



دانشگاه گوارن و منابع طبیعی گران

نشریه پژوهش های تولید گیاهی
جلد بیست و یکم، شماره اول، ۱۳۹۳
<http://jopp.gau.ac.ir>

بررسی برخی صفات مورفولوژیک و فیزیولوژیک کلزا در مراحل مختلف نموی در شرایط تنش غرقابی

*سیده فاطمه رسولی^۱، سراله گالشی^۲، همت‌اله پیردشتی^۳ و ابراهیم زینلی^۴

^۱دانش‌آموخته کارشناسی ارشد گروه زراعت، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گران، آستاد گروه زراعت،
^۲دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گران، آدانشیار گروه زراعت دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری،
^۳آستادیار گروه زراعت، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گران،

تاریخ دریافت: ۹۱/۱۱/۸ ؛ تاریخ پذیرش: ۹۳/۱/۲۴

چکیده

این پژوهش به منظور بررسی اثر تنش غرقابی بر برخی صفات ریخت شناسی و فیزیولوژیک کلزا (*Brassica napus* L.) در مراحل مختلف نموی، رقم هایولا ۴۰۱، به صورت گلدانی در دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گران، در قالب طرح پایه کاملاً تصادفی با آرایش فاکتوریل، در سه تکرار در سال ۱۳۸۹-۱۳۹۰ انجام شد. فاکتورهای آزمایش شامل مراحل نموی (گیاهیچه‌ای، ساقه‌رفتن، گلدهی و پر شدن دانه) و مدت اعمال تنش غرقابی (۰، ۳، ۶ و ۹ روز) بود. در این آزمایش، صفات سطح برگ، وزن خشک برگ، ارتفاع و وزن خشک ساقه، حجم ریشه، وزن خشک ریشه، فلورسانس کلروفیل، غلظت کلروفیل و عملکرد دانه اندازه‌گیری شد. برای کمی‌سازی اثر تنش غرقابی بر صفات مورفولوژیک و عملکرد از مدل زوال کاهشی و خطی استفاده گردید. شرایط غرقابی سبب کاهش سطح و وزن خشک برگ، کاهش F_v/F_m و کاهش میزان کلروفیل، افزایش زردی، پیری زودرس و ریزش برگ‌ها گردید. در نتیجه این تغییرات گیاه زیست توده کمتری به ساقه و ریشه صادر کرده و ارتفاع، وزن خشک ساقه، حجم و وزن خشک ریشه و در نهایت نیز عملکرد دانه کاهش یافت. بیشترین شیب کاهش عملکرد دانه در شرایط غرقابی مرحله‌ی گلدهی (۱/۷۳- در روز) و کمترین آن

*مسئول مکاتبه: f.rasouli88@yahoo.com

در شرایط غرقابی مرحله‌ی ساقه‌رفتن (۶/۰- در روز) به‌دست آمد. بیشترین میزان عملکرد دانه در تیمار شاهد (۳/۱۵ گرم در بوته) و کمترین آن در تیمار ۹ روز غرقاب مرحله گلدهی و پر شدن دانه (به‌ترتیب ۱۸/۰ و ۴/۱ گرم در بوته) به‌دست آمد. به‌طورکلی نتایج این آزمایش نشان داد که تنش غرقابی در نتیجه صدمه به اندام‌های رویشی و عدم کارکرد مناسب گیاهان تحت تنش نسبت به شاهد، موجب کاهش عملکرد دانه در هر چهار مرحله نمودی گردید.

واژه‌های کلیدی: تنش غرقابی، عملکرد، کلزا، کلروفیل

مقدمه

در بین گیاهان روغنی، کلزا با سطح زیر کشت ۲۲ میلیون هکتار در جهان بعد از سویا مقام دوم را از نظر تولید دارا است (فائو، ۲۰۰۷). سطح زیر کشت این گیاه در ایران ۱۱۷۳۲۳ هکتار و استان گلستان ۳۱۹۰۳ هکتار می‌باشد (آمارنامه کشاورزی، ۲۰۱۰). این گیاه به‌صورت پاییزه هم‌زمان با فصل بارندگی در گرگان و مازندران کشت می‌گردد. در برخی سال‌ها بارندگی‌های زیاد پاییزه یا بهاره در مقطعی از زمان و عدم وجود زهکش‌های مناسب سبب حادث شدن تنش غرقابی در اراضی زیر کشت محصولات زراعی می‌گردد که نتیجه آن اختلال در رشد و نمو طبیعی گیاهان و در برخی مواقع سبب مرگ آن‌ها می‌شود. بنابراین در این منطقه در اکثر سال‌ها بخشی از عملکرد مزارع کلزا به‌دلیل وقوع تنش غرقابی از دست می‌رود.

ریشه گیاهان غیرآبزی به لحاظ فیزیولوژیکی برای تنفس نیاز به اکسیژن موجود در خاک دارند و اکسیژن از مسیر انتقال آب به ریشه‌ها، وارد سلول‌های ریشه می‌شوند. در شرایط بدون اکسیژن، فرآیند تنفس بافت‌های ریشه، چرخه کربس و چرخه انتقال الکترون مختل شده که نهایتاً باعث تولید ۲ مولکول ATP به‌جای ۳۶ مولکول ATP به‌ازای هر مولکول گلوکز در شرایط غیرهوازی می‌شود (سایرام و همکاران، ۲۰۰۹). تأمین انرژی از این مسیر با تولید اتانول و مواد سمی همراه است که سبب کاهش فعالیت‌های آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی، افزایش پراکسیداسیون لیپید و نفوذپذیری غشا (ملک‌احمدی و همکاران، ۲۰۰۴)، کاهش کلروفیل و زردی برگ (ملک‌احمدی و همکاران، ۲۰۰۴؛ دان و همکاران، ۱۹۸۳) می‌گردد. این اختلالات سبب کاهش تولید انرژی، جذب و انتقال آب و مواد غذایی

از ریشه و انتقال آن به اندام‌های هوایی را با مشکل مواجه می‌سازد که در نهایت سبب کاهش رشد و عملکرد می‌گردد (مالک و همکاران، ۲۰۰۱؛ هانگ و همکاران، ۱۹۹۵).

بررسی‌های انجام شده روی گیاهان مختلف نشان داده است که اثرات تنش غرقابی در گیاهان مختلف متفاوت بوده و این تفاوت‌ها مربوط به گونه گیاهی، سن گیاه، شرایط فیزیولوژیک و نوع خاک می‌باشد (گنجعلی و پالتا، ۲۰۰۸). غرقابی در مراحل اولیه‌ی رشد انگور سبب اپیناستی^۱، زردی، پیری و ریزش برگ‌ها (ایزاراکرازیلا و همکاران، ۲۰۰۷) کاهش سریع میزان فتوسنتز در ماش (احمد و همکاران، ۲۰۰۲) و کاهش زیست توده اندام هوایی در گندم گردید (دیکن و رایت، ۲۰۰۳). در بقولات مانند نخودفرنگی (بلفورد و همکاران، ۱۹۸۰)، لوپین (برو و همکاران، ۱۹۷۶) و سویا (گریفین و ساکسون، ۱۹۸۸) با افزایش سن گیاه تحمل به تنش غرقابی کاهش یافت. این محققان دریافته‌اند که مرحله‌ی گلدهی حساس‌ترین مرحله فنولوژیکی به تنش غرقابی است. کاهش تحمل به تنش غرقابی در مرحله گلدهی گیاه به احتمال زیاد نتیجه تغییر مسیر انتقال مواد فتوسنتزی از ریشه به سمت اندام‌های زایشی است (ایوانز، ۱۹۸۲). تغییر مسیر انتقال مواد فتوسنتزی ممکن است به تخلیه ذخایر کربوهیدرات موجود در ساقه منجر شود. تنش غرقابی اثرات متفاوتی بر فیزیولوژی و عملکرد کلزا در مراحل مختلف رشد داشت، زو و لین (۱۹۹۵) نیز در کلزا تحت تنش غرقابی گزارش نمودند سطح برگ در مرحله گیاهچه‌ای ۳۹/۱ درصد و در مرحله ظهور جوانه گل ۲۲/۲ درصد و مرحله گلدهی ۲۸/۱ درصد نسبت به شاهد کاهش یافته بود. بیشترین تأثیر تنش غرقاب در مرحله گیاهچه‌ای و ظهور جوانه گل بود. در این دو مرحله تعداد خورجین در هر گلدان ۵/۸ درصد و ۲۲/۳ درصد و تعداد دانه در هر خورجین ۸/۲ درصد و ۱۳/۹ درصد نسبت به شاهد کاهش یافت (زو و لین، ۱۹۹۵). همچنین شرایط غرقابی در گندم منجر به کاهش سطح برگ، سرعت رشد آن و کاهش عملکرد دانه گردید (مسگریو و دینگ، ۱۹۹۸) آن‌ها بیان نمودند که تعداد دانه مهم‌ترین جزء عملکرد است که تحت تأثیر تنش غرقابی قرار می‌گیرد. هدف از انجام این آزمایش نیز بررسی صفات مورفولوژیک و عملکرد در کلزا (*Brassica napus L.*) در چهار مرحله نموی (گیاهچه‌ای، ساقه‌رفتن، گلدهی و پرشدن دانه) در شرایط تنش غرقابی می‌باشد.

مواد و روش‌ها

این آزمایش در سال زراعی ۹۰-۱۳۸۹ به صورت گلدانی در هوای آزاد با میانگین بارندگی ۵۵۰ میلی‌متر در طی فصل رشد کلزا در دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان در سه تکرار و در قالب طرح پایه کاملاً تصادفی و آرایش فاکتوریل انجام شد. عامل اول شامل مرحله نموی اعمال تنش (اقتباس از روش سیلوستر- برادلی (۱۹۸۵)) در چهار سطح (گیاهچه‌ای، ساقه‌رفتن، گلدهی و پرشدن دانه) و عامل دوم مدت‌های اعمال تنش غرقابی (۰، ۳، ۶ و ۹ روز) بود. خاک گلدان‌ها دارای بافت شنی رسی لوم (۵۰ درصد شن، ۳۰ درصد رس و ۲۰ درصد سیلت) بود (جدول ۱). گلدان‌های مورد استفاده از جنس پلاستیک، به قطر دهانه ۰/۳۰ متر و ارتفاع ۰/۲۷ متر و دارای زهکش مناسب بودند. گلدان‌های مورد نظر برای اعمال تیمارهای غرقابی، در زمان مشخص در حوضچه‌ای به طول ۲/۵ متر، عرض ۰/۵ متر و عمق ۰/۴ متر قرار گرفتند. در این حالت خاک گلدان‌ها از آب اشباع گردید. در هر گلدان ۱۰ عدد بذر کلزا در تاریخ ۲۶ آبان سال ۱۳۸۹ کشت گردید و در تاریخ ۲ آذر سال ۱۳۸۹ سبز شدند و پس از استقرار بوته‌ها تعدادشان به ۴ بوته در هر گلدان رسید. اعمال تنش‌های (۳، ۶ و ۹ روز غرقاب) در مراحل گلدهی و پرشدن دانه در تاریخ ۸ خرداد سال ۱۳۹۰ و اعمال تنش‌های غرقابی (۰، ۳، ۶ و ۹ روز غرقاب) در مراحل گیاهچه‌ای و ساقه‌رفتن در ۱۸ خرداد سال ۱۳۹۰ برداشت شدند.

جدول ۱- مشخصات خاک.

| مشخصه | مقدار |
|------------------|-----------------------|
| بافت | شنی، رسی لوم |
| اسیدیته گل اشباع | ۷/۶ |
| هدایت الکتریکی | ۱/۲۹ (دسی‌زیمنس) |
| نیترژن کل | ۰/۶۱ (قسمت در میلیون) |

اندازه‌گیری‌ها: برای اندازه‌گیری صفات مورفولوژیک در طول فصل رشد پس از هر بار اعمال تنش غرقابی نمونه‌گیری از بوته‌ها انجام شد. در هر نمونه‌گیری از هر گلدان (واحد آزمایشی) سه بوته برداشت و ارتفاع ساقه، حجم ریشه سطح برگ و وزن خشک به تفکیک اندام اندازه‌گیری شد. ارتفاع ساقه با خط‌کش، حجم ریشه با استوانه مدرج و سطح برگ به وسیله دستگاه سطح برگ‌سنج مدل

DELTA-T اندازه‌گیری شد. برای اندازه‌گیری وزن خشک، نمونه‌ها به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد در آون قرار داده شدند و پس از خشک شدن توزین شدند. اندازه‌گیری فلورسانس کلروفیل: میزان فلورسانس کلروفیل برگ‌ها با استفاده از دستگاه فلورسانس‌سنج (OPTI-SCIENCES) مدل OS-30 اندازه‌گیری شد. به این ترتیب که بعد از اعمال مدت‌های مختلف تنش غرقابی در هر مرحله نموی برگ‌های انتهایی کاملاً توسعه‌یافته به مدت ۱۵ دقیقه توسط گیره‌های مخصوص در تاریکی قرار گرفت (سلطانی، ۲۰۰۴). پس از آن متغیر F_0 (حداقل فلورسانس که در آن توان استفاده فتوشیمیایی از انرژی برانگیخته حداکثر است)، F_M (حداکثر فلورسانس) و F_v/F_M توسط دستگاه مربوطه خوانده شدند (F_v فلورسانس متغیر فلورسانس است که به صورت $F_M - F_0$ به دست می‌آید). حداکثر عملکرد کوانتومی فتوسیستم II با استفاده از رابطه زیر به دست می‌آید:

$$F_v / F_M = (F_M - F_0) / F_M$$

وقتی شدت نور کافی باشد، فلورسانس از مقدار F_0 به حداکثر مقدار خود (F_M) افزایش پیدا می‌کند. این افزایش نشان‌دهنده افزایش تدریجی در عملکرد فلورسانس است و هم‌زمان با کاهش سرعت کنش‌های فتوشیمیایی می‌باشد.

اندازه‌گیری کلروفیل: برای استخراج کلروفیل از روش آرنون (۱۹۴۹) و اندازه‌گیری غلظت کلروفیل از روش اردکانی و نادور (۲۰۰۸) استفاده گردید. برای این منظور ۰/۲۵ گرم وزن تر برگ که از برگ‌های کاملاً توسعه‌یافته فوقانی برداشت گردیده بود با ۱۰ میلی‌لیتر استون ۸۰ درصد در هاون چینی ساییده و هم‌وزن‌زده گردید. آن‌گاه در داخل لوله سانتریفیوژ ریخته و به مدت ۵ دقیقه با شدت ۵۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. فاز بالایی (شفاف) برداشته و در داخل لوله داخل بالون ژوژه ۲۵ میلی‌لیتر ریخته شد. مواد ته لوله سانتریفیوژ به همراه ۱۰ میلی‌لیتر استون ۸۰ درصد دوباره ساییده شده و سپس مجدداً سانتریفیوژ گردید. فاز بالایی شفاف به بالون ژوژه اضافه شد. این عمل تا خاکستری شدن بافت برگ و رسیدن بالون به حجم ۲۵ میلی‌لیتر ادامه یافت. سپس با اسپکتروفوتومتر مدل S2000 UV/VIS در طول موج‌های ۴۸۰، ۵۱۰، ۶۴۵ و ۶۶۳ نانومتر قرائت شد. میزان کلروفیل a و b و کارتنوئید (C) به ترتیب با استفاده از فرمول‌های ۱، ۲ و ۳ محاسبه گردید. قبل از قرائت در این طول موج‌ها ابتدا دستگاه با نمونه شاهد (استون ۸۰ درصد) صفر شد.

$$\text{Chl}_a = 12.7 (A_{663}) - 2.69 (A_{645}) \times \frac{v}{1000 \times w} \quad [1]$$

$$\text{Chl}_b = 22.9 (A_{645}) - 4.68 (A_{663}) \times \frac{v}{1000 \times w} \quad [2]$$

$$C_{\text{(کارتنوید)}} = 7.6(A_{480}) - 1.49(A_{510}) \times \frac{v}{1000 \times w} \quad [3]$$

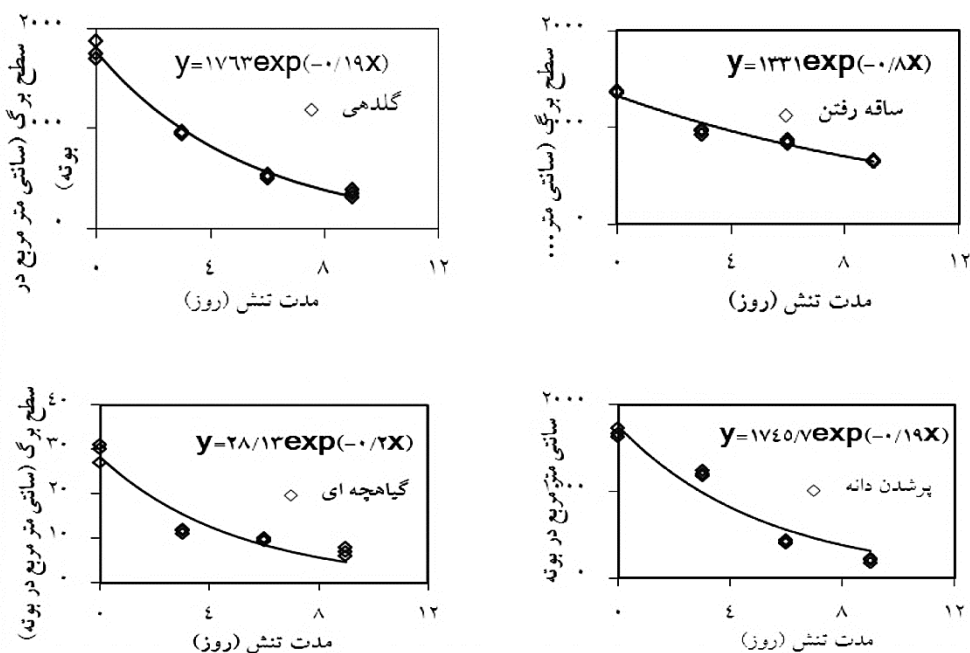
در روابط فوق V حجم عصاره مصرف شده، W وزن نمونه و Chl_a ، Chl_b و C به ترتیب غلظت کلروفیل a ، b و کارتنوید بر حسب (میلی گرم بر گرم وزن تر) می باشد. داده های به دست آمده از آزمایش به کمک نرم افزار SAS (سلطانی، ۲۰۰۷) و با رویه رگرسیون مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. رسم نمودارها نیز با استفاده از برنامه Excel انجام شد.

نتایج و بحث

سطح برگ: برای کمی سازی اثر تنش غرقابی بر صفات ریخت شناسی و عملکرد از مدل زوال کاهشی و مدل خطی استفاده شد. معیار انتخاب مدل برتر برای توصیف اثر تنش غرقابی بر صفات مورفولوژیک، عملکرد و اجزای عملکرد در مراحل مختلف نمو براساس (RMSE) و (R^2) بود. بر همین اساس معادله ای که برای بیان تغییرات سطح برگ استفاده شد، معادله زوال کاهشی بود که در این معادله در شکل (۱) مقدار ضریب a میزان سطح برگ را در آغاز تنش غرقاب و مقدار ضریب b سرعت نسبی کاهش سطح برگ را تحت اثر تنش غرقاب در روز نشان می دهد. میزان سطح برگ در آغاز تنش غرقابی چهار مرحله نموی گیاهچه ای، ساقه رفتن، گلدهی و پرشدن دانه به ترتیب ۲۸/۱۳، ۱۳۳۱/۰۲، ۱۷۶۳/۳ و ۱۷۴۵/۷ سانتی متر مربع در بوته بود و سرعت نسبی کاهش نیز در چهار مرحله نموی ۰/۲-، ۰/۸۲-، ۰/۱۹- و ۰/۱۹- در روز بود. در همه مراحل نموی (گیاهچه ای، ساقه رفتن، گلدهی و پرشدن دانه) حداکثر میزان سطح برگ در تیمار شاهد (۰ روز غرقاب) و حداقل میزان سطح برگ در تیمار ۹ روز غرقاب چهار مرحله ای نموی مشاهده شد. غرقابی سبب کاهش سطح برگ گردید شدت این کاهش با طولانی شدن مدت غرقابی از ۳ به ۹ روز افزایش یافت. کاهش سطح برگ و ریزش برگ ها در شرایط بی هوایی (غرقاب) ناشی از تولید هورمون های آبسزیک اسید و اتیلن بوده که برای تعدیل کمبود انرژی ناشی از شرایط بی هوایی (غرقاب) در گیاه بود. (سایرام و همکاران، ۲۰۰۹).

تخصیص مقدار زیادی از مواد فتوسنتزی در مرحله گلدهی جهت تشکیل گل و مرحله پر شدن دانه

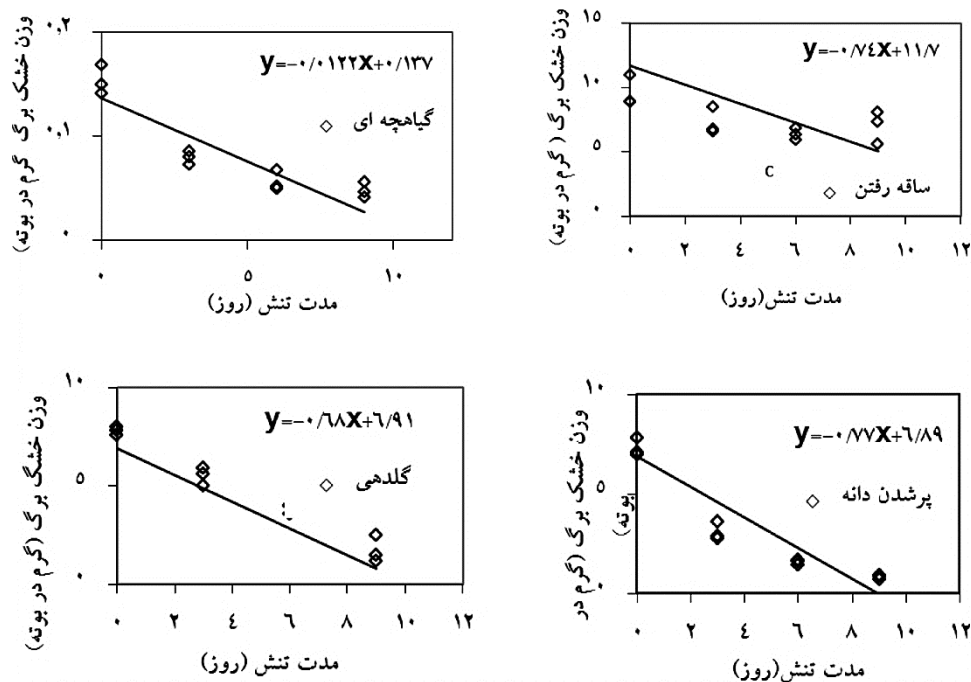
جهت تشکیل غلاف و پیشرفت نمو دانه به احتمال زیاد سبب حساسیت به مدت‌های طولانی تنش (۶ و ۹ روز) و کاهش بیشتر سطح برگ، تسریع در زوال و کاهش دوام سطح برگ شد.



شکل ۱- اثر طول دوره غرقابی در مراحل مختلف نمو بر سطح برگ کلزا.

وزن خشک برگ: همان‌طور که در شکل ۲ مشاهده می‌گردد، برای بیان تغییرات وزن خشک برگ معادله خطی برازش داده شد. مقدار اولیه وزن خشک برگ در آغاز تنش غرقاب چهار مرحله نموی گیاهچه‌ای، ساقه‌رفتن، گلدهی و پرشدن دانه به ترتیب 0.137 ، 0.117 ، 0.091 و 0.089 گرم در بوته و شیب کاهش وزن خشک برگ نیز -0.122 ، -0.074 ، -0.068 و -0.077 در روز بود. وزن خشک برگ در چهار مرحله نموی گیاهچه‌ای، ساقه‌رفتن، گلدهی و پرشدن دانه و تیمار صفر روز غرقاب 0.157 ، 0.127 ، 0.077 و 0.081 گرم در بوته و در تیمار ۹ روز غرقاب 0.03 ، 0.061 ، 0.024 و 0.082 گرم در بوته بود. بیشترین میزان وزن خشک برگ در تیمار شاهد هر مرحله رشدی (۰ روز غرقاب) و کمترین میزان آن در تیمار ۹ روز غرقاب هر مرحله‌ی رشدی مشاهده شده بود، وزن خشک برگ در تیمار ۹ روز

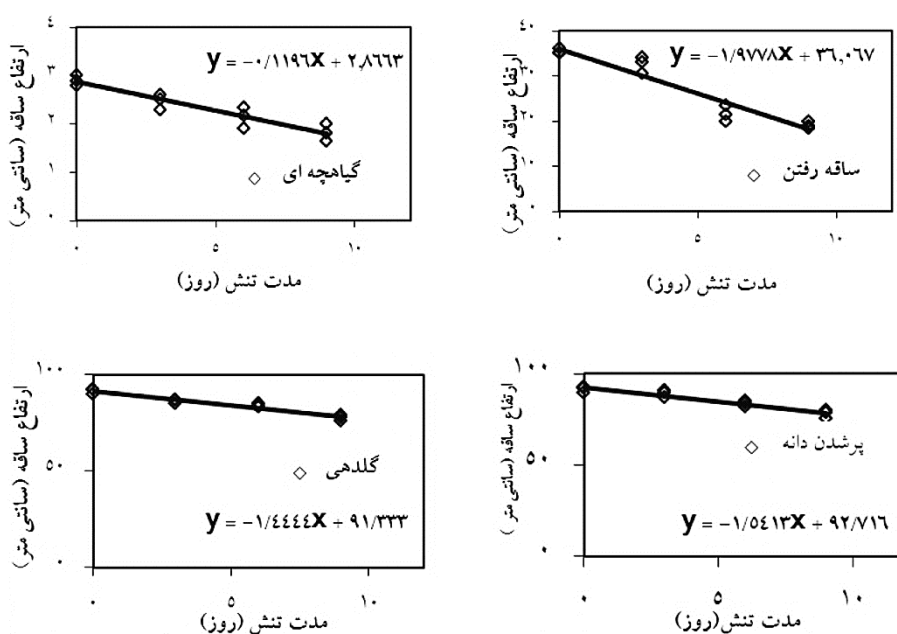
غرقاب و چهار مرحله نموی گیاهی، ساقه رفتن، گلدهی و پرشدن دانه به ترتیب ۰/۱۹، ۰/۱۹، ۰/۱۵ و ۰/۱ برابر شاهد در هر مرحله نموی بود. کاهش وزن خشک برگ ناشی از کاهش سطح برگ (شکل ۱) و کاهش میزان کلروفیل (شکل ۸ و ۹) و در نتیجه کاهش فتوسنتز و تولید ماده خشک بود. آزمایش‌های دیگر نیز وجود همبستگی خطی، مثبت و معنی‌دار بین وزن خشک برگ و سطح برگ تحت تنش غرقابی گزارش گردیده است (گنجعلی و پالنا، ۲۰۰۸؛ کریشناورثی و سراج، ۲۰۰۳).



شکل ۲- اثر طول دوره غرقابی در مراحل مختلف نمو بر وزن خشک برگ کلزا.

ارتفاع ساقه: مقدار اولیه ارتفاع در شروع تنش غرقاب چهار مرحله نموی گیاهی، ساقه رفتن، گلدهی و پرشدن دانه به ترتیب ۲/۸، ۳۶/۰۶، ۹۱/۲ و ۹۲/۷ سانتی‌متر در بوته و شیب کاهش ارتفاع ۰/۱۲، -۱/۹۷، -۱/۴۴ و -۱/۵۴ در روز بود (شکل ۳). بلندترین ارتفاع مربوط به تیمار شاهد در چهار مرحله نموی بوده و کوتاه‌ترین ارتفاع مربوط به تیمار ۹ روز غرقاب چهار مرحله نموی بود. میزان ارتفاع ساقه در تیمار ۹ روز غرقاب و مرحله گیاهی، ساقه رفتن، گلدهی و پرشدن دانه

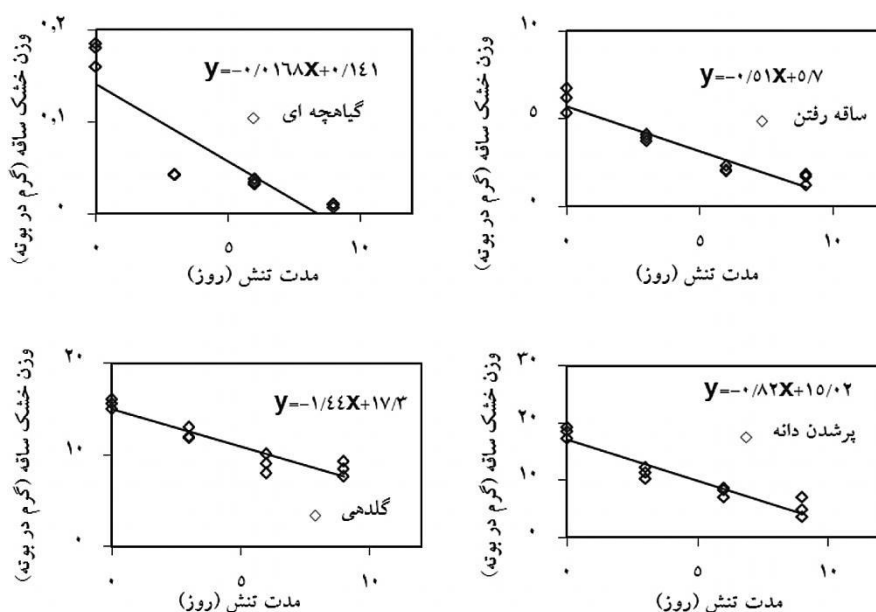
به ترتیب ۰/۶۸، ۰/۵۳، ۰/۸۶ و ۰/۸۵ برابر شاهد بود. ارتفاع ساقه در مرحله گیاهچه‌ای و ساقه‌رفتن با اعمال تنش غرقابی کاهش یافت. ارتفاع ساقه در مرحله گلدهی و پر شدن دانه با اعمال تنش غرقابی افت کمی نشان داد. شاید یکی از دلایل کاهش کمتر ارتفاع ساقه در مرحله گلدهی و پر شدن دانه به‌خاطر رشد محدود بودن کلزا و رسیدن به حداکثر ارتفاع در این مرحله باشد (اشرف و رحمان، ۱۹۹۹؛ احمد و همکاران، ۲۰۰۲).



شکل ۳- اثر طول دوره غرقابی در مراحل مختلف نمو بر ارتفاع ساقه کلزا.

وزن خشک ساقه: برای بیان تغییرات وزن خشک ساقه از یک معادله خطی استفاده گردید. مقدار اولیه وزن خشک ساقه در آغاز تنش غرقاب چهار مرحله نموی گیاهچه‌ای، ساقه‌رفتن، گلدهی و پر شدن دانه به ترتیب ۰/۱۴۱، ۰/۵۱، ۱۷/۳ و ۱۵/۰۲ گرم در بوته و شیب کاهش نیز ۰/۱۶-، ۰/۷-، ۱/۴۴- و ۰/۸۲- در روز بود. بیشترین میزان وزن خشک در هر چهار مرحله نموی گیاهچه‌ای، ساقه‌رفتن، گلدهی و پر شدن دانه مربوط به تیمار شاهد (۰/۰۷، ۵/۴، ۱۵/۳ و ۱۹/۵ گرم در بوته) و کمترین میزان

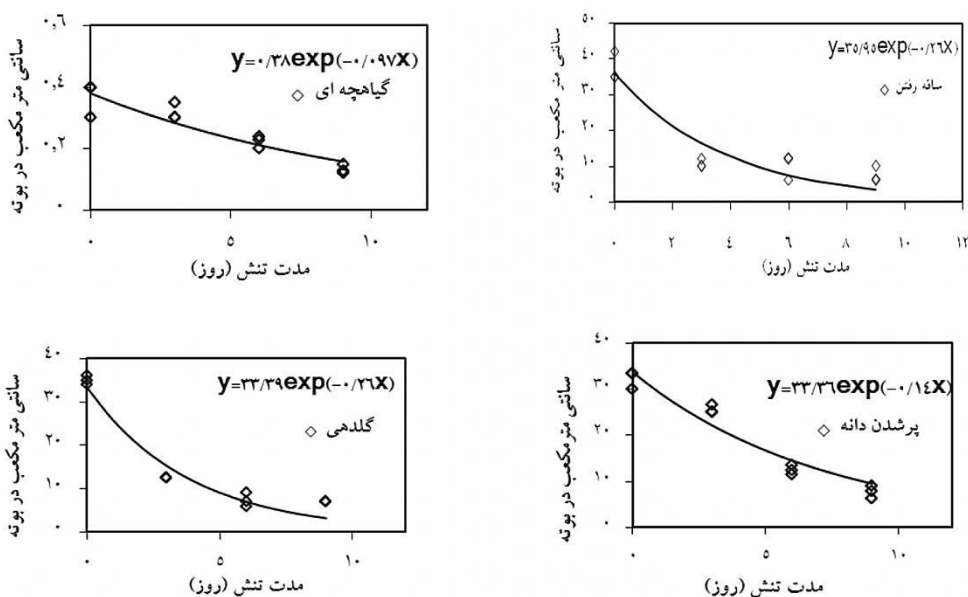
وزن خشک مربوط به تیمار ۹ روز غرقاب چهار مرحله نموی (۰/۰۲۶، ۱/۶، ۸/۴۴ و ۵/۰۱ گرم در بوته) بود. احتمال می‌رود گیاه بعد از اعمال تنش در مرحله گیاهچه‌ای و ساقه‌رفتن به دلیل ادامه رشد رویشی توانست اثرات تنش را کاهش دهد، در مرحله گلدهی و پر شدن دانه به دلیل پایان رشد رویشی گیاه و نیز استفاده از ذخایر فتوسنتزی (موجود در ساقه) جهت برطرف نمودن اثرات تنش سبب کاهش وزن خشک ساقه گردید.



شکل ۴- اثر طول دوره غرقابی در مراحل مختلف نمو بر وزن خشک ساقه کلزا.

حجم ریشه: مقدار اولیه حجم ریشه در شروع تنش غرقاب چهار مرحله نموی گیاهچه‌ای، ساقه‌رفتن، گلدهی و پر شدن دانه به ترتیب ۰/۳۸، ۳۵/۹۵، ۳۳/۳۹ و ۳۳/۳۶ سانتی‌متر مکعب در بوته و سرعت نسبی کاهش نیز ۰/۰۹۷، -۰/۲۶، -۰/۲۶ و -۰/۱۴ در روز بود (شکل ۵). حداکثر حجم ریشه در شاهد هر مرحله نموی و حداقل آن در ۹ روز غرقاب هر مرحله نموی مشاهده گردید. صدمه حاصل از تنش غرقابی به مرحله گلدهی و پر شدن دانه بالا بود چون در مرحله گلدهی و پر شدن دانه، رشد رویشی گیاه پایان یافته و نیز به دلیل تشکیل اندام‌های جدید در این دو مرحله و نیاز بالاتر به جذب

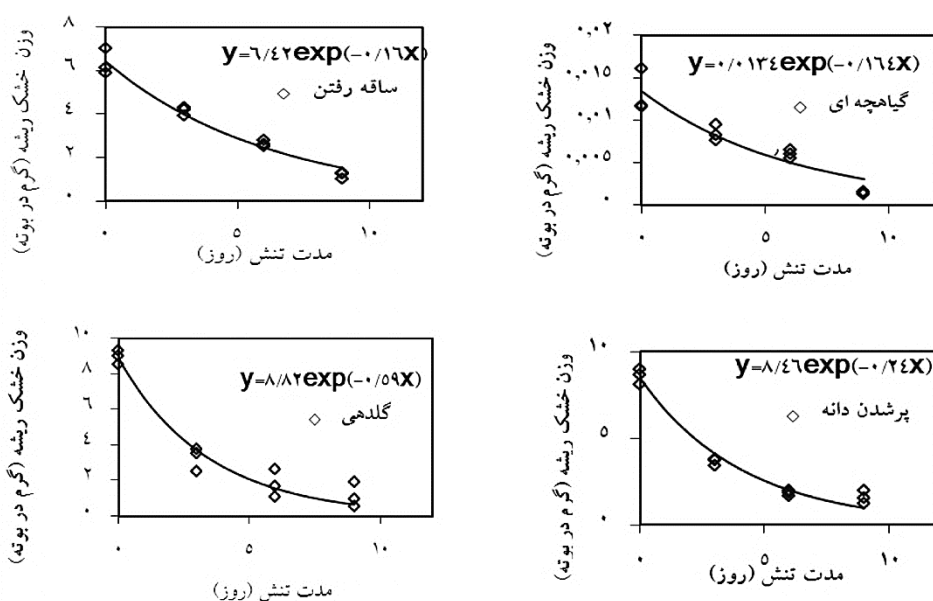
آب و مواد غذایی از طریق ریشه‌ها به احتمال زیاد سبب تشدید اثرات تنش گردیده است. گنجعلی و همکاران (۲۰۰۸) نیز اظهار داشتند خصوصیات بستر اثر معنی‌داری در توزیع ریشه در پروفیل خاک دارد و بالا بودن حجم ریشه از طریق افزایش سطح تماس آن با بستر کاشت برای جذب آب و عناصر غذایی اهمیت قابل توجهی دارد.



شکل ۵- اثر طول دوره غرقابی در مراحل مختلف نمو بر حجم ریشه کلزا.

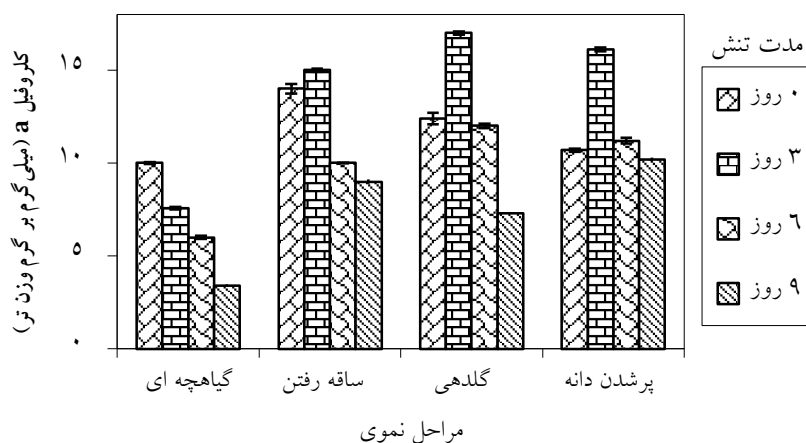
وزن خشک ریشه: برای بیان تغییرات وزن خشک ریشه نیز از معادله زوال کاهشی استفاده گردید. بیشترین میزان وزن خشک ریشه مربوط به تیمار شاهد در هر چهار مرحله نموی گیاهچه‌ای، ساقه‌رفتن، گلدهی و پرشدن دانه به ترتیب ۰/۰۰۶، ۶/۱۵، ۹/۲۱ و ۸/۴ گرم در بوته و کمترین میزان وزن خشک ریشه مربوط به تیمار ۹ روز غرقاب ۰/۰۰۱، ۱/۰۲، ۱/۱۳ و ۱/۶ گرم در بوته بود (شکل ۶). مقدار وزن خشک ریشه در آغاز تنش غرقاب چهار مرحله نموی به ترتیب ۰/۰۱۳۴، ۶/۴۲، ۸/۸۲ و ۸/۴۶ گرم در بوته و سرعت نسبی کاهش نیز ۰/۱۶۴، ۰/۱۶، ۰/۲۹ و ۰/۲۴ در روز بود. کاهش وزن خشک ریشه تحت تنش غرقابی توسط محققان (گنجعلی و همکاران، ۲۰۰۸؛ قبادی و همکاران،

۲۰۰۵؛ پالتا و همکاران، ۲۰۱۰) گزارش شده است. شاید مهم‌ترین تأثیر تنش غرقابی، افزایش تنفس بی‌هوازی است که کارایی آن بسیار کمتر از تنفس هوازی است (تولید ۳۶ مولکول ATP در تنفس هوازی در مقابل ۲ مولکول در تنفس بی‌هوازی). احتمال می‌رود که دلیل کاهش وزن خشک ریشه (شکل ۶) در مرحله گلدهی و پرشدن دانه به دلیل پایان رشد رویشی، تشکیل اندام‌های جدید نظیر گل و غلاف و نیاز زیاد این اندام‌ها به تأمین انرژی و مصرف ترکیبات ذخیره‌ای ریشه می‌باشد. در این شرایط به جهت تأمین انرژی‌های موردنیاز بافت به سرعت از کربوهیدرات تخلیه و بنابراین گرسنگی ناشی از کمبود کربوهیدرات در ریشه حادث می‌شود (جکسون و ریچارد، ۲۰۰۳). با گذشت زمان گرسنگی، نیاز به کربوهیدرات در ریشه به تدریج افزایش بیشتری پیدا می‌کند، زیرا تولید کربوهیدرات در برگ و انتقال آن به ریشه کاهش می‌یابد، در این شرایط حجم و وزن خشک ریشه به شدت کاهش و در صورت تداوم دوره تنش ممکن است ریشه از بین برود (ویزر و ویسنگ، ۲۰۰۴).



شکل ۶- اثر طول دوره غرقابی در مراحل مختلف نمو بر وزن خشک ریشه کلزا.

کلروفیل a: بر اساس نتایج تجزیه واریانس (جدول ۳) اثر متقابل بین مراحل نموی و مدت‌های مختلف تنش غرقابی بر کلروفیل a در سطح یک درصد معنی‌دار بود. با افزایش سطوح غرقاب میزان کلروفیل a در هر چهار مرحله‌ی نموی روند کاهشی را نشان داد (شکل ۷). این روند در مرحله گیاهچه‌ای و در ۳، ۶ و ۹ روز غرقاب به‌ترتیب ۰/۸۵، ۰/۵۹ و ۰/۵۳ برابر نسبت به شاهد، در مرحله ساقه‌رفتن ۰/۸۶، ۰/۶۷ و ۰/۴۹ برابر نسبت به شاهد، در مرحله گلدهی ۰/۹۱، ۰/۶۴ و ۰/۳۹ برابر نسبت به شاهد و در مرحله پر شدن دانه ۰/۹، ۰/۶۳ و ۰/۵۷ برابر نسبت به شاهد بود.



شکل ۷- اثر طول دوره غرقابی در مراحل مختلف نمو بر میزان کلروفیل a کلزا.

جدول ۲- تجزیه واریانس کلروفیل a، کلروفیل b و حداکثر عملکرد کوانتومی PSII

| میانگین مربعات | | | | منبع تغییرات | |
|----------------------|------------------------|-----------|-----------|--------------|---------------------|
| PSII | حداکثر عملکرد کوانتومی | کلروفیل b | کلروفیل a | | |
| | | | df | | |
| ۰/۰۰۲۴* | | ۵۹/۹۸** | ۵۱/۴** | ۳ | مرحله‌ی نموی |
| ۰/۰۷۴** | | ۱۲۴/۴** | ۱۴۸** | ۳ | مدت تنش |
| ۰/۰۰۰۶ ^{ns} | | ۲/۶** | ۱۳/۳۸** | ۹ | مرحله نمو * مدت تنش |
| ۰/۰۰۰۰۵۷ | | ۰/۲۳ | ۴/۱۷ | ۳۲ | خطای آزمایش |
| ۱۵/۵ | | ۵/۳ | ۱۵/۵ | | ضریب تغییرات (درصد) |

*، ** و ^{ns} به‌ترتیب معنی‌داری در سطح ۱ درصد، ۵ درصد و عدم معنی‌داری می‌باشد.

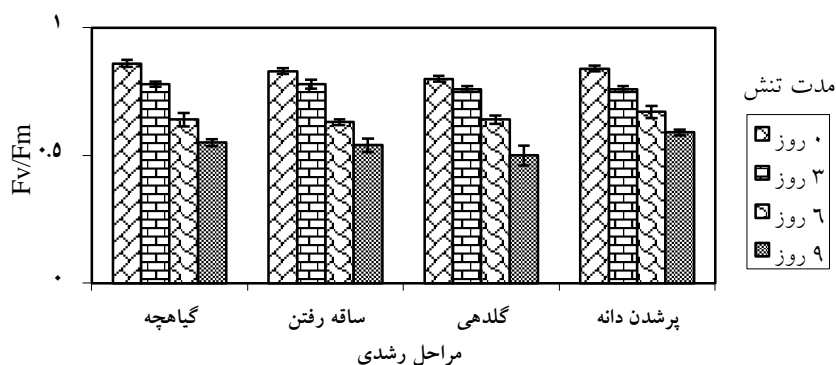
کلروفیل b: براساس نتایج تجزیه واریانس اثر متقابل بین مراحل نمو و مدت‌های مختلف تنش غرقابی بر میزان کلروفیل b تفاوت معنی‌داری وجود داشت (جدول ۳). میزان کلروفیل b در چهار مرحله نمو و سطوح مختلف تنش غرقابی روند کاهشی را نشان داد، این روند در مرحله گیاهچه‌ای و در مدت‌های (۳، ۶ و ۹ روز غرقاب) به ترتیب، ۰/۷، ۰/۵ و ۰/۴۵ برابر نسبت به شاهد، در مرحله ساقه‌رفتن ۰/۸۳، ۰/۶۸ و ۰/۵ برابر نسبت به شاهد، در مرحله گلدهی ۰/۸۲، ۰/۵۱ و ۰/۲۲ برابر نسبت به شاهد و در مرحله پر شدن دانه ۰/۶۹، ۰/۴۵ و ۰/۳۷ برابر نسبت به شاهد بود.



شکل ۸- اثر طول دوره غرقابی در مراحل مختلف نمو بر میزان کلروفیل b کلزا.

بررسی‌های متعددی (هانگ و همکاران، ۱۹۹۵؛ مک کولین و همکاران، ۱۹۹۵؛ ملک‌احمدی و همکاران، ۲۰۰۴؛ دان و همکاران، ۱۹۸۳) کاهش در محتوی کلروفیل را تحت تنش غرقابی گزارش نمودند. کاهش محتوی کلروفیلی (a و b) تحت تنش غرقابی ممکن است به دلیل آهسته‌تر شدن سنتز و یا شکسته شدن و تخریب سریع رنگیزه‌های کلروفیلی باشد. همچنین محققان فوق اظهار داشتند که تنش باعث ایجاد اختلالات متابولیکی در گیاه از طریق کاهش فعالیت آنزیم رویسکو، کاهش فسفوریلاسیون نوری، تغییر نسبت کلروفیل a به کلروفیل b در فتوسیستم II گردید و در نهایت میزان و سنتز مجدد کلروفیل کاهش یافت. تخریب کلروفیل b به‌عنوان یکی از اجزای ترکیبات دریافت‌کننده نور می‌باشد در نتیجه کاهش کلروفیل b، کارایی مراکز فتوشیمیایی به دلیل بازدارندگی نوری کاهش می‌یابد. کاهش کلروفیل b تحت شرایط غرقابی احتمالاً به شدت تحت تأثیر ترکیبات LHCII که دارای کلروفیل b در غشای تیلاکوئید می‌باشد قرار دارد (اشرف و رحمان، ۱۹۹۹).

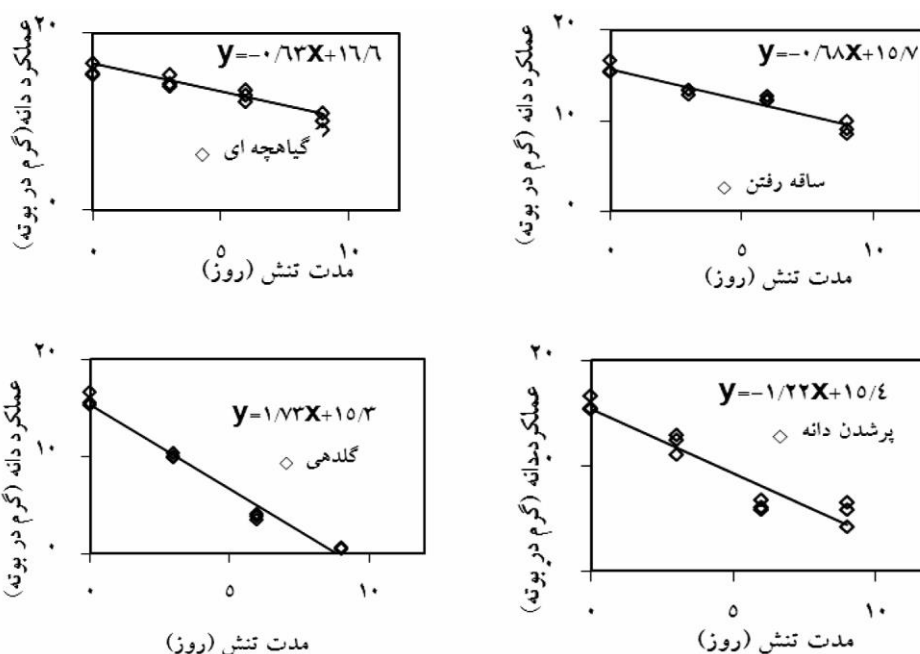
فلورسانس: حداکثر عملکرد کوانتومی فتوسیستم در چهار مرحله نموی و سطوح مختلف تنش غرقابی روند کاهشی را نشان داد (شکل ۹). بالاترین حداکثر عملکرد کوانتومی فتوسیستم II در تیمار شاهد (۰/۸۳) و کمترین آن در تیمار ۹ روز غرقاب مرحله‌ی گلدهی (۰/۵۹) مشاهده گردید. کاهش مقدار F_m به احتمال زیاد به علت تحت تأثیر قرار گرفتن احیای کوپنین است که علت این امر هم به تجمع یون‌ها برمی‌گردد. کاهش حداکثر عملکرد کوانتومی در فتوسیستم II احتمالاً در اثر بازدارندگی نوری فتوسیستم II (اشرف و رحمان، ۱۹۹۹) و نیز کاهش میزان کلروفیل (شکل ۷ و ۸) است. احتمال می‌رود که کاهش بیشتر در حداکثر عملکرد کوانتومی فتوسیستم II در مرحله گلدهی به دلیل تخریب بالاتر آن در این مرحله باشد.



شکل ۹- اثر طول دوره غرقابی در مراحل مختلف نمو بر میزان f_v/f_m کلزا.

عملکرد دانه: برای نشان دادن روند تغییرات عملکرد دانه از معادله خطی استفاده گردید. میزان عملکرد دانه در آغاز تنش غرقاب چهار مرحله نموی به ترتیب ۱۶/۶، ۱۵/۷، ۱۵/۳ و ۱۵/۴ گرم در بوته و شیب کاهش وزن هزار دانه ۰/۶۳، ۰/۶، ۱/۷۳- و ۱/۲۲- در روز بود. بیشترین شیب کاهش در مرحله گلدهی (۱/۷۳- در روز) و کمترین میزان سرعت نسبی کاهش در مرحله ساقه‌رفتن (۰/۶- در روز) به‌دست آمد. بالاترین میزان عملکرد در تیمار شاهد و کمترین میزان عملکرد در تیمار ۹ روز غرقاب مرحله گلدهی و پر شدن دانه به‌دست آمد (شکل ۱۰). تنش غرقابی احتمالاً از طریق تأثیر بر تعداد خورجین، تعداد دانه در خورجین، وزن دانه و مدت پر شدن دانه (داده‌ها نشان داده نشد) باعث کاهش عملکرد کلزا می‌گردد. شدت این کاهش در مرحله گلدهی احتمالاً به دلیل سقط شدن و ریزش گل و در

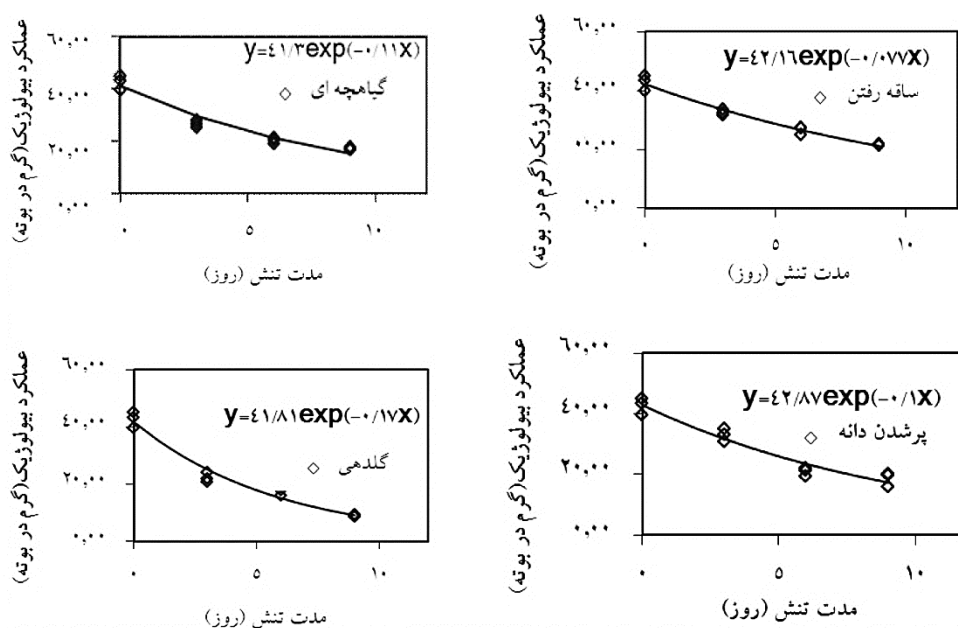
مرحله پر شدن دانه به دلیل سقط شدن، ریزش، تسریع در زوال خورجین‌ها و کاهش مدت پر شدن دانه بیشتر باشد. افیونی و محلوجی (۲۰۰۵) نیز گزارش نمودند که دوره پر شدن دانه و تعداد سنبله در مترمربع بالاترین همبستگی را با عملکرد دارند در این آزمایش، تنش غرقابی سبب تسریع در رسیدگی و کوتاه شدن مدت پر شدن دانه در مرحله گلدهی و پر شدن دانه (۱۰ روز) نسبت به ۲ مرحله دیگر گردید. کاهش عملکرد در بوته با افزایش سطح غرقابی توسط محققان دیگری نیز گزارش شده است (مسگریو و دینگ، ۱۹۹۸؛ بنگ و همکاران، ۲۰۰۴؛ پالتا و همکاران، ۲۰۱۰).



شکل ۱۰- اثر طول دوره غرقابی در مراحل مختلف نمو بر عملکرد دانه کلزا.

عملکرد زیست‌توده: روند تغییرات عملکرد زیست‌توده نیز از معادله زوال کاهشی تبعیت می‌کرد. مقدار اولیه عملکرد زیست‌توده در شروع تنش غرقاب در مراحل گیاهچه‌ای، ساقه‌رفتن، گلدهی و پر شدن دانه به ترتیب ۴۱/۳، ۴۲/۱۶، ۴۱/۸۱ و ۴۲/۸۷ و سرعت نسبی کاهش عملکرد زیست‌توده ۰/۱۱، ۰/۰۷۷، ۰/۱۷ و ۰/۱۱- در روز بود. سرعت نسبی کاهش عملکرد زیست‌توده در مرحله

گلدهی و پر شدن دانه بیشتر از مرحله گیاهچه‌ای و ساقه‌رفتن بود (شکل ۱۱). حساسیت بالای عملکرد زیست‌توده به تنش غرقاب در مرحله گلدهی و پر شدن دانه به احتمال زیاد به دلیل بالا بودن میزان کاهش وزن خشک برگ (شکل ۲)، وزن خشک ساقه (شکل ۴)، تعداد و وزن خشک خورجین‌ها و وزن دانه تحت اثر تنش غرقاب می‌باشد که کاهش عملکرد زیست‌توده را در پی خواهد داشت.



شکل ۱۱- اثر طول دوره غرقابی در مراحل مختلف نمو بر عملکرد زیست‌توده.

نتیجه‌گیری کلی

تنش غرقابی موقت، سطح برگ، زیست‌توده اندام هوایی و ریشه را کاهش داد. تنفس بی‌هوازی و مصرف سریع کربوهیدرات‌های موجود در ساقه و ریشه، کاهش میزان کلروفیل، زرد شدن و ریزش برگ‌ها در شرایط غرقابی، احتمالاً از مهم‌ترین دلایل کاهش زیست‌توده اندام هوایی می‌باشد. با طولانی شدن مدت‌های تنش غرقاب در هر چهار مرحله نمو شدت کاهش زیست‌توده اندام هوایی و ریشه بیشتر بود. بیشترین میزان کاهش عملکرد زیست‌توده و دانه نیز در چهار مرحله نمو (گیاهچه‌ای،

ساقه رفتن، گلدهی و پرشدن دانه) و مدت‌های (۰، ۳، ۶ و ۹ روز) غرقابی در مرحله گلدهی و پر شدن دانه و مدت‌های ۶ و ۹ روز غرقابی مشاهده گردید. شدت این کاهش در مرحله گلدهی به دلیل سقط شدن و ریزش گل و در مرحله پر شدن دانه به دلیل سقط شدن، ریزش، تسریع در زوال خورجین‌ها و کاهش مدت پرشدن دانه بیشتر بود. تنش در زمان گلدهی و پرشدن دانه سبب کاهش تعداد خورجین‌های بارور و موجب اختلال در حرکت مولد فتوسنتزی به دانه، در نتیجه کاهش وزن هزار دانه و افزایش دانه‌های پوک و در نهایت کاهش عملکرد گردید. به این ترتیب می‌توان از نقش مؤثر تعبیه زهکش در اراضی به‌ویژه برای این دو مرحله حساس به تنش غرقاب بهره جست.

منابع

1. Afioni, D., and Mahlughy, M. 2005. Correlation analysis of some agronomic traits in wheat genotypes in salinity. *Seed Plant J.* 22: 199-186.
2. Ahmed, S., Nawata, E., Hosokawa, M., Domae, Y., and Sakuratani, T. 2002. Alterations in photosynthesis and some antioxidant enzymatic activities of mungbean subjected to waterlogging. *Plant Sci.* 163: 117-123.
3. Anonymous, 2010. Agricultural Statistics. Ministry of Jihad- e- Agriculture, 256p.
4. Ardakani, M., and Nadvar, A. 2008. Basic and Matode of application for Botany Science proficient. Tehran University Press. 140p. (In Persian)
5. Arnon, D.I. 1949. Copper enzymes in isolated chloroplasts: poly phenol oxidase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiol*, Rockville, 24: 1-24.
6. Ashraf, M., and Rehman, H. 1999. Interactive effects of nitrate and long-term waterlogging on growth, water relations, and gaseous exchange properties of maize (*Zea mays* L.). *Plant Sci.* 144: 35- 43
7. Bange, M.P., Milroy, S.P., and Thongbai, P. 2004. Growth and yield of cotton in response to waterlogging. *Field Crops Res.* 88: 129-142.
8. Belford, R.K., Cannell, R.Q., Thomson, R.J., and Dennis, C.W. 1980. Effects of water logging at different stages of development on the growth and yield of pea (*Pisum sativum* L.). *J. Sci. Food Agric.* 31:857-869.
9. Broue, P., Marshaall, D.R., and Munday, J. 1976. The response of lupins to water logging. *Aust. J. Exp. Agric. Animal. Husbandry.* 16: 549-554.
10. Dickin, E., Wright, D. 2003. The effects of winter waterlogging and summer drought on the growth and yield of winter wheat (*Triticum aestivum* L.). *Eur. J. Agron.* 28: 234-244.
11. Dong, J.G., Yu, Z.W., and Yu, S.W. 1983. Effect of increased ethylene production during different periods on the resistance of wheat plants to waterlogging. *Acta Phto Physiol.* 9: 383-389.

12. Evans, J. 1982. Symbiosis, nitrogen and dry matter distribution in chickpea (*Cicerarietinum*L.). *Exp. Agric.* 18: 339-351.
13. Ganjali, A., and Palta., T.N. 2008. Flooding effects on root and shoot growth of pea genotypes (*Cicerarietinum* L.). *J. Agric. Sci. Natur. Res.* 15(3): 353-343. (In Persian)
14. Ghobadi, M.A., Nadian, H., Bakhshande, A.S., Fathi, G.H., Ghryyna, M.H., and Ghobadi, M. 2005. Root growth, biological yield and grain yield in wheat genotypes in flooded conditions at different growth stages. *Seedlings Seeds.* 22(4): 525-513. (In Persian)
15. Griffin, J.L., and Saxton, A.M. 1988. Response of solid- seeded soybean to flood irrigation II Flood duration. *Agro. J.* 80: 885-888.
16. Huang, B., Nesmith, D.S., Bridges, D.C., and Johnson, J.W. 1995. Responses of squash to salinity, waterlogging and subsequent drainage: I. Gas exchange, water relations, and nitrogen status. *J. Plant Nut.* 18:127-140.
17. Jackson, M.B., and Richard, B. 2003. *Physiology, biochemistry and molecular biology of plant root systems subjected to flooding of the soil root ecology.* Springer Verlag, Berlin. 260: 93-213
18. Issarakraisila, M., Ma, Q., and Turner, D.W. 2007. Potosynthetic and growth responses of juvenile Chinese Kale (*Brassica oleracea* var. alboglabra) and Caisin (*Brassica rapa* subsp. Parachinensis) to waterlogging and water deficit. *Sci. Hort.* 111: 107-13.
19. Krishnamurthy, L., and Serraj, R. 2003. Root and shoot growth dynamics of some chickpea genotypes under two moisture levels. *International Chickpea and Pigeonpea News letters.* 10: 24-28.
20. Malekhamadi, F., Kalantari, Kh.M., and Torkzadeh, M. 2004. The effect of flooding stress on induction of oxidative stress and concentration of mineral element in pepper (*capsicum annum* L.) plants. *Biol. J.* 18:110-119.
21. Malik, A., Colmer, T.D., Lambers, H., and Schortemyer, M. 2001. Changes in physiological and morphological traits of roots and shoots of wheat in response to different depths of waterlogging. *Aust. J. Plant Physiol:* 28: 1121-1131.
22. McKevlin, M.R., Hook, D.D., and McKee, J.W.H. 1995. Growth and nutrient use efficiency of water tupelo seedlings in flooded and well-drained soil. *Tree Physiol.* 15: 753-758.
23. Musgrave, M.E., and Ding, N. 1998. Evaluation wheat cultivars for waterlogging tolerance. *Crop Sci.* 38: 90-97.
24. Palta, J.A., Ganjeali, A., Turner, N.C., and Siddique, K.H.M. 2010. Effects of transient subsurface waterlogging on root growth, biomass and yield of chickpea. *Agric Water Manag.* 97: 1469-1476.
25. Sairam, R.K., Dharmar, K., Chinnusamy, V., and Meena, R. 2009. Waterlogging induced increase in sugar mobilization, fermentation, and related

- gene xpression in the roots of mungbean (*Vigna radiata* L.). J. Plant Physiol. 166: 602-616.
26. Sylvester-Bradley, R. 1985. Revision of a code for stages of development in oilseed rape (*Brassica napus* L.) aspects appl. Biol. Field Method Data Hand. 10: 395-400.
27. Soltani, A. 2004. Chlorophyll fluorescence and application. Internal Press. University of Agricultural Science and Natural Resource, Gorgan, Iran.
28. Soltani, A. 2007. Application of SAS in Statistical Analysis., Jihad Daneshgahi of press Mashhad University. 182p.
29. Visser, E.J.W., and Voeselek, L.A.C.J. 2004. Acclimation to soil flooding sensing and signal-transduction. Plant Soil. 244: 197-214.
30. Zhou, W., and Lin, X. 1995. Effects of waterlogging at different growth stages on physiological characteristics and seed yield of winter rape (*Brassica napus* L.). Field Crops. Res. 44: 103-110.



Gorgan University of Agricultural
Sciences and Natural Resources
J. of Plant Prod. Res. Vol. 21 (1), 2014
<http://jopp.gau.ac.ir>

Investigation of waterlogging stress on some morphologic and physiological traits of rapeseed in different developmental stages

***S.F. Rasouli¹, S. Galeshi², H. Pirdashti³ and E. Zeinali²**

¹M.Sc Graduate, Dept. of Agronomy, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, ²Professor, Dept. of Agronomy, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, ³Associate Prof., Dept. of Agronomy, Sari University of Agricultural Sciences and Natural Resources, ⁴Assistant Prof., Dept. of Agronomy, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources

Received: 2013-1-27 ; Accepted: 2014-4-13

Abstract

In order to investigation of waterlogging stress effects on morphological and physiological traits of rapeseed (*Brassica napus* L.) in different developmental stages, a pot experiment was conducted at Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, during 2010-2011. The experiment design was completely randomized with factorial arrangement and three replications. Examined factors were developmental stage (seedling, stem elongation, flowering and grain filling) and duration of waterlogging stress (0, 3, 6 and 9 days). Leaf area, leaf dry matter, shoot high and shoot dry matter, root volume and root dry matter, chlorophyll fluorescence, chlorophyll content and grain yield were measured. An exponential decay and linear models were fitted to quantify waterlogging stress on morphological traits and yield. Waterlogging conditions decreased leaf area and leaf dry matter, then leaf senescence occurred and fall down it So, plant less biomass transmit in to the shoot and root, then, shoot high and shoot dry matter, root volume, root dry matter, F_v/F_m , chlorophyll content and finally grain yield decreased. Maximum slope of grain yield reduction (-1.73 per day) observed in the flowering stage while the lowest was recorded at stem elongation (-0.6 per day). Control plants had the highest yield (5.1 g per plant) while imposing 9 days waterlogging either flowering or grain filling stages (0.18 and 1.4 g per plant, respectively) decreased the seed yield. Generally, results of the present research indicated that in order to damage of vegetative organs and their lack of proper functioning rather than control markedly decreased seed yield of rapeseed throughout four developmental stages.

*Corresponding author; f.rasouli88@yahoo.com

