of mitosis division in apical meristem of rice root

غلظت‌ها (میلی‌مولار) Concentrations (mM)	تعداد کل سلول‌های مشاهده شده observed Total cells	تعداد کل سلول‌های تقسیم Total cells in dividing	شاخص میتوزی Mitosis index	درصد سلول‌های واقع در مرحله پروفاز Percentage of cells in prophase stage	درصد بی‌نظمی کروموزومی در مرحله پروفاز Percentage of chromosome abnormality in prophase stage	درصد سلول‌های واقع در مرحله متافاز Percentage of cells in metaphase stage	درصد بی‌نظمی کروموزومی در مرحله متافاز Percentage of chromosome abnormality in metaphase stage	درصد سلول‌های واقع در مراحل آنافاز و تلوفاز Anaphase and telophase stages	درصد بی‌نظمی در مراحل آنافاز و تلوفاز Percentage of chromosome abnormality in anaphase and telophase stages
0	950	492	51.78	40.11	0.0	27.14	0.0	32.75sta ge	0.0
0.024	1152	411	35.67	37.42	0.0	20.88	23.68	51.70	13.80
0.048	1275	385	30.19	41.65	0.0	21.75	28.85	36.60	16.95

جدول ۴. اثر غلظت‌های مختلف ترکیب فنلی حاصل از عصاره متانولی علف‌سوز سوروف بر درصد و ایجاد انواع بی‌نظمی‌های کروموزومی
Table 4. The effect of different concentrations of the phenolic composition obtained from the methanol extract of *E. crus-galli* on percentage and production of various kinds of chromosomal abnormalities

غلظت‌ها (میلی‌مولار) Concentrations (mM)	درصد بی‌نظمی‌های کروموزومی (Chromosomal abnormalities)
0.048	0
39.83	چسبندگی Stickiness
32.25	کروموزوم‌های سرگردان Laggard chromosomes
13.20	پل‌های کروموزومی Bridge chromosomes
14.74	توده Clumping chromosomes

نتیجه‌گیری

در مراحل اولیه جوانه‌زنی و رشد است. این امر نیاز به درکی عمیق‌تر از ساز و کارهای مولکولی این گونه اثرات دگرآسیب است که ظهور و بروز آن به‌صورت کاهش تقسیم میتوز و افزایش بی‌نظمی‌های کروموزومی است. در مجموع با توجه به زیست توده بالا و غالبیت علف‌هرز سوروف در مزارع برنج، جهت بهره‌برداری از ترکیبات دگرآسیب موجود در آن بر علف‌های هرز دیگر، نیازمند به تجزیه فیتوشیمی کامل ترکیبات ثانویه این علف‌هرز است.

با توجه به مشاهده تاثیر منفی ترکیب فنلی حاصل از عصاره متانولی سوروف بر میزان و کیفیت جوانه‌زنی و رفتار میتوزی برنج می‌توان این گونه نتیجه‌گیری نمود که در کشت مستقیم و یا نشایی برنج بایستی میزان بقایای حاصل از علف‌هرز سوروف را به هر گونه ممکن در زمین مورد کاشت این گیاه مد نظر قرار داد. همچنین پیشنهاد ما کاشت ارقام مقاوم برنج به بقایای ترکیبات حاوی مواد دگرآسیب علف‌هرز سوروف، به‌ویژه

منابع

- Abdul-Rauf, K.M. and Siddiqui, M.B. 2012. Allelopathic effect of aqueous extracts of different parts of *Tinospora cordifolia* (Willd.) Miers on some weed plants. *Journal of Agricultural Extension and Rural Development*, 4(6): 115-119. <https://doi.org/10.5897/JAERD11.069>
- Abdul Rauf, K.M. and Siddiqui, M.B. 2013. Allelotoxic effect of parthenin on cytomorphology of broad bean (*Vicia faba* L.). *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences*, 12: 143-146. <https://doi.org/10.1016/j.jssas.2012.11.001>
- Azadbakht, A., Amraie, R., Mirzapour, S.R. and Nasrollahi, H. 2012. Effect of weed competition on growth characteristics of sunflower at different levels of nitrogen fertilizer. *Annals of Biological Research*, 3(11): 5162-5168.
- Badr, A. and Elkington, T.T. 1982. Antimitotic and chromo toxic activities of Isoproturon in *Allium cepa* and *Hordeum vulgare*. *Environmental and Experimental Botany*, 22(3): 265-270. [https://doi.org/10.1016/0098-8472\(82\)90017-X](https://doi.org/10.1016/0098-8472(82)90017-X)
- Bakhshi Khaniki, Gh.R. 2010. Plant cytogenetic. Payam Noor Publisher. 402p. [In Persian]
- Caceres, A. 2000. Calidad de la material prima para la elaboracion de productos fitofarma ceuticas. Primer Congreso Internacional FITO 2000 "Por la investigacion, conservacion y diffusion del conocimiento de las plantas medicinal". 27-30 de septiembre, 2000, Lima, Peru.
- Cai, S.L. and Mu, X.Q. 2012. Allelopathic potential of aqueous leaf extracts of *Datura stramonium* L. on seed germination, seedling growth and root anatomy of *Glycine max* (L.) Merrill. *Allelopathy Journal*, 30: 235-245.
- Cruz-Ortega, R., Lara-Núñez, A. and Anaya, A.L. 2007. Allelochemical stress can trigger oxidative damage in receptor plants. *Plant Signaling and Behavior*, 2(4): 269-270. <https://doi.org/10.4161/psb.2.4.3895>
- Dang Khanh, T., Huu Trung, K. and Hoang Anh, L.A. 2018. Allelopathy of Barnyardgrass (*Echinochloa crus-galli*) Weed: an Allelopathic Interaction with Rice (*Oryza sativa*). *Vietnam Journal of Agricultural Sciences*, 1(1): 97-116. <https://doi.org/10.31817/vjas.2018.1.1.10>
- Davarynejad, G.H., Taghizadeh, S.F. and Asili, J. 2017. Effect of different solvents on total phenolic contents and antioxidant activity of *Zizyphus jujube* Miller fruits. *Journal of Horticulture Science*, 21(1): 158-166.
- Einhellig, F.A. 2002. The physiology of allelochemical action: clues and views. In: Reigosa, M.J., Pedrol, N. (eds.), *Allelopathy, from Molecules to Ecosystems*. Science Publishers, Enfield, New Hampshire.

- El-Shora, H.M. and Abd El- Gawad, A.M. 2015. Physiological and biochemical responses of *Cucurbita pepo* L. mediated by *Portulaca oleracea* L. allelopathy. *Fresenius Environmental Bulletin*, 24: 386-393.
- Erdman, J.W., Balentine, D., Arab, L., Beecher, G., Dwyer, J.T., Folts, J., Harnly, J., Hollman, P., Keen, C.L., Mazza, G., Messina, M., Scalbert, A., Vita, J., Williamson, G. and Burrowes, J. 2007. Flavonoids and heart health: Proceedings of the ILSI North America flavonoids workshop. *Nutrition*, 137: 718-737. <https://doi.org/10.1093/jn/137.3.718S>
- Erfani, E.R. 2002. Final report collection and knowledge weeds in rice field and current methods control in Mazandaran. Rice Research Institute of Mazandaran. [In Persian].
- Fawzia, Mohamed, I. and Zeinab El-Ashry, M. 2012. Cytogenetic effect of allelochemicals *Brassica nigra* L. extracts on *Pisum sativum* L. *World Applied Sciences Journal*, 20(3): 344-353.
- Gabara, B., Kalwinek, J., KozirÓg, Z., Zakowska, Z. and Brycki, B. 2006. Influence of N, N-bis (3-aminopropyl) dodecylamine on the ultra-structure of nuclei in *Aspergillus niger* mycelium and on cell proliferation and mitotic disturbances in *Allium cepa* L. root meristem. *Acta Biologica Cracoviensia, Series Botanica*, 48: 45-52.
- Glin'ska, S., Bartczak, M., Oleksiak, S., Wolska, A., Gabara, B., Posmyk, M. and Janas, K. 2007. Effects of anthocyanin-rich extract from red cabbage leaves on meristematic cells of *Allium cepa* L. roots treated with heavy metals. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 68(3): 343-350. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2007.02.004>
- Haji Mehdipour, H., Khanavi, M., Shekarchi, M., Abedi, Z. and Pirali Hamedani, M. 2010. The determination of best extracting method of phenolic compounds in *Echinacea angustifolia*. *Quarterly Journal of Medicinal Plants*, 8(4): 32: 145-152. [In Persian with English Summary].
- Hardgree, S.P. and Van Vactor, S.S. 2000. Germination and emergence of primed grass seeds under field and simulated-field temperature regimes. *Annals of Botany*, 85: 379-390. <https://doi.org/10.1006/anbo.1999.1076>
- Hasanuzzaman, M., Ali, M. H. Alam, M.M., Akther, M. and Fakhrul Alam, K. 2009. Evaluation of pre-emergence herbicide and hand weeding on the weed control efficiency and performance of transplanted Aus rice. *American-Eurasian Journal of Agronomy*, 2(3): 138-143.
- Heidarzade, A., Esmaili, M. and Pirdashti, H. 2012. Common allelochemicals in root exudates of barnyardgrass (*Echinochloa crusgalli* L.) and inhibitory potential against rice (*Oryza sativa*) cultivars. *International Research Journal of Applied Basic Science*, 3(1): 11-17.
- Kadiolu, I. and Yanar, Y. 2004. Alelopathic effect of plant extracts against seed germination of some weeds. *Asian Journal of Plant Sciences*, 3(4): 472-475. <https://doi.org/10.3923/ajps.2004.472.475>
- Kazemi, M., Roshandel, P. and Rafiei Al- Hosseini, M. 2017. Evaluation of allelopathic potential of six medicinal plants on some physiological and biochemical characteristics of *Beta vulgaris* and its two important weeds. *Journal of Plant Production and Function*, 6: 65-80.
- Khorasani Nezhad, S., Galeshi, A.K. and Fakhr Tabatabaie, S.M. 2009. Study of allelopathic potential of various organ extract of cucumber on seedling growth indices of cucumber, tomato, pepper and basil. *Journal of Iranian Horticultural Sciences*, 40(1): 55-60. [In Persian with English Summary].
- Kohli, R.K., Singh, H.P., and Batish, D.R. 2001. Allelopathy in agroecosystems. Food Products Press, USA, 447 p.
- Maguire, J.D. 1962. Speed of germination- aid selection and evaluation for seedling emergence and vigor. *Crop Science*, 2: 176-177. <https://doi.org/10.2135/cropsci1962.0011183X000200020033x>

- Malick, C.P. and Singh, M.B. 1980. In plant enzymology and histo enzymology. Kalyani Publishers, New Dehli.
- Mighani, F. 2003. Allelopathy. Partov-e- Vagheeh Publications, 256p. [In Persian].
- Mishra, A. 2015. Allelopathic properties of *Lantana camara*. Lnt. International Research Journal of Basic and Clinical Studies, 3: 13-28.
- Mohamed, F.I. and El-Ashery, Z.M. 2012. Cytogenetic effect of allelochemicals of *Brassica nigra* extract on *Pisum sativum*. World Applied Sciences Journal, 20(3): 344-353.
- Mohammadzadeh, M., Peighambari, S.A., Nabipoor, A.R. and Norouzi, M. 2009. Evaluation of rice genotypes response to salinity stress at seedling stage in hydroponic culture. Journal of Crop Breeding, 1(2): 85-95. [In Persian with English Summary].
- Monica, F., Josekna, A., Sillero, C. and Rubiales, D. 2007. Intercropping with cereals reduces infection by *Orobanche crenata* in legumes. Crop Protection, 26(8): 166-1672. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2006.10.012>
- Nwakanma, N.M.C., Odeigah, P.G.C. and Oboh, B.O. 2009. Genotoxic effects of *Gongronema latifolium* and *Vernonia amygdalina* using the Allium test. In: Book of Proceedings, 4th UNILAG Conference and Fair, Nigeria, 21-22 October, 2009, pp: 81-90.
- Oksman-Caldentey, K.M. and Inzé, D. 2004. Plant cell factories in the post-genomic era: new ways to produce designer secondary metabolites. Trends in Plant Science, 9(9): 433-440. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2004.07.006>
- Omidbeigi, R. 2009. Production and processing of medicinal plants. Astan Ghods Razavi publisher. 47-182p. [In Persian].
- Pandey, S. and Velasco, L. 2005. Trends in crop establishment methods in Asia and research issues. In: Rice is Life Scientific Perspectives for the 21st Century. Toriyama, K., Heong, K.L., Hardy, B. (eds.). International Rice Research Institute and Tsukuba, Japan International Research Center for Agricultural Sciences, Los Baños, Philippines, pp: 178-181.
- Regosa, M., and Pedrol, N. 2002. Allelopathy from molecules to ecosystems. Science publishers Gnc. NH. USA. P 12- 195.
- Rho, B.J. and Kil, B.S. 1986. Influence of phytotoxin *Pinus rigida* on the selected plants. Journal of Natural Science, Wonkwang University, 5: 19-27.
- Rodenburg, J. and Demont, M. 2009. Potential of herbicide-resistant rice technologies for sub-saharan Africa. Journal of Agrobiotechnology Management and Economics, 12(3-4): 313-325.
- Sathis Kumar, D., Banji, D., Harani, A., Tirupathi Rao, A., Nageswar Rao, S., Pavan Kumar, CH. and Santhi Krupa, D. 2013. Screening of polyphenolic compounds in *Echinochloa crusgalli* Roxb extracts by various analytical techniques. Asian Journal of Chemistry, 25(17): 9848-9852. <https://doi.org/10.14233/ajchem.2013.15505>
- Setia, N., Batish, D.R., Singh, H.P. and Kohli, R.K. 2007. Phytotoxicity of volatile oil from *Eucalyptus citriodora* against some weedy species. Journal of Environmental Biology, 28: 63-66.
- Sheidai, M., Habibi, M., Azizain, D. and Khatamsaz, M. 2009. Cytology and palynology of the *Clematis L.* species (Ranunculaceae) in Iran. Acta Botanica Croatica, 68(1): 67-77.
- Singh, R.J. 2003. Plant cytogenetic. CRC Press, image dueing cell cycle in *Allium cepa* and *Vicia boca* Raton, pp: 463.
- Soltani, A. and Torabi, B. 2014. Design and analysis of agricultural experiments (with SAS programs). Jihad Daneshgahi Mashhad Press, Mashhad, Iran. 431p. [In Persian].

-
- Teerarak, M., Charoenying, P. and Laosinwattana C. 2012. Physiological and cellular mechanisms of natural herbicide resource from *Aglaia odorata* Lour. on bioassay plants. *Acta Physiologiae Plantarum*, 34(4): 1277-1285. <https://doi.org/10.1007/s11738-011-0923-5>
- Teerarak, M., Laosinwattana, C. and Charoenying, P. 2010. Evaluation of allelopathic, decomposition and cytogenetic activities of *Jasminum officinale* L. f. var. *grandiflorum* (L.) Kob. on bioassay plants. *Bioresource Technology*, 101: 5677-5684. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.02.038>
- Yang, C.M., Lee, C.N. and Chou, C.H. 2002. Effects of three allelopathic phenolics on chlorophyll accumulation of rice (*Oryza sativa*) seedlings: I. Inhibition of supply orientation. *Botanical Bulletin of Academia Sinica*, 43: 299-304.

Research Article

Studying the Hetrotoxicity Potential of the Phenolic Composition Obtained from the Methanolic Extract of *Echinochola crus-galli* Weed on Germination Traits and Cytogenetic Behavior of Rice

Ebrahim Gholamalipour Alamdari^{1,*}, Amir Ghorbani², Hossein Sabouri³, Meisam Habibi⁴

Extended abstract

Introduction: Without a doubt, plant hetrotoxicity is one of the important factors in determining the distribution and abundance of some species in plant communities. Thus, the purpose of this experiment was to evaluate the effect of phenolic composition obtained from the methanol extract of *Echinochola crus-galli* on germination traits and cytogenetic behavior of rice.

Materials and methods: This experiment was done to assess hetrotoxic potential of various concentrations (0, 0.024, 0.048, 0.076 and 0.1 mM) of the phenolic composition obtained from the methanol extract of whole-organ of *E. crus-galli* on germination traits of rice as well as mitosis division of meristematic cells of radicle in a completely randomized design. To extract the phenolic composition, warm extraction method using a methanol solvent was used. For studying mitosis division, first rice seeds were germinated. Then, each of the steps such as fixation, hydrolysis, staining, squashing and microscopic studies were done on the end of the radicle. Mitosis indices and percentage of mitosis inhibition were calculated and also percentage of each of chromosomal abnormalities at four stages of prophase, metaphase, anaphase and telophase as compared to total cells was calculated.

Results: The lowest percentage and rate of germination and relative germination were found in two concentrations of the 0.076 and 0.1 mM of phenolic composition of *E. crus-galli*, so that no germination was observed in these treatments. In this study, mitosis division was normal in control samples, so that the rice plant included 12 chromosomes in the metaphase stage. Also the chromosomes were normal in the telophase stage and chromosomal abnormalities were not observed in meristem cells of radicle tip of the control. The lowest value of mitosis indices and the number of dividing cells were related to the concentration of 0.048 mM with 30.19 and 385 cells, respectively. In the present study, chromosomal abnormalities in the stages of metaphase, anaphase and telophase were increased with increasing concentration of phenolic composition, and were 28.85 and 16.95% in 0.048 mM concentration of phenolic composition, respectively. The most chromosomal abnormalities were of sticky and laggard type, which were related to the concentration of 0.048 mM of phenolic composition with 39.83 and 32.25%, respectively. The highest number of chromosomal bridges and clumping were obtained in 0.024 mM of phenolic composition with about 19.27 and 29.83%, respectively.

Conclusion: In this study, phenolic composition obtained from the methanol extract of *E. crus-galli* had a significant inhibitory effect on germination traits and mitosis division in root tip cells of rice. Thus, the amount of *E. crus-galli* residues in the field should be considered in direct and indirect cultivation of rice.

Keywords: Bridge chromosomes, Chromosomal abnormalities Phenolic composition, Relative germination percentage

Highlights:

- 1-Difference in impact of the phenolic composition obtained from the methanol extract of *Echinochola crus-galli* on germination and reduced cytogenetic behavior of rice is related to their threshold concentration.
- 2- It is advised to cultivate varieties of rice resistant to the remnants of harmful compounds of *E. crus-galli* as direct cultivation or under nursery condition.

¹ Assistance Professor of Plant Production Department, College of Agriculture and Natural Resources, Gonbad Kavous University, Gonbad Kavous, Iran

² Graduated student of Identification and Weeds Control branch, College of Agriculture and Natural Resources, Gonbad Kavous University, Iran

³ Associate Professor of Plant Production Department, College of Agriculture and Natural Resources, Gonbad Kavous University, Iran

⁴ Instructor of Biology Department, College of Basic Science of Gonbad Kavous University, Iran

* Corresponding author, E-mail: eg.alamdari@gonbad.ac.ir

