

اثر سطوح مختلف شوری بر برخی آنتی اکسیدان های غیر آنزیمی سه رقم بادام زمینی (*Arachis hypogaea* L.)

منصور افشار محمدیان^{۱*}، ساره ابراهیمی نوکنده^۲ و معصومه جمال امید^۳

(۱) دانشیار گروه زیست شناسی، دانشگاه گیلان، رشت، ایران.

(۲) دانش آموخته کارشناسی ارشد گروه فیزیولوژی گیاهی، دانشگاه گیلان، رشت، ایران.

(۳) استادیار گروه زیست شناسی، دانشگاه پیام نور، رودسر، ایران.

* نویسنده مسئول: Afshar@guilan.ac.ir

تاریخ پذیرش: ۹۲/۰۹/۱۱

تاریخ دریافت: ۹۲/۰۵/۲۰

چکیده

بادام زمینی گیاهی متعلق به خانواده فاباسه است و از بقولات یکساله است که به دلیل کیفیت بالای روغن و پروتئین دانه، در ۱۰۸ کشور جهان از جمله ایران کشت می شود. با توجه به گسترش روز افزون اراضی شور در ایران و کشت بادام زمینی در مناطق ساحلی گیلان، گیاه بادام زمینی تحت تنش شوری قرار می گیرد. این تحقیق به منظور بررسی اثر سطوح مختلف شوری (صفر، ۵۰، ۱۰۰ و ۱۵۰ میلی مولار کلرید سدیم) بر آنتی اکسیدان های غیر آنزیمی شامل فنل، فلاونول، آنتوسیانین و ظرفیت خنثی کننده رادیکال آزاد (DPPH) سه رقم بادام زمینی (محلی گیلان، ICGV96177 و ICGV03060) در بخش تحقیقاتی دانشگاه گیلان، به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار انجام شد. نتایج نشان داد که افزایش تنش شوری، در هر سه رقم، سبب افزایش معنی دار میزان آنتی اکسیدان های غیر آنزیمی برگ شد. بیشترین افزایش در مقدار فنل کل و DPPH در غلظت ۱۰۰ میلی مولار شوری و در رقم محلی گیلان مشاهده شد. بیشترین مقدار فلاونول و آنتوسیانین در رقم محلی گیلان دیده شد و بیشترین مقدار فلاونول در رقم ICGV96177 در تیمار ۱۵۰ میلی مولار بود. نتایج این تحقیق نشان داد که در مجموع، از نظر دفاع آنتی اکسیدانی، رقم محلی گیلان نسبت به دو رقم بررسی شده، متحمل تر به شوری بود.

واژه های کلیدی: تنش شوری، بادام زمینی، آنتوسیانین، فنل، فلاونول.

مقدمه

توزیع و پراکندگی اراضی شور در سطح جهان یکنواخت نیست، به طوری که قاره استرالیا با حدود ۳۶۰ میلیون هکتار و قاره آسیا با حدود ۳۱۰ میلیون هکتار اراضی شور، بیشترین سطح اراضی شور را دارا می‌باشند. در آسیا بعد از شوروی سابق، چین، هندوستان و پاکستان، بیشترین سطح خاک‌های شور متعلق به ایران است (ICARDA, 2002). وسعت اراضی شور ایران بر اساس آمار منابع مختلف بین ۲۳ الی ۳۴ میلیون هکتار برآورد شده است. به طوری که آمار FAO در سال ۲۰۱۰ حاکی از این است که ۲۵/۵ میلیون هکتار از اراضی ایران شور و ۸/۵ میلیون هکتار بسیار شور هستند (فرهودی، ۱۳۹۲). شوری از مهم‌ترین عوامل محیطی است که سبب کاهش رشد و عملکرد گیاه می‌شود و بررسی اثر زیان‌آور شوری بر رشد و عملکرد گیاهان زراعی حائز اهمیت زیادی است (Yilmaz, 2007). بادام زمینی گیاهی یک ساله و از تیره فاباسه است که بعد از سویا، یکی از مهم‌ترین و اقتصادی‌ترین دانه‌های روغنی در مناطق گرمسیری و نیمه‌گرمسیری است و بیش‌تر به خاطر میزان روغن (۴۳-۵۵ درصد)، پروتئین (۲۵-۲۸ درصد) و کربوهیدرات کشت می‌شود. ویتامین‌های بسیاری، از جمله ویتامین A، B، ریبوفلاوین و هم‌چنین فولات، منیزیم، فسفر، منگنز و ترکیبات آنتی‌اکسیدانی مثل پلی‌فنل‌ها، ویتامین E و ویتامین D در دانه بادام زمینی وجود دارد (سیدشریفی، ۱۳۸۶، Karra et al., 2013). آسیا با تولید ۲۵/۵ میلیون تن بادام زمینی، حدود ۷۰ درصد تولید این محصول را به خود اختصاص داده است (Pandy et al., 2003). کشت بادام زمینی در ایران، در استان گیلان بیش‌تر بوده و به‌طور محدودی نیز در اطراف گرگان، دزفول و جیرفت کاشته می‌شود (صفرزاده ویشکائی، ۱۳۷۸). هم‌اکنون سطح زیر کشت بادام زمینی در استان گیلان، حدود ۲۵۸۳ هکتار بوده و میزان تولید نیز ۸۶۹۱/۸ تن می‌باشد. با توجه به اینکه کشت این محصول در استان گیلان به‌طور وسیع انجام می‌شود، در برخی مناطق ساحلی استان، این گیاه تحت تنش شوری قرار می‌گیرد. بنابراین برای مقابله با تنش شوری، بررسی تغییرات خواص آنتی‌اکسیدانی جهت شناسایی رقم متحمل‌تر ضروری به نظر می‌رسد. شوری زیاد باعث برهم خوردن تعادل یون‌ها در سلول‌های گیاهی، ایجاد تنش اکسیداتیو و کاهش رشد گیاه می‌شود. تنش اکسیداتیو، فرآیندی است که در طی آن، گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) با لیپید، پروتئین، اسید نوکلئیک و آنزیم‌های سلول واکنش داده، مسیر مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی را به راه انداخته و در نهایت باعث مرگ سلول می‌شوند (Shah et al., 2001). گیاه از طریق برخی تغییرات یا تعدیل‌ها در فرآیندهای سلولی و ساختار مورفولوژیکی و آناتومیکی، به منظور کاهش سمیت یون و نگه داشتن تعادل میان تولید و حذف ROS، می‌تواند به تنش شوری پاسخ دهد (Baryl et al., 2000). بافت‌های گیاهان دارای آنزیم‌های حذف‌کننده ROS (سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز، پراکسیداز، آسکورت پراکسیداز و گلوتاتیون پراکسیداز) و شبکه‌ای از آنتی‌اکسیدان‌ها با وزن مولکولی کم (آسکورات، گلوتاتیون، ترکیب‌های فنلی، توکوفرول‌ها،

کاروتنوئیدها و غیره) هستند که به ترتیب سیستم‌های دفاعی آنتی‌اکسیدانی آنزیمی و غیرآنزیمی گیاه را تشکیل می‌دهند (Kuk *et al.*, 2003). در واقع این آنتی‌اکسیدان‌ها با حذف رادیکال‌های آزاد یا ممانعت از تشکیل آن‌ها، از سلول‌ها در برابر آسیب اکسیداتیو محافظت می‌کنند (Joyce *et al.*, 2005). ترکیبات فنلی به‌طور وسیعی در گیاهان وجود دارند و شامل فنل‌های ساده، فنل‌های اسیدی، چالکون‌ها، فلاونوئیدها، آنتوسیانین‌ها و غیره می‌باشند (Harborne and Simmonds, 1964). صراحی‌نوبر و همکاران (۱۳۸۹) با بررسی واکنش چهار رقم شنبلیله به تنش شوری، گزارش کردند که افزایش تنش شوری، سبب افزایش محتوای ترکیبات فنلی برگ شد و در ارقام متحمل، این افزایش بیش‌تر بود. Valifard و همکاران (۲۰۱۴) با بررسی تنش شوری روی محتوای فنلی گیاه مریم‌گلی بیان نمودند که محتوای فنلی با افزایش تنش شوری، پس از طی کردن روند افزایشی در بالاترین غلظت شوری کاهش یافت. آن‌ها علت کاهش ترکیبات فنلی را چنین عنوان کردند که تنش‌های شدید شوری می‌تواند اثر منفی روی ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی گیاهان داشته و باعث کاهش ترکیبات فنلی و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی شود (Sidsel Fiskaa *et al.*, 2009). فعالیت آنتی‌اکسیدانی ترکیبات فنلی عمده‌تأ ناشی از ویژگی اکسیداسیون - احیای آن‌هاست که می‌تواند نقش مهمی در جذب و خنثی کردن رادیکال‌های آزاد داشته باشد (Joyce *et al.*, 2005). فعالیت آنتی‌اکسیدانی یک ترکیب می‌تواند از طریق ممانعت از تشکیل رادیکال آزاد یا از طریق حذف آن‌ها، در یک سیستم تولیدکننده رادیکال تعیین شود. قربانلی و همکاران (۱۳۹۰) گزارش کردند که با افزایش شوری، ظرفیت خنثی‌کنندگی رادیکال DPPH در برگ گیاه سنجد افزایش پیدا کرد. Sidsel Fiskaa و همکاران (۲۰۰۹) نشان دادند که افزایش تنش، درصد احیای رادیکال DPPH را در کلم افزایش داد و گزارش کردند که این افزایش به علت بیش‌تر شدن رادیکال‌های آزاد و قدرت احیایی آنتی‌اکسیدان‌ها است. البته کاهش ظرفیت خنثی‌کنندگی رادیکال آزاد در شرایط تنش شدید هم گزارش شده است (کافی و همکاران، ۱۳۸۹). در حال حاضر استفاده از ارقام متحمل به شوری یکی از مهم‌ترین روش‌های مؤثر در بهره‌برداری و افزایش عملکرد در زمین‌های شور و کم شور نواحی خشک و نیمه‌خشک جهان محسوب می‌شود (Ekiz and Yilmaz, 2003). هدف از انجام این آزمایش بررسی اثر تنش شوری بر محتوای آنتی‌اکسیدان‌های غیرآنزیمی شامل فنل کل، فلاونول و آنتوسیانین برگ ارقام بادام زمینی و هم‌چنین بررسی تغییرات ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل برگ و تعیین رقم متحمل‌تر از نظر دفاع آنتی‌اکسیدانی، بین سه رقم بادام زمینی در شرایط تنش شوری می‌باشد.

مواد و روش‌ها

این مطالعه به‌صورت یک آزمایش فاکتوریل بر پایه طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار در دانشکده علوم دانشگاه گیلان طراحی و اجرا شد. تیمارهای آزمایش شامل سه رقم بادام زمینی شامل محلی گیلان، ICGV96177 و ICGV03060 و

چهار سطح شوری شامل غلظت‌های صفر و ۵۰ و ۱۰۰ و ۱۵۰ میلی‌مولار نمک NaCl بود. کاشت بذرها (تعداد پنج بذر جوانه‌زده، در هر گلدان) در گلدان‌های پلاستیکی حاوی سه کیلوگرم خاک برداشت شده از مزارع بادام زمینی شهرستان آستانه اشرفیه، پس از ضدعفونی انجام شد. دمای اتاق آزمایش ۲۸ درجه سانتی‌گراد و دمای خاک درون گلدان‌ها ۲۵ درجه سانتی‌گراد و دوره نوری به‌صورت ۱۷ ساعت روشنایی (۷۰۰۰ لوکس) و هفت ساعت تاریکی در نظر گرفته شد (Hajar *et al.*, 1993). روشنایی ترکیبی از لامپ فلورسنت و مهتابی بودند. آبیاری گلدان‌ها به‌صورت هفته‌ای سه مرتبه انجام شد و اعمال شوری چهار هفته پس از کشت، با غلظت‌های صفر، ۵۰، ۱۰۰ و ۱۵۰ میلی‌مولار نمک به‌صورت هفته‌ای دو مرتبه با آب شور و هر ده روز یک‌بار با آب مقطر انجام شد (Hajar *et al.*, 1993; Srivastava *et al.*, 2005). کوددهی شامل اوره، سولفات پتاسیم و سوپرفسفات در روز ۲۱ و ۴۲ پس از کشت بذور، به‌صورت پخش کردن کود در سطح خاک انجام شد (Salwa *et al.*, 2010). در آخر هفته دوازدهم بعد از کاشت، برگ‌های تمامی بوته‌های هر گلدان برداشت و به‌صورت جداگانه بسته‌بندی و جهت بررسی فعالیت آنتی اکسیدان‌های غیرآنزیمی، نیمی از برگ‌ها در آن ۷۰ درجه سانتی‌گراد خشک و در دسیکاتور نگهداری شدند و نیم دیگر به مخزن حاوی نیتروژن مایع انتقال داده شدند و پس از بسته‌بندی و نام‌گذاری، در فریزر ۷۰ درجه، نگهداری شدند (زادوریان و همکاران، ۱۳۹۰). در این پژوهش، همه حلال‌ها و مواد شیمیایی مورد نیاز از شرکت‌های Merck و Sigma (آلمان) تهیه شدند.

برای استخراج عصاره برگ‌ها از روش Bakhshi و Arakaw (۲۰۰۶) استفاده شد. به این ترتیب که به ۰/۵ گرم از پودر نمونه خشک شده، مقدار سه میلی‌لیتر حلال استخراج شامل متانول و استیک اسید (نسبت ۸۵ به ۱۵) اضافه و به مدت ۲۴ ساعت در یخچال نگهداری شد. پس از آن، لوله‌های آزمایش حاوی نمونه، در سانتریفیوژ (مدل 1-14، شرکت Sigma، آلمان) قرار گرفته، به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شدند. محلول رو شناور که حاوی عصاره گیاه بود، برای اندازه‌گیری میزان فنل، فلاونول و ظرفیت آنتی اکسیدانی کل با دقت توسط سمپلر جدا و در داخل میکروتیوپ‌هایی ریخته شد.

برای سنجش فنل کل، معرف فولیت سیو کالتئو و استاندارد گالیک اسید استفاده شد و نتایج به‌صورت میلی‌گرم گالیک اسید در هر گرم وزن خشک بیان شد. به این ترتیب که به ۱۲۵ میکرولیتر از عصاره، ۳۷۵ میکرولیتر آب مقطر، ۲/۵ میلی‌لیتر فولین ۱۰ درصد و پس از شش دقیقه، دو میلی‌لیتر محلول کربنات سدیم ۷/۵ درصد اضافه و پس از ۱/۵ ساعت قرار گرفتن در تاریکی جذب نمونه‌ها در طول موج ۷۶۳ نانومتر توسط اسپکتروفتومتر UV-Visible مدل Ultrospec، شرکت CamSpec چین خوانده شد (Slinkard and Singleton, 1977).

میزان فلاونول کل بر اساس رنگ‌سنجی کلریدآلومینیم و بر حسب روتین اندازه‌گیری شد. برای این منظور، به یک میلی‌لیتر از عصاره، دو میلی‌لیتر کلریدآلومینیم دو درصد، شش میلی‌لیتر استات سدیم پنج درصد و یک میلی‌لیتر حلال استخراج اضافه شد. سپس میزان جذب نمونه‌ها پس از ۲/۵ ساعت قرار گرفتن در دمای اتاق در طول موج ۴۴۵ نانومتر خوانده شد. برای رسم نمودار استاندارد از روتین استفاده شد (Miliauskas *et al.*, 2004).

برای سنجش آنتوسیانین، ۰/۵ گرم از برگ منجمد شده گیاه بادام زمینی، در سه میلی‌لیتر متانول اسیدی (شامل متانول و کلریدریک‌اسید به نسبت ۹۹ به یک)، خوب ساییده سپس عصاره حاصل به مدت ۱۵ دقیقه در ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. محلول رویی پس از صاف شدن به مدت یک شب در تاریکی قرار داده شد و جذب آن در طول موج ۵۵۰ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر خوانده شد. برای محاسبه غلظت آنتوسیانین از ضریب خاموشی $33000 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$ استفاده شد (Masukasu *et al.*, 2003).

فعالیت آنتی‌اکسیدانی با استفاده از سنجش پاک‌سازی رادیکال آزاد (DPPH) (۲ و ۲- دی فنیل پیکریل هیدرازیل) ارزیابی شد (Kontogiorgis and Hadjipavlou-Litina, 2005). برای این منظور، ۵۰ میکرولیتر از عصاره داخل میکروتیوپ ریخته شد. سپس ۹۵۰ میکرولیتر محلول ۰/۱ نرمال DPPH به آن اضافه شد. شاهد و بلانک نیز به ترتیب با یک میلی‌لیتر محلول ۰/۱ نرمال (DPPH) در متانول و یک میلی‌لیتر حلال استخراج آماده شد. پس از گذشت ۳۰ دقیقه در شرایط تاریکی و دمای اتاق، جذب شاهد و نمونه‌ها در طول موج ۵۱۷ نانومتر خوانده شد. با قرار دادن جذب مربوط به شاهد و نمونه در رابطه ۱، درصد جمع‌آوری رادیکال آزاد به دست آمد:

$$\%DPPH_{sc} = (A_{cont} - A_{samp}) / A_{cont} \times 100 \quad \text{رابطه ۱:}$$

$\%DPPH_{sc}$ = درصد بازدارندگی، A_{cont} = میزان جذب DPPH و A_{samp} = میزان جذب (نمونه + DPPH).

برای تحلیل داده‌ها از نرم‌افزار SPSS و برای مقایسه میانگین‌ها از آزمون دانکن در سطح احتمال پنج درصد و برای رسم نمودارها و جدول از نرم‌افزار Excel استفاده شد.

نتایج و بحث

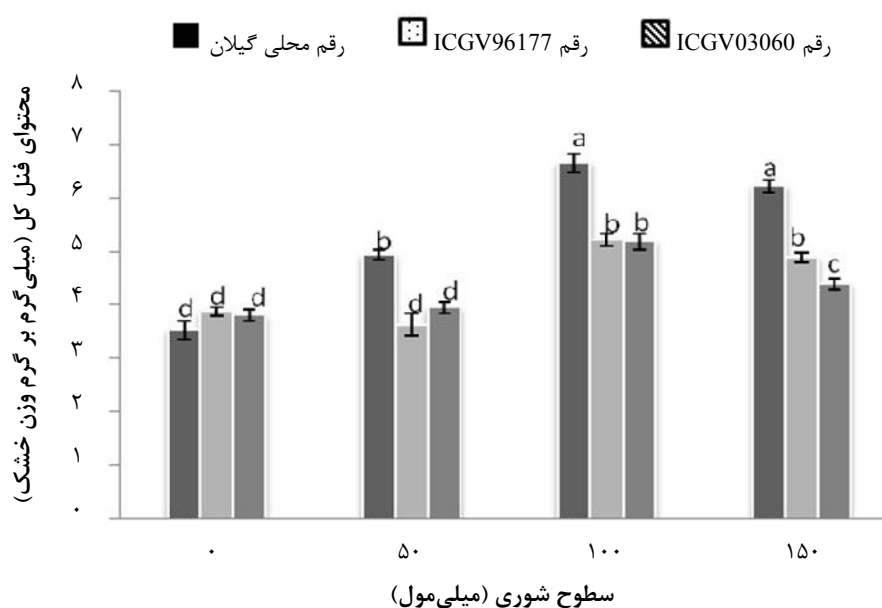
نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده‌ها، از بررسی غلظت‌های صفر، ۵۰، ۱۰۰ و ۱۵۰ میلی‌مولار شوری روی سه رقم بادام زمینی محلی گیلان، ICGV96177 و ICGV03060 در جدول ۱ نشان داد که اثر رقم، شوری و برهمکنش رقم و شوری بر میزان فنل تام، فلاونول، آنتوسیانین و درصد فعالیت آنتی‌اکسیدانی در سطح احتمال پنج درصد معنی‌دار بود. به‌طور دقیق‌تر با توجه به شکل ۱، بررسی عصاره‌های متانولی سه رقم بادام زمینی محلی گیلان، ICGV96177 و ICGV03060 برای اندازه‌گیری محتوای فنل کل، در تیمارهای صفر، ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰ میلی‌مولار شوری نشان داد که

اعمال تنش شوری سبب افزایش معنی‌دار (در سطح احتمال پنج درصد) میزان فنل کل برگ‌های هر سه رقم بادام زمینی شد. به‌طوری‌که بیش‌ترین افزایش در میزان فنل کل در عصاره برگ رقم محلی گیلان و کم‌ترین میزان در رقم ICGV03060 دیده شد که در سطح احتمال پنج درصد معنی‌دار بود. در رقم ICGV96177 تا تیمار ۵۰ میلی‌مولار، محتوای فنلی تقریباً ثابت بود و بعد از آن، روند افزایشی داشت. محتوای فنل کل در رقم ICGV03060 در شوری ۵۰ میلی‌مولار ثابت بود و در شوری ۱۰۰ میلی‌مولار افزایش و در شوری ۱۵۰ میلی‌مولار از مقدار آن کاسته شد (شکل ۱).

جدول ۱: تجزیه واریانس صفات مورد بررسی

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات			درصد فعالیت آنتی‌اکسیدانی
		فنل	فلاونول	آنتوسیانین	
شوری	۳	۷/۱۴۸*	۰/۴۱*	۳۸۷۲۵۳/۴۰*	۱۳۳۹/۰۸۱*
رقم	۲	۳/۸۶۴*	۰/۰۶۷*	۴۳۰۷۰۵/۸۹*	۱۴۲/۵۰۶*
رقم × شوری	۶	۰/۸۴۵*	۰/۰۰۸*	۷۱۰۱۸/۰۱۷*	۵۵/۱۰۷*
خطا	۲۴	۰/۰۸۳	۰/۰۰۲	۶۹۰۲/۱۰	۵/۰۰

ns، * و ** به ترتیب بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار و اختلاف معنی‌دار در سطوح احتمال پنج و یک درصد می‌باشند.



شکل ۱: تغییرات محتوای فنل کل در تیمارهای مختلف شوری در عصاره برگ سه رقم بادام زمینی

مقادیر میانگین سه تکرار $\pm$ SD است. حروف مشابه در هر ستون به منزله عدم وجود اختلاف معنی‌دار بر اساس آزمون دانکن در سطح احتمال پنج درصد ($P \leq 0.05$) می‌باشد.

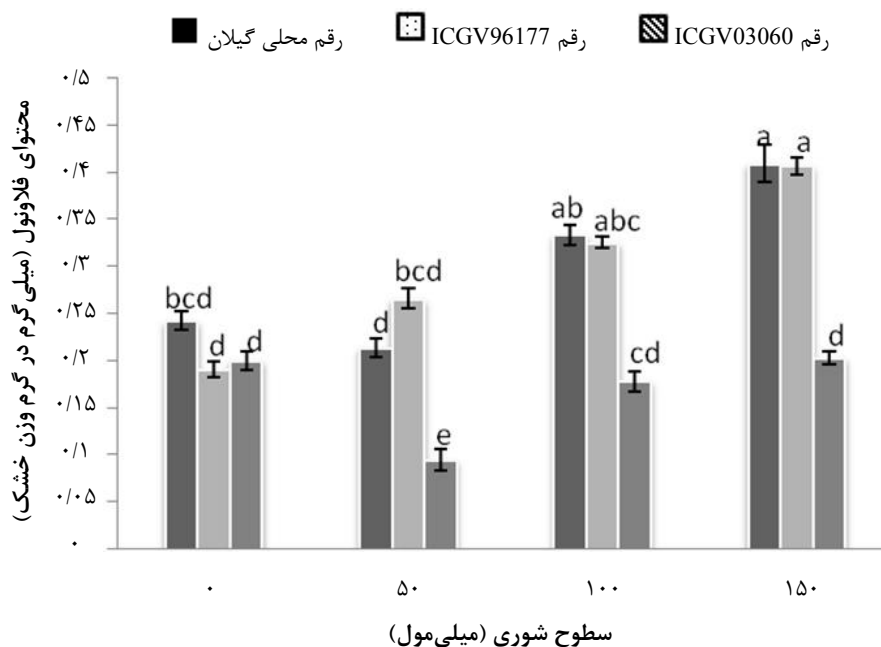
Bryant و همکاران (۱۹۸۳) نشان دادند که در واقع تنش شوری ممکن است رشد گیاه را به علت کاهش سرعت فتوسنتز محدود کند. تحت چنین شرایطی، ترکیبات فنلی بیش‌تری تولید می‌شود که نتایج تحقیق حاضر نیز حاکی از افزایش تولید ترکیبات فنلی تحت تنش شوری است. Apel و Hirt (۲۰۰۴) علت افزایش محتوای فنلی در گیاهان تحت تنش را چنین بیان نمودند که گیاهان تحت تنش، سازوکارهای دفاعی خاصی را از قبیل افزایش غلظت فنل کل در برابر

استرس اکسیداتیو به کار می‌گیرند. افزایش ترکیبات فنلی به این علت است که گروه‌های هیدروکسیل آزاد متصل به حلقه آروماتیک به وسیله جاروبگری رادیکال‌ها و سایر سازوکارها مانند فروکشی اکسیژن یکتایی و کلاته کردن فلز به وسیله باند شدن یون‌های سمی، آسیب‌های اکسیداتیو ناشی از یون‌ها را کم کرده و به این ترتیب ساختارهای سیتوپلاسمی و کلروپلاستی را از اثر منفی شوری محافظت می‌کنند. Kanwal و همکاران (۲۰۱۳) با بررسی تنش شوری روی گیاه ماش (از تیره فاباسه) نیز مشاهده کردند که تیمار شوری شدید روی گیاه ماش، باعث کاهش میزان ترکیبات فنلی در برگ گیاه پس از گذشت سی روز شده است. این کاهش می‌تواند ناشی از تخریب این ترکیبات در اثر واکنش با ترکیبات اکسیداتیو در شرایط شور باشد. همان‌طور که در شکل ۱ مشاهده می‌شود، با وجود القای سنتز ترکیبات فنلی در تیمار شوری، احتمالاً تنش شدیدتر شوری می‌تواند اثر منفی روی ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی گیاه داشته و باعث کاهش ترکیبات فنلی شود (Sidsel Fiskaa *et al.*, 2009).

محتوای فلاونول کل

نتایج حاصل از آزمایش رنگ‌سنجی کلریدآلومینیم ارقام بررسی شده نشان داد که با افزایش تنش شوری به‌طور معنی‌داری (در سطح احتمال پنج درصد) میزان فلاونول در برگ‌های هر سه رقم بادام زمینی افزایش یافت (شکل ۲). به‌طوری‌که بیش‌ترین افزایش در مقدار فلاونول مربوط به رقم‌های محلی گیلان و ICGV96177 در تیمار ۱۵۰ میلی‌مولار دیده شد. اعمال تیمار شوری، اثر افزایشی اندکی بر میزان فلاونول در رقم ICGV03060 داشت، به نحوی که میزان فلاونول در تیمار ۵۰ میلی‌مولار کاهش و با زیاد شدن غلظت نمک، افزایش اندکی در مقایسه با ارقام محلی گیلان و ICGV96177 نمود. فلاونوئیدها به گروه‌هایی نظیر فلاونول‌ها، فلاونون‌ها، ایزو فلاونوئیدها، آنتوسیانین‌ها و غیره تقسیم می‌شوند (Halliwell, 1995). Tattini و Pollastr (۲۰۱۱) گزارش نمودند که فلاونول قدیمی‌ترین و فراوان‌ترین کلاس از فلاونوئیدها در گیاهان است که نقش مهمی در گیاهان، برای مقابله با تنش ایفا می‌کند. طبق تحقیقات Feucht و همکاران (۲۰۰۲)، طی تنش اکسیداتیو تغییرات شدیدی در میزان فلاونول مشاهده شد. آن‌ها همچنین گزارش کردند گیاهانی که در مناطق تحت تنش زندگی می‌کنند، دارای فلاونول بیش‌تری هستند. فلاونول‌ها در هر دو فاز آبی و چربی سلول‌های گیاهی وجود دارند. اثبات شده است که فلاونول‌های موجود در واکوئل‌ها می‌توانند در سیستم پاک‌سازی فلاونول پراکسیداز شرکت کرده و گونه‌های فعال اکسیژن به‌خصوص پراکسید هیدروژن را جارو نمایند (Yamasaki *et al.*, 1997). با توجه به شکل ۲، در مورد افزایش قابل توجه مقدار فلاونول تحت تنش شوری، می‌توان علت را چنین بیان کرد که فلاونول‌ها به عنوان ترکیب‌های فعال فیزیولوژیکی، عوامل محافظت‌کننده در مقابل تنش و به عنوان جذب‌کننده رادیکال‌های آزاد، نقش مهمی در مقاومت گیاهان دارند (Tattini *et al.*, 2004). البته افضل و همکاران (۱۳۸۶) گزارش

نمودند که در گیاه بابونه تحت تنش شدید شوری، میزان فلاونول کاهش یافت. فلاونول‌ها به عنوان رنگ‌ریزه همراه با آنتوسیانین در گیاهان، دارای نقش حمایتی هستند (Jaakola et al., 2002).

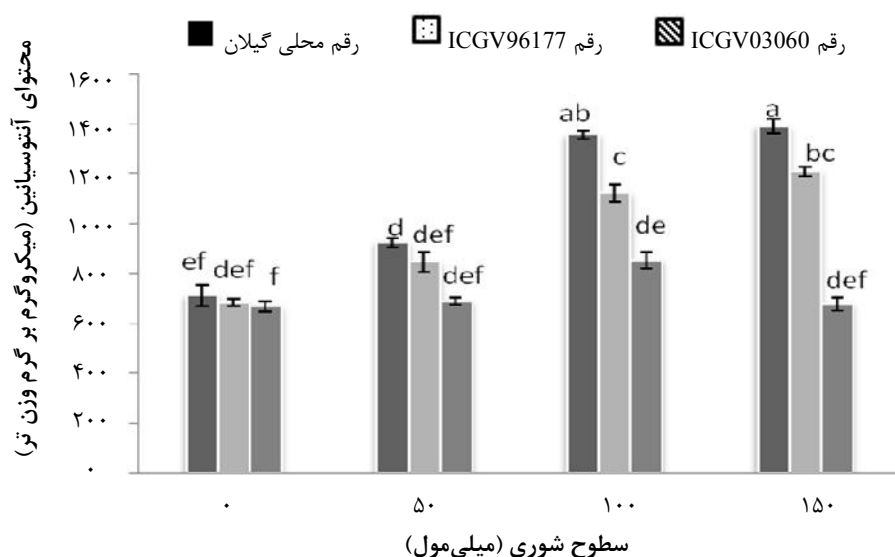


شکل ۲: تغییرات محتوای فلاونول کل در تیمارهای مختلف شوری در عصاره برگ سه رقم بادام زمینی

مقادیر میانگین سه تکرار $\pm$ SD است. حروف مشابه در هر ستون به منزله عدم وجود اختلاف معنی‌دار بر اساس آزمون دانکن در سطح احتمال پنج درصد ($P \leq 0.05$) می‌باشد.

محتوای آنتوسیانین

نتایج حاصل از اسپکتروفتومتری عصاره‌های متانولی برگ ارقام بررسی شده، افزایش معنی‌دار (در سطح احتمال پنج درصد) میزان آنتوسیانین را در هر سه رقم نشان داد. به‌طور دقیق، بیش‌ترین افزایش در مقدار آنتوسیانین، مربوط به تیمار ۱۵۰ میلی‌مولار رقم محلی گیلان و کم‌ترین افزایش، مربوط به رقم ICGV03060 و در سطح احتمال پنج درصد بود (شکل ۳). میزان آنتوسیانین در رقم ICGV03060 در مقایسه با ارقام محلی گیلان و ICGV96177، افزایش کم‌تری یافت و بیش‌ترین مقدار آن در شوری ۱۰۰ میلی‌مولار دیده شد (شکل ۳). متداول‌ترین گروه فلاونوئیدهای رنگ‌ریزه‌ای، آنتوسیانین‌ها هستند که مسئول بیش‌تر رنگ‌های قرمز، صورتی، بنفش و آبی در بخش‌های مختلف گیاهان می‌باشند (Fisel, 1965). آنتوسیانین‌ها یکی از ترکیبات آنتی‌اکسیدانی هستند که نه تنها رادیکال‌های آزاد را از بین می‌برند، بلکه از تولید بیش‌تر آن‌ها در گیاه جلوگیری می‌کنند. ثابت شده است که گیاهان با تولید و تجمع آنتوسیانین در لایه‌های اپیدرمی می‌توانند باعث کاهش اثر تنش اکسیداتیو شوند (Mittler, 2004 ; Hare and Cress, 2007). با توجه به شکل ۳ محتوای آنتوسیانین در رقم‌های محلی گیلان و ICGV96177 با افزایش تنش شوری به‌صورت معنی‌داری افزایش یافت.



شکل ۳: تغییرات محتوای آنتوسیانین در تیمارهای مختلف شوری در عصاره برگ سه رقم بادام زمینی

مقادیر میانگین سه تکرار $\pm$ SD است. حروف مشابه در هر ستون به منزله عدم وجود اختلاف معنی‌دار بر اساس آزمون دانکن در سطح احتمال پنج درصد ($P \leq 0.05$) می‌باشد.

به نظر می‌رسد که آنتوسیانین‌ها بتوانند در شرایط تنش آبی یا شوری به عنوان یک محلول سازگارکننده‌ی اسمزی نیز عمل کنند (Kennedy and Filippis, 1999). گزارش‌هایی حاکی از محتوای بالای آنتوسیانین در گیاهان بردبار به شوری موجود است (Wahid and Ghazanfar, 2006). قربانی و همکاران (۱۳۹۰) نشان دادند که در مناطقی که میزان شوری زیاد است، میزان آنتوسیانین در گیاهان بیش‌تر می‌شود. در بررسی تنش شوری توسط Garriga و همکاران (۲۰۱۴) بر روی برگ گیاه توت‌فرنگی وحشی، افزایش آنتوسیانین در شوری بالا گزارش شده است که با نتایج تحقیق حاضر مطابقت دارد. در واقع در تنش‌های اکسیداتیو، عمل آنتوسیانین‌ها خاموش نمودن اکسیژن فعال در برگ‌های جوان و میوه‌های در حال رشد است (Kaya and Ipak, 2003).

فعالیت آنتی‌اکسیدانی

درصد فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره برگ ارقام بررسی شده بادام زمینی در تیمارهای مختلف شوری، در جدول ۱ نشان داده شده است. میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی همه ارقام، از تیمار شوری صفر میلی‌مولار تا تیمار شوری ۱۵۰ میلی‌مولار به‌طور معنی‌داری در سطح احتمال پنج درصد افزایش پیدا کرد. به‌طور دقیق‌تر، رقم محلی گیلان، دارای بیش‌ترین میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی (۶۲/۸۱ درصد) بود و با افزایش تنش شوری تا ۱۰۰ میلی‌مولار به‌صورت معنی‌داری بر فعالیت آنتی‌اکسیدانی آن افزوده شد و در تیمار ۱۵۰ میلی‌مولار، تقریباً درصد بالایی از فعالیت آنتی‌اکسیدانی خود را حفظ نمود. به‌طور کلی، بالاترین ظرفیت آنتی‌اکسیدانی (۸۹/۲۳ درصد) مربوط به رقم محلی گیلان و تیمار ۱۰۰ میلی‌مولار دیده شد. در رقم ICGV96177 و رقم ICGV03060 فعالیت آنتی‌اکسیدانی تا تیمار ۱۰۰ میلی‌مولار افزایش یافت و با افزایش

تنش شوری، در تیمار ۱۵۰ میلی‌مولار از میزان فعالیت آنتی اکسیدانی کاسته شد. روش DPPH یک روش حساس، سریع و آسان برای ارزیابی فعالیت آنتی اکسیدانی یک ترکیب ویژه یا عصاره‌های گیاهی است (Pourmorad *et al.*, 2006). روش بی‌رنگ شدن رادیکال DPPH بر اساس ممانعت از تشکیل رادیکال یا از طریق جمع‌آوری آن‌ها، در یک سیستم تولیدکننده رادیکال است. در واقع رادیکال بنفش DPPH توسط آنتی اکسیدان‌ها احیا و بی‌رنگ می‌شود. فعالیت آنتی اکسیدانی از طریق توانایی کاهش رادیکال‌های DPPH توسط آنتی اکسیدان‌ها با کاهش جذب در ۵۱۷ نانومتر و در نتیجه بی‌رنگ شدن آن تعیین می‌شود (Joyce *et al.*, 2005). آنتی اکسیدان‌های گیاهی طبیعی شامل ترکیبات فنلی، بتاکاروتن، ویتامین‌های E و C هستند که در بخش‌های مختلف گیاه، اثر سودمندی روی جمع‌آوری ROS ها دارند. به‌طور کلی، تنش‌های غیرزیستی مسیرهای درگیر در بیوسنتز، سه گروه اصلی از متابولیت‌های ثانویه شامل ترپن‌ها، فنل‌ها و ترکیبات حاوی نیتروژن را تحت تأثیر قرار می‌دهند (Mittler, 2004). در تحقیق حاضر با توجه به جدول ۲ بیش‌ترین مقدار درصد فعالیت آنتی اکسیدانی متعلق به رقم محلی گیلان بود که پس از اعمال تنش شوری شدید نیز، در تیمار ۱۵۰ میلی‌مولار دارای بیش‌ترین درصد فعالیت آنتی اکسیدانی نسبت به دو رقم دیگر بود. Klimczak و همکاران (۲۰۰۷) نیز بیان کردند که تیمار شوری باعث تجمع ترکیبات فنلی و در نتیجه افزایش فعالیت آنتی اکسیدانی می‌شود که در مورد نتایج تحقیق حاضر نیز صدق می‌کند، به‌طوری‌که، تغییرات ظرفیت آنتی اکسیدانی دیده شده در این تحقیق مشابه با تغییرات میزان فنل کل بود و در هر دو مورد تا شوری ۱۰۰ میلی‌مولار افزایش و در شوری ۱۵۰ میلی‌مولار، کاهش میزان این دو پارامتر دیده شد. با این وجود به دلیل تفاوت در ساختار شیمیایی و فعالیت آنتی اکسیدانی ترکیبات فنلی، ممکن است با وجود بالا بودن میزان فنل، فعالیت آنتی اکسیدانی کم باشد. یا بر عکس، میزان فنل کم و ظرفیت آنتی اکسیدانی (به علت وجود سایر آنتی اکسیدان‌هایی به غیر از فنل) بالا باشد.

جدول ۲: تغییرات فعالیت آنتی اکسیدانی در عصاره برگ سه رقم بادام زمینی

رقم	تیمار شوری	درصد فعالیت آنتی اکسیدانی
محلی گیلان	صفر	۶۲/۸۱ ± ۰/۹۹d
	۵۰	۶۹/۴۶ ± ۰/۸۸ c
	۱۰۰	۸۹/۲۳ ± ۰/۹۸ a
	۱۵۰	۸۷/۴۸ ± ۰/۷۷ ab
ICGV96177	صفر	۵۶/۵۵ ± ۰/۷۲ e
	۵۰	۷۲/۶۱ ± ۰/۸۵ c
	۱۰۰	۸۶/۷۶ ± ۸۷ ab
	۱۵۰	۷۲/۴۵ ± ۰/۶۲ c
ICGV03060	صفر	۵۳/۸۰ ± ۱/۹۳ e
	۵۰	۷۱/۷۵ ± ۱/۶۳ c
	۱۰۰	۸۴/۲۰ ± ۰/۸۳ b
	۱۵۰	۷۳/۰۹ ± ۰/۸۶ c

مقادیر میانگین سه تکرار ± SD است. حروف یکسان بیانگر عدم وجود اختلاف معنی‌دار در سطح ۰/۰۵ P ≤ است.

کافی و همکاران (۱۳۸۹) نشان دادند که فعالیت مهار رادیکال DPPH با افزایش شوری در ژنوتیپ‌های نخود افزایش پیدا کرد، البته در بین ژنوتیپ‌ها، تنوع زیادی از نظر فعالیت مهار رادیکال DPPH مشاهده شده بود، به طوری که در بعضی ژنوتیپ‌ها با افزایش شوری در ابتدا افزایش فعالیت مهار رادیکال DPPH و در شوری شدید، کاهش فعالیت مهار رادیکال DPPH دیده شد، که این نتایج با یافته‌های این پژوهش مطابق بود. Valifard و همکاران (۲۰۱۴) نیز نشان دادند که تنش شوری در گیاه مریم‌گلی سبب افزایش میزان درصد فعالیت آنتی‌اکسیدانی گیاه شد، ولی تنش شوری شدید از میزان درصد فعالیت آنتی‌اکسیدانی گیاه کاست. علت این امر می‌تواند به این دلیل باشد که تنش شوری بالا، اثر منفی روی ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی گیاهان داشته و باعث کاهش ترکیبات فنلی و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی می‌شود (Sidsel Fiskaa et al., 2009). به طور کلی، با افزایش شوری، درصد احیای رادیکال DPPH افزایش می‌یابد که این خود حاکی از وجود رادیکال‌های آزاد بیش‌تر و قدرت احیایی آنتی‌اکسیدان‌ها در تنش شوری است.

نتیجه‌گیری

با بررسی اثر غلظت‌های مورد استفاده شوری روی آنتی‌اکسیدان‌های غیرآنزیمی، در مورد مقایسه حساسیت به شوری در ارقام مختلف، می‌توان از تفاوت‌های ایجاد شده در میزان آنتی‌اکسیدان‌ها کمک گرفت. با توجه به نتایج تحقیق حاضر، افزایش معنی‌دار در میزان آنتی‌اکسیدان‌های غیرآنزیمی، در غلظت‌های بالای کلریدسدیم در رقم محلی گیلان، نشان دهنده کارآمدی بیش‌تر سیستم آنتی‌اکسیدانی این رقم در مقایسه با ارقام ICGV96177 و ICGV03060 در پاسخ به تنش شوری است. به نظر می‌رسد در مناطقی که خاک مزارع بادام زمینی در معرض شوری هستند، رقم محلی گیلان، از نظر دفاع آنتی‌اکسیدانی رقم متحمل‌تر در مقابل شوری است و حساسیت کم‌تری نشان می‌دهد و رقم ICGV96177 در درجه دوم و رقم ICGV03060 در درجه سوم تحمل به شوری، از نظر دفاع آنتی‌اکسیدانی قرار داشته و حساس‌ترند.

منابع

افضلی، ف.، شریعتمداری، ح.، حاج‌عباسی، م. و معطر، ف. ۱۳۸۶. تأثیر تنش‌های شوری و خشکی بر عملکرد گل و میزان فلاونول-O-گلیکوزیدها در گیاه بابونه (*Chamomilla matricaria*). فصلنامه پژوهشی گیاهان دارویی و معطر ایران. ۳: ۲۷-۳۸.

سیدشریفی، ر. ۱۳۸۶. گیاهان صنعتی، انتشارات مهد تمدن. ۴۰۷ ص.

زادوریان، ژ.، خدارحمی، م.، امینی، ا. و مصطفوی، خ. ۱۳۹۰. بررسی تأثیر تنش شوری از کلریدسدیم بر بیوماس ارقام تجاری گندم نان در مرحله گیاهچه‌ای. ۷ (۱): ۶۹-۸۳.

صراحی‌نوبر، م.، نیکنام، و. و مرادی، ب. ۱۳۸۹. اثر تنش شوری بر محتوای پروتئین، رنگیزه‌ها، قندها و ترکیبات فنلی در کشت بافت چند گونه از شنبلیله‌های ایران. مجله علوم دانشگاه تهران. ۲: ۵۹-۵۲.

- صفرزاده ویشکائی، م. ن. ۱۳۷۸. بادام زمینی. انتشارات دانشگاه آزاد اسلامی واحد رشت. ۳ (۸): ۴۶.
- فرهودی، ر. ۱۳۹۲. بررسی اثر تنش شوری بر رشد و ویژگی‌های فیزیولوژیک نه رقم گندم در مرحله رشد رویشی. فصلنامه علمی پژوهشی فیزیولوژی گیاهان زراعی. دانشگاه آزاد اسلامی واحد اهواز. ۵ (۲۰): ۸۶-۷۱.
- قربانلی، م.، سعادت‌مند، ل. و نیاکان، م. ۱۳۹۰. بررسی برخی اثرات رویشگاه‌های مختلف بر روی ترکیبات فلاونوئیدی، پلی فنل‌ها، آنتوسیانین‌ها و فعالیت آنتی اکسیدانی گیاه دارویی سنجد (*Elaeagnus angustifolia*). اولین همایش ملی مباحث نوین در کشاورزی. دانشگاه آزاد گرگان. ص: ۷-۱.
- کافی، م.، باقری، ع.، نباتی، ج.، زارع مهرجردی، م. و معصومی، ع. ۱۳۸۹. بررسی تأثیر تنش شوری بر برخی متغیرهای فیزیولوژیک ۱۱ ژنوتیپ نخود در محیط هیدروپونیک. مجله علوم و فنون کشت‌های گلخانه‌ای. ۴: ۶۹-۵۵.
- Apel, K. and Hirt, H. 2004. Reactive oxygen species: Metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Plant Biology* 55:373-399.
- Bakhshi, D. and Arakawa, O. 2006. Induction of phenolic compounds biosynthesis with light irradiation in the flesh of red and yellow apples. *Journal of Applied Horticulture* 8 (2): 101-104.
- Baryl, A., Laborde, C., Montillet, J.L., Triantaphylides, C. and Chagvardieff, P., 2000. Evaluation of lipid peroxidation as a toxicity bioassay for plant exposed to copper. *Environmental Pollution* 109: 131-135.
- Bryant, J.P., Chapin, F.S. and Klein, D.R. 1983. Carbon/ nutrient balance of boreal plants in relation to vertebrate herbivore. *Oikos* 40: 357-368.
- Ekiz, H. and Yilmaz, A. 2003. Determination of the salt tolerance of some barley genotypes and the characteristics affecting tolerance. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry* 27:253-260.
- FAO. 2010. Extent and causes of salt-affected soils in participating countries. Available on URL: <http://www.fao.org/ag/AGL/agll/spuch/topic4.htm>.
- Feucht, W., Treutter D. and Christ E. 2002. Role of flavanols in yellowing beech trees of Black Forest. *Tree Physiology* 17: 335.
- Fisel, J. 1965. Preparation of kaempferol, quercetin, and isorhamnetin from the green leaves of *Ginkgo biloba*. *Natur Wissen Schäften* 52 (21): 592.
- Garriga, M., Jorge, B., Retamales, S., Bravo, P., Caligari, D. and Gustavo A. 2014. Chlorophyll, anthocyanin, and gas exchange changes assessed by spectroradiometry in *Fragaria chiloensis* under salt stress. *Journal of Integrative Plant Biology* 56: 505-512.
- Hajar, A.S., Helkal, M.M., Maghrabi, Y.M. and Abuzinadah, R.A. 1993. Responses of *Arachis hypogaea* (peanut) to salinity stress. *King Abdulaziz University Science* 5: 5-13.
- Halliwell, B. 1995. How to characterise an antioxidant: An update. *Biochemical Society Symposium* 61: 73-101.

Hare, P.D. and Cress, W.A. 2007. Metabolic implications of stress-induced accumulation in plants. *Plant Growth Regulation* 21:79-103.

Harborne, J.B. and Simmonds, N.W. 1964. Biochemistry of phenolic compounds, Academic press. London, pp101.

ICARDA, 2002. International cooperation Highlands regional program. Available on: URL:[http// www.icarda.cgiar.Org](http://www.icarda.cgiar.Org).

Jaakola, L., Maatta, K., Pirttila, A.M., Torronen, R., Karenlampi, S. and Hohtola, A. 2002. Expression of genes involved in anthocyanin biosynthesis in relation to anthocyanin, proanthocyanidin, and flavonol levels during bilberry fruit development. *Plant Physiology*, 130 (2): 729-739.

Joyce, C., Pennycooke, S. and Stushnoff, C. 2005. Relationship of cold acclimation, total phenolic content and antioxidant capacity with chilling tolerance in petunia. *Enviromental and Eeperimental Botany* 53: 225-232.

Kanwal, S., Ashraf, M., Shahbaz, M. and Yasir, M. 2013. Influence of saline stress on growth, gas exchange Nutrients and non- enzymatic Antioxidants mungbean. *Pakistan Journal of Botany* 45 (3): 763-771.

Karra, G., Nadenla, R., Shireesh Kiran, R., Srilatha, K., Mamatha, P. and Umamaheswar Rao, V. (2013). An overview on *Arachis hypogaea* plant. *International Journal of Phyrmacetical Siences and Research* 4 (12): 4508-4518.

Kaya, M.D. and Ipek, A. 2003. Effects of different soil salinity levels on germination and seedling growth of safflower (*Carthamus tinctorius* L.). *Turkish Journal Agriculture & Forestly* 27: 221-227.

Kennedy, B.F. and Filippis, L.F. 1999. Physiological and oxidative response to NaCl of the salt tolerant *Grevillea ilicifolia* and the salt sensitive *Grevillea arenaria*. *Journal of Plant Physiology* 155: 746-754.

Klimczak, I., Maecka, M., Szlachta, M. and Gliszczyn, A. 2007. Effect of storage on the content of polyphenols, vitamin C and the antioxidant activity of orange juices. *Journal of Food Composition and Analysis* 20: 313-322.

Kontogiorgis, C. and Hadjipavlou-Litina, D. 2005. Biological evaluation of several coumarin derivatives designed as possible anti-inflammatory antioxidant agents. *Journal of Medicinal Chemistry* 48 (20): 6400-6408.

Kuk, Y., Shin, J., Burgo, S., Hwang, R., Jung, O. and Guh, J.O. 2003. Antioxidative enzymes offer protection from chilling damage plants. *Crop Science* 43: 2109-2117.

Masukasu, H., Karin, O. and Kyoto, H. 2003. Enhancement of anthocyanin biosynthesis by sugar in radish (*Raphanus sativus*) hypocotyls. *Plant Science* 164 (2): 259-265.

- Miliauskas, G., Venskutonis, P.R. and Beek, T.A. 2004.** Screening of radical scavenging activity of some medicinal and aromatic plant extracts. *Food Chemistry* 85: 231-237.
- Mittler, R. 2004.** Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plant Science* 7: 405-410.
- Pandy, N., Pathac, G.C., Sing, A.K. and Shrma, C.P. 2002.** Enzymic changes in response to zinc nutrition. *Journal of Plant Physiology* 159: 1151-1153.
- Pollastri, S. and Tattini, M. 2011.** Flavonols: old compounds for old roles. *Annals of Botany*. 1: 1-9.
- Pourmorad, F., Hosseiniimehr, N. and Shahabimajd, N. 2006.** Antioxidant activity, Phenol and flavonoid contents of some selected Iranian medical plants. *African Journal of Biotechnology* 5 (11): 1142-1145.
- Salwa, A.R., Hammad, Kh.A., Shaban, F. and Manal, F. 2010.** Studies on Salinity Tolerance of Two Peanut Cultivars in Relation to Growth, Leaf Water Content. Some Chemical Aspects and Yield. *Journal of Applied Sciences Research* 6 (10): 1517-1526.
- Shah, K., Kumar, G., Verma, S. and Dubey, R. 2001.** Effect of cadmium on lipid peroxidation, superoxide anion generation and activities of antioxidant enzymes in growing rice seedlings. *Plant Science* 161: 1135-1144.
- Sidsel Fiskaa, H., Grethe, I. Borge, A., Knut, A. and Gunnar, B. 2009.** Effect of cold storage and harvest data on bioactive compound in curly kale (*Brassica oleracea* L. var. acephala). *Potharvest Biology and Technology* 51: 36-42.
- Slinkard, K. and Singleton, V.L. 1977.** Total phenol analyses: automation and comparison with manual methods. *American Journal Enology and Viticulture* 28: 49-559.
- Srivastava, N., Vadez, V., Krishnamurthy, L., Saxena, K.B., Nigam, S.N. and Rupakula, A. 2005.** Screening for salinity Tolerance in Groundnut (*Arachis hypogaea*) and Pigeonpea (*Cajanus cajan*). *Proceeding of The Fourth International Food Legumes Research Conference (IFLRC-IV)*. 1:1-13. *New Delhi – India*.
- Tattini, M., Galardi, C., Pinelli, P., Massai, R., Remorini, D. and Agati, G. 2004.** Differential accumulation of flavonoids and hydroxycinnamates in leaves of *Ligustrum vulgare* under excess light and drought stress. *New Phytologist* 163: 547-561.
- Valifard, M. Mohsenzadeh, S., Kholdebarin, B. and Rowshan, V. 2014.** Effects of salt stress on volatile compounds, total phenolic content and antioxidant activities of *Salvia mirzayanii*. *South African Journal of Botany* 93: 92-97.
- Wahid, A. and Ghazanfar, A. 2006.** Possible involvement of some secondary metabolites in salt tolerance of sugarcane. *Journal of Plant Physiology* 163: 723-730.

Yilmaz, D.D. 2007. Effects of salinity on growth and nickel accumulation capacity of *Lemna gibba* (Lemnaceae). Journal of Hazardous Materials 147: 74-77.

Yamasaki, H., Sakihama, Y. and Ikehara, N. 1997. Flavonoid-Peroxidase reaction as a detoxification mechanism of plant cells against H₂O₂. Plant Physiology 115: 1405-1412.