تنش‌های محیطی در علوم زراعی
Environmental Stresses in Crop Sciences

مجله تنش‌های محیطی در علوم زراعی
جلد پنجم، شماره اول، نیمه اول ۹۱
۵۴-۴۱

# بررسی تأثیر اسید سالیسیلیک بر فعالیت آنزیم‌ها و ترکیبات آنتی اکسیدان ارقام نخود (*Cicer arietinum* L.) در مواجهه با تنش خشکی

مریم شوریابی[1*]، علی گنجعلی[2]، پروانه ابریشم چی[2]

۱. دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه فردوسی مشهد؛
۲. اعضای هیات علمی، گروه زیست شناسی ،دانشکده علوم پایه، دانشگاه فردوسی مشهد

تاریخ دریافت: ۹۰/۹/۱؛ تاریخ پذیرش: ۹۱/۷/۱۶

## چکیده

**اسید سالیسیلیک (SA) به عنوان یک تنظیم کننده‌ی رشد گیاهی در تخفیف آسیب‌های اکسیداتیو ناشی از تنش خشکی در سلول‌های گیاهی نقش مهمی به عهده دارد. به منظور بررسی تأثیر سطوح مختلف SA بر میزان پروتئین‌های محلول، فعالیت عوامل آنتی اکسیدان آنزیمی و غیر آنزیمی شامل آنزیم‌های پراکسیداز، سوپر اکسید دیسموتاز، آسکوربات پراکسیداز، اسید آسکوربیک و همچنین میزان پراکسید هیدروژن و مالون دی آلدئید و برخی از صفات فیزیولوژیکی دو رقم نخود شامل جم ( MCC361 ) و کاکا (MCC414)، آزمایشی با سه غلظت SA (صفر، ۰/۵ و ۱ میلی مولار) و دو سطح آبیاری کاهش یافته ( ۲۵٪ ظرفیت زراعی) و بدون تنش (ظرفیت زراعی کامل)، به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار در شرایط کنترل شده انجام شد. ۱۵، ۲۵ و ۳۵ روز بعد از کاشت، گیاهان با محلول اسید سالیسیلیک (۰/۵ و ۱ میلی مولار) و آب مقطر (به عنوان شاهد) بر روی برگ‌ها، اسپری شدند. نتایج حاصل از آزمایش نشان داد در شرایط ۲۵٪ ظرفیت زراعی، در هر دو ژنوتیپ تنها میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز افزایش پیدا کرد. تنش خشکی پایداری غشاء و کارآیی فتوسیستم II را کاهش داد. SA تنها در ژنوتیپ MCC414 و در شرایط ۲۵٪ ظرفیت زراعی، باعث افزایش میزان پراکسید هیدروژن و مالون دی آلدئید شد و فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدان شامل پراکسیداز، سوپر اکسید دیسموتاز را در این ژنوتیپ و فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز را در هر دو ژنوتیپ MCC414 و MCC361 به صورت معنی داری افزایش داد. SA تأثیر معنی داری بر اسید آسکوربیک نداشت ($P\leq ۰/۰۵$). در شرایط ۲۵٪ ظرفیت زراعی، SA در غلظت‌های ۰/۵ و ۱ میلی مولار توانست موجب بهبود شاخص پایداری غشاء شود و با کاهش فلورسانس کلروفیل، کارآیی فتوسیستم II را افزایش دهد.**

***واژه‌های کلیدی:*** **آسکوربات پراکسیداز، پراکسیداز، سوپر اکسید دیسموتاز، شاخص پایداری غشاء و کارآیی فتوسیستم II**

## مقدمه

نخود (*Cicer arietinum* L.)، یکی از اولین بقولات دانه-ای است که در دنیای قدیم اهلی شده و در حال حاضر در ۴۸ کشور جهان با سطحی بیش از ۱۱ میلیون هکتار و تولیدی بیش از هشت میلیون تن کشت می‌شود (FAO, 2010). با توجه به جایگاه این محصول در سبد تغذیه خانوار و تأثیر آن بر اقتصاد کشاورزی، پژوهش‌های بسیاری در زمینه تأثیر انواع تنش‌های زیستی و غیر زیستی بر رشد و محصول دهی این گیاه صورت گرفته است. در بر اساس مطالعات انجام شده، از بین عوامل مختلف ایجاد کننده‌ی تنش، خشکی به تنهایی عملکرد گیاه نخود را تا ۴۵٪ کاهش می‌دهد. کاهش میزان آب تا ۳۰ و ۵۰ درصد ظرفیت زراعی خاک موجب کاهش فتوسنتز در مراحل گل-دهی و پر شدن دانه در گیاه نخود می‌گردد (Allen, 1995).

کاهش رشد از علائم بارز گیاه در مواجه با تنش خشکی است. در شرایط تنش خشکی، پتانسیل آب برگ و فشار

نگارنده پاسخگو: مریم شوریابی. آدرس: مشهد- دانشگاه فردوسی مشهد- دانشکده کشاورزی. پست الکترونیک: hamraz1211@gmail.com

تورژسانس سلولی که لازمه رشد سلول‌ها و بافت گیاه می‌باشد، کاهش پیدا می‌کند. تنش‌های شدید خشکی باعث ممانعت از فتوسنتز، اختلال در متابولیسم، انتقال مواد و در نهایت منجر به مرگ گیاه می‌شوند (Jaleel et al., 2007).

تنش خشکی از توسعه‌ی سلول و به دنبال آن رشد و افزایش ارتفاع گیاه ممانعت می‌کند. فرو تنظیمی ژن‌هایی[1] که در توسعه‌ی دیواره‌ی سلولی نقشی دارند، توانایی سلول‌ها را برای توسعه کاهش می‌دهد که این مطلب با کاهش توانایی رشد گیاه تحت شرایط تنش، مطابقت دارد (Ghassemian et al., 2008). تأثیر خشکی بر رشد، به شدت و مدت زمان تنش، گونه‌ی گیاهی و مرحله‌ی رشد گیاه بستگی دارد (Jaleel et al., 2009). تنش خشکی موجب القاء تنش اکسیداتیو در گیاهان شده که نتیجه آن افزایش ترکیبات ROS می‌باشد. در این شرایط فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدان مانند SOD، پراکسیداز و کاتالاز افزایش می‌یابد (Hayat and Ahmad, 2007).

یکی از ترکیباتی که در ایجاد تحمل و مقاومت در برابر تنش خشکی در گیاه مؤثر است، ترکیب شبه هورمونی اسید سالیسیلیک (Salicylic acid) است. اسید سالیسیلیک (SA)، یک ترکیب فنلی گیاهی است که به عنوان یک هورمون گیاهی و تنظیم کننده‌ی رشد شناخته شده و نقش آن در ارتباط با مکانیسم‌های دفاعی در برابر عوامل استرس‌زای زیستی و غیر زیستی به خوبی مشخص شده است (Hayat and Ahmad, 2007). نتایج حاصل از تحقیقات متعدد نقش مهم SA را در تنظیم پاسخ گیاه به تنش خشکی نشان داده است. سناراتنا و همکاران (Senaratna et al., 2000) با تأکید بر نقش سیستم آنتی اکسیدان در فرایند خنثی‌سازی اثرات تنش اکسیداتیو ناشی از خشکی، سرما و گرما در دو گیاه لوبیا و گوجه فرنگی، نشان دادند که به کار بردن SA به صورت خارجی در شرایط تنش، فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدان از جمله سوپر اکسید دیسموتاز و پراکسیداز را بهبود می‌بخشد. یک تحقیق مشابه نیز افزایش فعالیت این دو آنزیم را تحت تنش سرما در گیاه ذرت را گزارش کرد (Janda et al., 2001). همچنین در گیاه نخود، تحت تنش گرما، استفاده از SA با غلظت ۰/۱ میلی مولار، تأثیر این ماده در افزایش فعالیت پراکسیداز و آسکوربات پراکسیداز را اثبات کرد (Tongden and Chakraborty, 2005). در آزمایش دیگری، نشان داده شد در گیاه چمن (*Poa pratensis* L.) فعالیت SOD و کاتالاز، بعد از تیمارSA با غلظت‌های مختلف (صفر، ۰/۲۵، ۱/۵ میلی مولار) افزایش می‌یابد (He et al., 2005). از طرف دیگر، یاردانووا و پوپووا (Yordanova and Popova, 2003) بیان کردند استفاده از SA به همراه سرما، باعث افزایش فعالیت SOD و APX می‌شود و تأثیری بر فعالیت پراکسیداز ندارد. همچنین مشخص شده است پیش تیمار گیاه گوجه فرنگی با محلول SA، از طریق افزایش آنزیم‌های آنتی اکسیدان از جمله APX، آسیب‌های تنش اکسیداتیو ناشی از شوری را بهبود می‌بخشد (Tari et al., 2004, Szepesi et al., 2005). در گزارش مشابه، الطیب (El Tayeb, 2005) نشان داد خیساندن دانه های جو در محلول یک میلی مولار SA قبل از کشت، منجر به افزایش فعالیت آنزیم پراکسیداز در این گیاهان می‌شود. بنابراین اعتقاد بر این است که SA می‌تواند به عنوان یک تنظیم کننده‌ی بالقوه برای بهبود رشد در شرایط کمبود آب، مورد استفاده قرار گیرد.

با توجه به موارد فوق، مطالعه حاضر با هدف بررسی تأثیر اسید سالیسیلیک بر میزان و فعالیت عوامل آنتی اکسیدانی آنزیمی و غیر آنزیمی و بهبود تحمل به خشکی ارقام نخود انجام شد.

## مواد و روش‌ها

### روش کاشت گیاهان در گلدان، اعمال تیمارها و نمونه‌برداری

این آزمایش در پژوهشکده علوم گیاهی دانشگاه فردوسی مشهد در سال ۱۳۸۸ صورت گرفت. به این منظور، بذرهای دو رقم نخود شامل کاکا (MCC414) از تیپ دسی و جم (MCC361) از تیپ کابلی که به صورت رایج در کشور کشت و از ارقام تجاری محسوب می‌شوند از بانک بذر پژوهشکده‌ی علوم گیاهی دانشگاه فردوسی مشهد تهیه شدند. هر گلدان به عنوان یک واحد آزمایشی در نظر گرفته شد که با خاک مزرعه و ماسه به نسبت ۲ به ۱ پر شدند. بذرهای هم اندازه، سالم و عاری از هر گونه بیماری در گلدان‌های پلاستیکی با قطر دهانه‌ی ۳۰ سانتی متر کاشته شدند و سپس در اتاقک رشد با رطوبت نسبی ۵۵-۶۵ درصد و شدت نور حدوداً ۴۰۰۰۰ لوکس در شرایط کنترل شده قرار گرفتند (جدول ۱).

---

[1]. Down-regulated genes

**جدول ۱. شرایط کنترل شده اتاقک رشد**

**Table1. Controlled conditions of growth chamber .**

| | شب (Night) | | روز (day) | |
|---|---|---|---|---|
| | ماه اول 1st month | ماه دوم 2nd month | ماه اول 1st month | ماه دوم 2nd month |
| درجه حرارت (سانتی‌گراد) Temperature (ºC) | ۲۱ | ۲۷ | ۸ | ۱۲ |
| روشنایی/تاریکی(ساعت) Light/Dark (hours) | ۱۲/۵ | ۱۳ | ۱۱/۵ | ۱۱ |

پنج عدد بذر در هر گلدان کاشت شدند. دو رژیم رطوبتی (ظرفیت زراعی و ۲۵ درصد ظرفیت زراعی)، بر اساس درصد رطوبت وزنی مطابق روش گنجعلی و کافی (Ganjeali and Kafi, 2007) ایجاد شدند و از طریق توزین روزانه‌ی گلدان‌ها و تأمین کسری رطوبت مورد نظر، میزان رطوبت گلدان‌ها در طول دوره‌ی رشد به طور ثابت حفظ شد.

پس از اطمینان از سبز شدن، گلدان‌ها به سه گیاه تقریباً یکسان، تنک شدند. گیاهان هر ۴ هفته یک‌بار با محلول غذایی هوگلند آبیاری شدند. ۱۵، ۲۵ و ۳۵ روز بعد از کاشت، گیاهان با محلول اسید سالیسیلیک (۰/۵ و ۱ میلی مولار) و آب مقطر (به عنوان شاهد) بر روی برگ‌ها اسپری شدند، به اندازه ای که محلول از انتهای برگ‌ها جاری شد. این تیمار با فواصل ۱۰ روز و در مجموع سه بار انجام شد. ۱۰ روز پس از آخرین تیمار، با ظاهر شدن گل‌ها روی گیاهان (دوره گلدهی)، گلدان‌ها تخریب و گیاهان به دو بخش ریشه و اندام هوایی تقسیم شدند. برگ‌ها پس از توزین و ثبت شماره‌ی برگ به صورت جداگانه در فریزر ۷۰- درجه سانتی‌گراد برای بررسی‌های بیوشیمیایی نگهداری شدند.

نشت الکترولیت‌ها از غشاء به وسیله دستگاه EC متر (مدل Jenway) اندازه گیری شد و شاخص پایداری غشاء سلول از روش سایرام و همکاران (Sairam et al., 2001) بدست آمد. برای اندازه‌گیری میزان کارآیی فتوسیستم II (Fv/Fm)، از دستگاه fluormeter مدل OS5-FI و از سه برگچه انتهایی هر گیاه استفاده شد. پروتئین‌های محلول (سیتوپلاسمی) با کمک اسپکتروفتومتر و به روش Lowry اصلاح شده (Lowry et al., 1951)، اندازه گیری شد. فعالیت آنزیم پراکسیداز طبق روش هویل (Hoyle, 1972) محاسبه شد. همچنین برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز از روش رییس و گیانوپولیتیس (Giannopolitis and Ries, 1997) استفاده شد. فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز مطابق روش آریگونی و همکاران (Arrigoni et al., 1992) اندازه‌گیری شد. سنجش پراکسید هیدروژن با استفاده از روش ولیکووا و همکاران (Velikova et al., 2000) انجام شد. میزان پراکسیداسیون لیپیدهای غشاء با استفاده از روش ژائو و همکاران (Zaho et al., 1994) سنجش شد. سنجش اسید آسکوربیک طبق روش موخرجی و چودهوری (Mukherjee and Choudhuri, 1983) صورت گرفت.

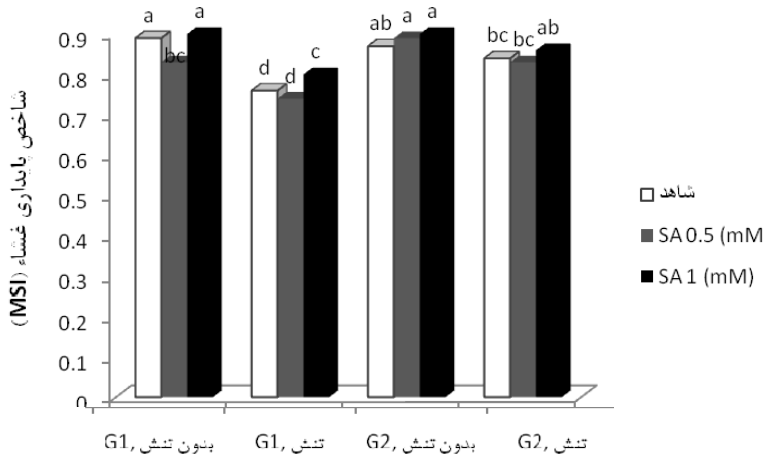
آزمایش به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار در شرایط کنترل شده انجام شد. برای پردازش داده‌ها و مقایسه میانگین‌ها از نرم افزارهای رایانه-ای JMP و Mstat-C و برای رسم نمودارها از نرم افزار Excel استفاده شد. تجزیه و تحلیل واریانس و مقایسه میانگین داده‌ها توسط آزمون دانکن ($P\leq ۰/۰۵$) انجام شد.

## نتایج

تنش خشکی در هر دو ژنوتیپ باعث کاهش شاخص پایداری غشاء شد. محلول‌پاشی SA (۱ میلی مولار) در تنش خشکی، میزان شاخص پایداری غشاء را در ژنوتیپ MCC414 نسبت به شاهد، به صورت معنی داری افزایش داد (شکل ۱) .

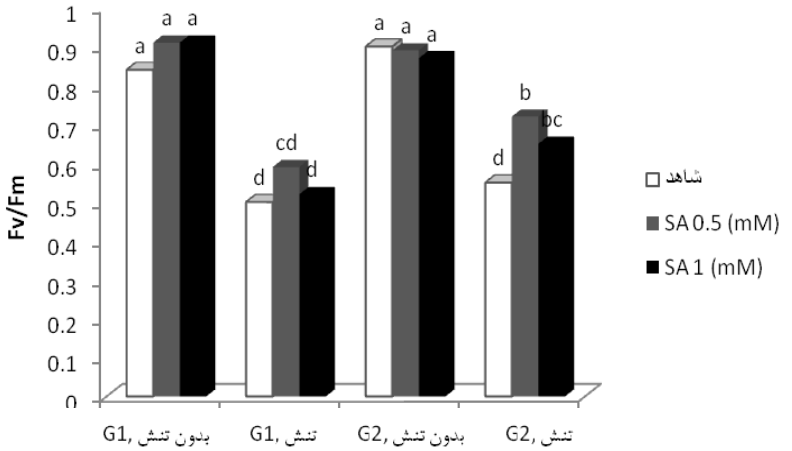
در این مطالعه کارآیی فتوسیستم II در شرایط تنش در هر دو رقم به صورت معنی داری کاهش یافت ولی این کاهش در ژنوتیپ MCC414 به صورت معنی‌داری بیشتر از رقمMCC361 بود. در رقم MCC361 کاربرد خارجی اسید سالیسیلیک در هر دو غلظت در شرایط تنش، کارآیی فتوسیستم II را بهبود بخشید (شکل ۲).

نتایج این تحقیق نشان داد در شرایط بدون تنش، استفاده از SA با غلظت ۰/۵ میلی مولار نسبت به شاهد، مقدار پروتئین‌های محلول برگ را به طور معنی‌داری (به میزان ۲۶ درصد) در رقم MCC414 افزایش داد (۰/۰۵ ≥P). تیمار SA با غلظت‌های ۰/۵ و ۱ میلی مولار در رقم MCC361 و در شرایط بدون تنش، به طور متوسط پروتئین‌های محلول برگی را نسبت به شاهد (بدون مصرف SA) ۴۹/۵ درصد افزایش داد. در شرایط ۲۵٪ ظرفیت زراعی، کاربرد خارجی SA تأثیر معنی‌داری بر پروتئین‌های محلول برگی نداشت (شکل ۳).



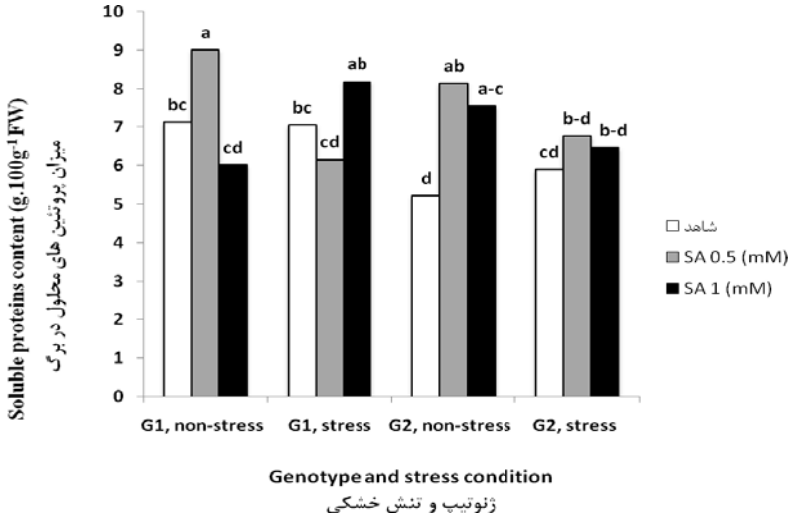

**شکل ۱. اثر اسید سالیسیلیک، رقم و تنش خشکی بر شاخص پایداری غشای ارقام نخود (G2= MCC361 و G1= MCC414). ستون‌های دارای حرف یا حروف مشترک از لحاظ آماری تفاوت معنی داری ندارند (۰/۰۵ ≥P).**

**Fig 2. Effect of salicylic acid, cultivar and drought stress on membrane stability index chickpea cultivars, (G2= MCC361 and G1=MCC414). Values labeled with the same letter(s) are not different at the 5% significance level.**




**شکل ۲. اثر اسید سالیسیلیک، رقم و تنش خشکی بر کارایی فتوسیستم II، در دو رقم نخود (G2= MCC361 و G1=MCC414). ستون‌های دارای حرف یا حروف مشترک از لحاظ آماری تفاوت معنی داری ندارند (۰/۰۵ ≥P).**

**Fig.2. Effect of salicylic acid, cultivar and drought stress on PSII photochemical efficiency chickpea cultivars, (G2= MCC361 and G1=MCC414). Values labeled with the same letter are not different at the 5% significance level.**




**شکل ۳. مقایسه‌ی تأثیر متقابل اسید سالیسیلیک، رقم و تنش خشکی بر میزان پروتئین‌های محلول برگی، در دو رقم نخود (G2= MCC361 و G1= MCC414). ستون‌های دارای حرف یا حروف مشترک از لحاظ آماری تفاوت معنی داری ندارند (P≤ ۰/۰۵).**

**Fig 3. Effect of salicylic acid, cultivar and drought stress on soluble proteins content in two chickpea cultivars, (G2= MCC361 and G1=MCC414). Values labeled with the same letter(s) are not different at the 5% significance level**

تنش خشکی فعالیت آنزیم پراکسیداز را در هر دو رقم MCC414 و MCC361 به ترتیب به میزان ۲۳/۲ و ۲۲/۶ درصد افزایش داد (P≤ ۰/۰۵). تیمار SA با غلظت ۱ میلی مولار در رقم MCC414 فعالیت ویژه‌ی آنزیم پراکسیداز را به طور قابل توجهی (۶۰ درصد) افزایش داد (P≤ ۰/۰۵)، اما در رقم MCC361 تأثیر معنی‌داری بر فعالیت این آنزیم نداشت (شکل ۴).

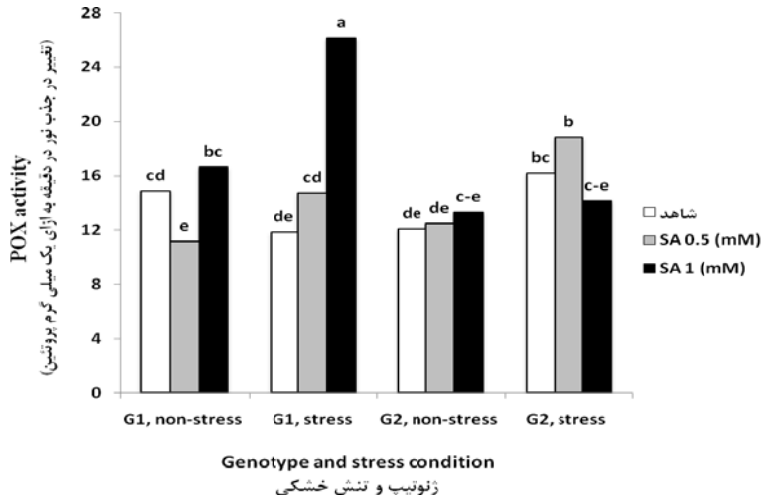
بررسی اثر متقابل SA و خشکی مؤید آن است که در رقم MCC414 در شرایط بدون تنش، SA با غلظت ۰/۵ میلی مولار نسبت به شاهد فعالیت ویژه‌ی آنزیم پراکسیداز را به صورت معنی‌داری کاهش داد (P≤ ۰/۰۱). در صورتی که در این ژنوتیپ و در شرایط ۲۵٪ ظرفیت زراعی، SA با غلظت ۱ میلی مولار توانست به طور قابل توجهی (۲/۲ برابر) فعالیت این آنزیم را افزایش دهد (P≤ ۰/۰۵). در هر دو شرایط آبیاری کاربرد SA تأثیر معنی‌داری بر فعالیت ویژه‌ی آنزیم پراکسیداز در رقمMCC361 نداشت (P ≤۰/۰۵) (شکل ۴).

نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که برهم‌کنش خشکی، اسید سالیسیلیک و رقم تأثیر معنی-داری بر میزان فعالیت آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز دارند. در شرایط بدون تنش و در رقم MCC361، SA با غلظت ۰/۵ میلی مولار نسبت به شاهد (بدون مصرف SA) به طور معنی‌داری به میزان ۴۲ درصد فعالیت آنزیم SOD را در برگ کاهش داد (P≤ ۰/۰۵)، در صورتی که در شرایط ۲۵٪ ظرفیت زراعی و در رقم MCC414، غلظت ۱ میلی مولار SA در مقایسه با شاهد به صورت قابل توجهی (۴۲/۲ درصد) باعث افزایش فعالیت SOD شد (P≤ ۰/۰۵). در این شرایط در رقم MCC361، تیمار SA تأثیر معنی داری بر فعالیت این آنزیم نداشت (شکل ۵).

برهم‌کنش خشکی، اسید سالیسیلیک و رقم تأثیر معنی‌داری بر میزان فعالیت APX نداشت. نتایج حاصل از مقایسه میانگین مشاهدات در شرایط بدون تنش نشان داد که اسید سالیسیلیک با غلظت ۰/۵ میلی مولار در رقم MCC414، باعث افزایش قابل توجهی در میزان فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز برگ شد (P≤ ۰/۰۵). حال آن که در این شرایط در رقم MCC361، تیمار SA با غلظت یک میلی مولار به صورت معنی‌داری فعالیت APX را به میزان ۳/۸ برابر کاهش و در مقابل در شرایط تنش، تیمار SA با غلظت‌های ۰/۵ و یک میلی مولار در ژنوتیپ MCC414، فعالیت آنزیم APX را به طور چشمگیری (۴ برابر) افزایش داد. در مورد رقمMCC361 نیز نتیجه مشابه‌ای مشاهده شد، به طوری که در این رقم SA با غلظت ۰/۵ میلی مولار نسبت به شاهد در شرایط تنش،

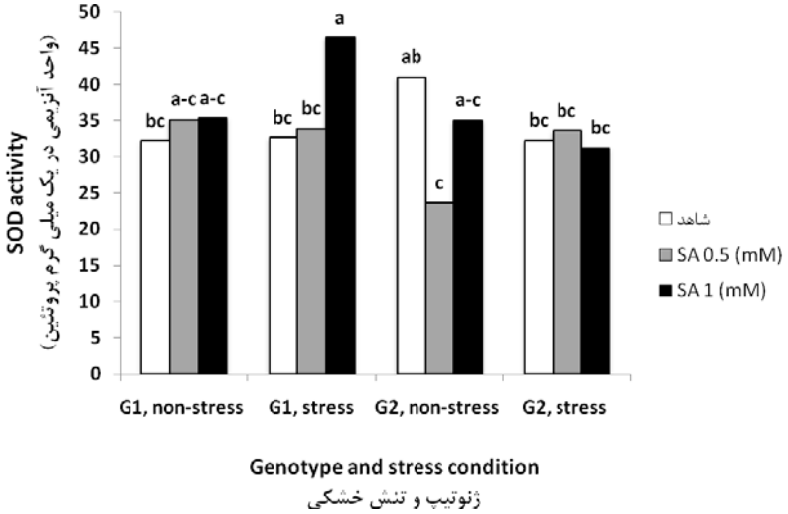
باعث افزایش ۳/۳ برابری فعالیت ویژه‌ی آنزیم APX شد (P≤ ۰/۰۵) (شکل ۶).

در شرایط ۲۵٪ ظرفیت زراعی میزان $H_2O_2$ در ژنوتیپ MCC414 در مقایسه با رقم MCC361 به صورت معنی-داری به میزان ۱۵/۶ درصد افزایش یافت. نتایج حاصل از مقایسه‌ی میانگین داده‌ها، نشان داد استفاده از SA با غلظت یک میلی مولار، میزان پراکسید هیدروژن را در رقم MCC414 به صورت معنی‌داری نسبت به رقم MCC361 افزایش داد (P≤ ۰/۰۵). تفاوت معنی‌داری میان ارقام در تیمار شاهد وجود نداشت (شکل ۷).




**شکل ۴. اثر اسید سالیسیلیک، رقم و تنش خشکی بر میزان فعالیت ویژه‌ی آنزیم پراکسیداز برگ، در دو رقم نخود (G2= MCC361 و G1= MCC414). ستون‌های دارای حرف یا حروف مشترک از لحاظ آماری تفاوت معنی‌داری ندارند (P≤ ۰/۰۵).**

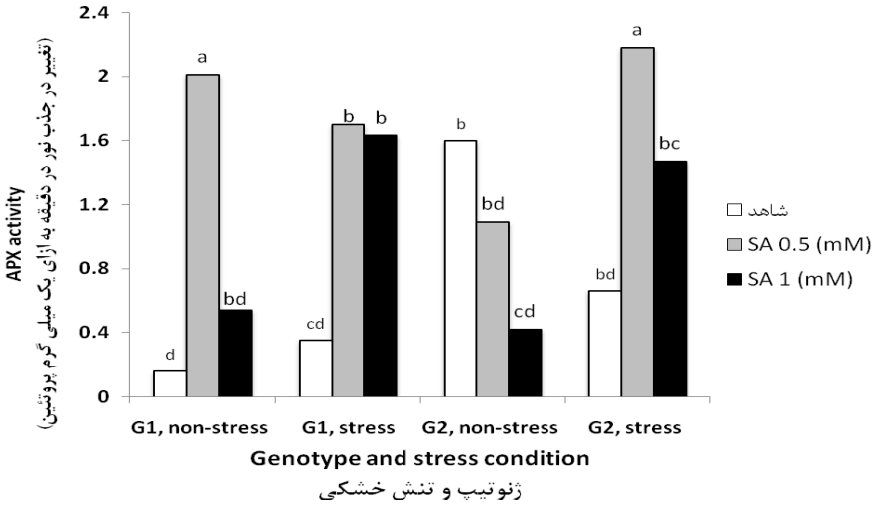
**Fig 4. Effect of salicylic acid, cultivar and drought stress on peroxidase enzyme in two chickpea cultivars, (G2= MCC361 and G1=MCC414). Values labeled with the same letter(s) are not different at the 5% significance level**




**شکل ۵. اثر اسید سالیسیلیک، رقم و تنش خشکی بر میزان فعالیت آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز در برگ، در دو رقم نخود (G2= MCC361 و G1= MCC414). ستون‌های دارای حرف یا حروف مشترک از لحاظ آماری تفاوت معنی داری ندارند (P≤ ۰/۰۵).**

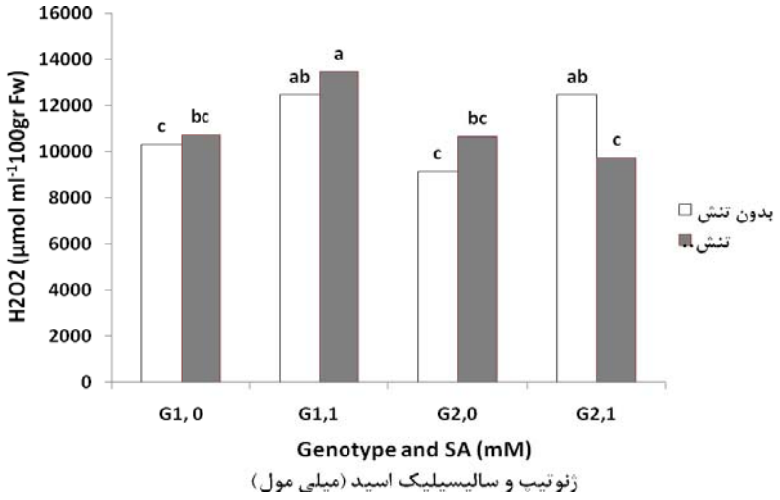
**Fig 5. Effect of salicylic acid, cultivar and drought stress on the activity of superoxide dismutase enzyme chickpea cultivars, (G2= MCC361 and G1=MCC414). Values labeled with the same letter (s) are not different at the 5% significance level.**

بررسی اثر متقابل SA و تنش خشکی مؤید آن است که در شرایط بدون تنش، SA با غلظت یک میلی مولار میزان $H_2O_2$ را به طور معنی‌داری در هر دو رقم MCC414 و MCC361 به ترتیب به میزان ۲۱ و ۳۶/۵ درصد افزایش داد (P≤ ۰/۰۵). در شرایط ۲۵٪ ظرفیت زراعی SA با غلظت ۱ میلی مولار موجب افزایش ۲۵ درصدی $H_2O_2$ در ژنوتیپ MCC414 شد (شکل ۷).




**شکل ۶. اثر اسید سالیسیلیک، رقم و تنش خشکی بر میزان فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز برگ، در دو ژنوتیپ نخود (G2= MCC361 و G1= MCC414). ستون‌های دارای حرف یا حروف مشترک از لحاظ آماری تفاوت معنی داری ندارند (P≤ ۰/۰۵).**

**Fig 6. Effect of salicylic acid, cultivar and drought stress on the activity of ascorbate peroxidase enzyme in two chickpea cultivars, (G2= MCC361 and G1=MCC414). Values labeled with the same letter(s) are not different at the 5% significance level.**




**شکل ۷. اثر غلظت‌های صفر و یک میلی مولار اسید سالیسیلیک و تنش خشکی بر میزان پراکسید هیدروژن برگ در دو ژنوتیپ نخود (G2= MCC361 و G1= MCC414). ستون‌های دارای حرف یا حروف مشترک از لحاظ آماری تفاوت معنی داری ندارند (P≤ ۰/۰۵).**

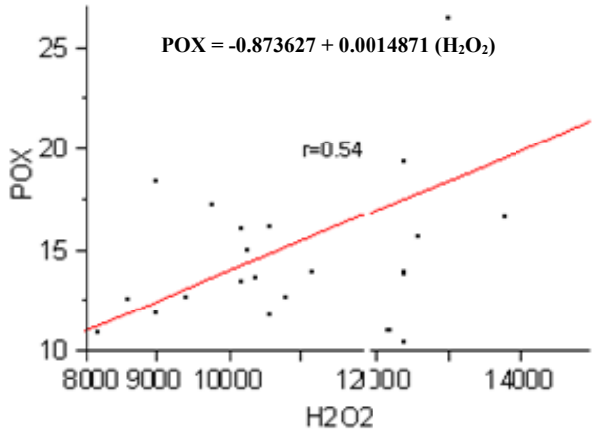
**Fig 7. Effect of salicylic acid, cultivar and drought stress on hydrogen peroxide content in chickpea cultivars, (G2= MCC361 and G1=MCC414). Values labeled with the same letter(s) are not different at the 5% significance level**

در ایـــن آزمـــایش همبســـتگی مثبـــت و معنـــی‌داری (r=۰/۵۴) بـــین میـــزان $H_2O_2$ و فعالیـــت ویـــژه‌ی آنـــزیم پراکسیداز وجود داشت (P≤ ۰/۰۵) (شکل ۸).

در آنالیز اثر متقابل هر سه فاکتور SA، تنش خشکی و رقم، مشاهده شد که تحت تنش خشکی، SA با غلظت ۱ میلی مولار تنها در ژنوتیپ MCC414 میزان MDA را به صورت قابل ملاحظه‌ای (۲/۳ برابر) افزایش داد (P≤ ۰/۰۵) (شکل ۹).

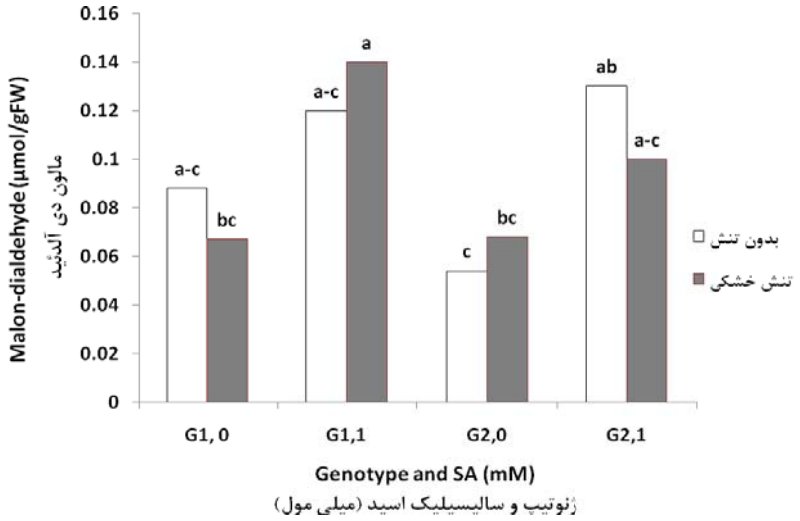
اثر متقابل تنش خشکی و SA، در هیچ یک از دو رقم MCC414 و MCC361، بر میزان اسید آسکوربیک معنی‌دار نبود (P≤ ۰/۰۵) (شکل ۱۰).

همبستگی منفی و معنی‌داری بین میزان اسید آسکوربیک و $H_2O_2$ مشاهده شد (r=۰/۵۷). بنابراین افزایش پراکسید هیدروژن با کاهش میزان اسید آسکوربیک مرتبط است (شکل ۱۱).



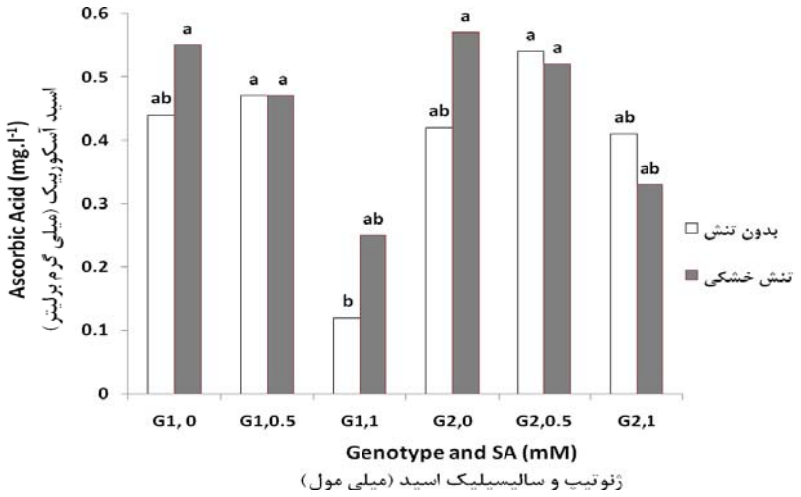

**شکل ۸. همبستگی میان آنزیم پراکسیداز و پراکسید هیدروژن ($H_2O_2$) .**

**Fig 8. Correlation between peroxidase enzyme and hydrogen peroxide.**



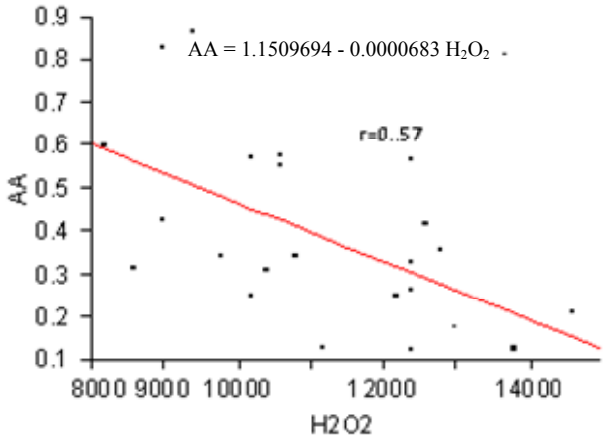

**شکل ۹. اثر اسید سالیسیلیک، رقم و تنش خشکی بر میزان مالون دی آلدئید برگ، در دو ژنوتیپ نخود (MCC361 =G2 و MCC414 =G1). ستون‌های دارای حرف یا حروف مشترک از لحاظ آماری تفاوت معنی داری ندارند (P≤ ۰/۰۵).**

**Fig 9. Effect of salicylic acid, cultivar and drought stress on malon-dialdehyde content in chickpea cultivars, (G2= MCC361 and G1=MCC414). Values labeled with the same letter(s) are not different at the 5% significance level**




**شکل ۱۰. مقایسه‌ی تأثیر سطوح مختلف اسید سالیسیلیک بر میزان اسید آسکوربیک برگ، در دو ژنوتیپ نخود (G2= MCC361 و G1= MCC414). ستون‌های دارای حرف یا حروف مشترک از لحاظ آماری تفاوت معنی داری ندارند (P≤ ۰/۰۵).**

**Fig.9. Effect of salicylic acid, cultivar and drought stress on ascorbic acid content in two chickpea cultivars, (G2= MCC361and G1=MCC414). Values labeled with the same letter(s) are not different at the 5% significance level.**




**شکل ۱۱. همبستگی میان اسید آسکوربیک (AA) و پراکسید هیدروژن ($H_2O_2$)**

**Fig 11. Correlation between peroxides enzyme and hydrogen peroxide.**

## بحث

نتایج حاکی از کاهش شاخص پایداری غشاء در هر دو رقم در شرایط ۲۵٪ ظرفیت زراعی است. در تأیید نتایج فوق، پژوهش مشابه‌ای نیز گزارش کرد که تنش خشکی سبب کاهش شاخص پایداری غشاء در ارقام مقاوم و حساس به خشکی گندم شد (Borzoi et al., 2006). سایرام و ساکسنا (Sairam and Saxena, 2000) در گندم افزایش پراکسیداسیون چربی‌ها و کاهش شاخص پایداری غشاء را در شرایط تنش خشکی مشاهده کردند. مطالعه‌ی دیگر محققین نیز نشان داد تنش شوری سبب افزایش نفوذ پذیری غشاء در گیاه هویج شد (Eraslan et al., 2007).

در تحقیق حاضر، SA در شرایط تنش خشکی موجب بهبود شاخص پایداری غشاء در رقم MCC414 شد. نتایج مطالعات مشابه نشان می‌دهد که SA در شرایط تنش،

پایداری غشاء را افزایش داده و از نشت الکترولیت‌ها ممانعت نموده است. برای مثال، حیات و احمد (Hayat and Ahmad, 2007) نشان دادند پیش تیمار گیاهان گندم با SA، گیاه را در برابر آسیب‌های ناشی از شوری محافظت و نشت الکترولیت‌ها را به صورت معنی‌داری کاهش داد.

کارآیی فتوسیستم II که با اندازه‌گیری نسبت Fv/Fm سنجیده می‌شود، به عنوان یک شاخص مهم در ارزیابی میزان تحمل گونه‌های مختلف گیاهی به تنش خشکی مطرح است (Kiani et al., 2008). کاهش نسبت Fv/Fm در شرایط تنش خشکی در هر دو ژنوتیپ به دلیل آسیب پروتئین D1 موجود در فتوسیستمII (Lu and Zhang, 1998)، اختلال در فعالیت آن و نهایتاً افزایش فلورسانس کلروفیل می‌باشد (Ahmed et al., 2002). تنش خشکی علاوه بر تغییر میزان اسیمیلاسیون $CO_2$ و تعرق، از طریق تخریب ساختار فتوسیستم II و افزایش میزان فلورسانس کلروفیل، بر عملکرد گیاه مؤثر واقع می‌شود (Dulai et al., 2006). در شرایط تنش خشکی، تجمع کوئینون B غیر احیاء افزایش یافته که نشانه عدم انتقال الکترون از کوئینون A احیاء به کوئینون B می‌باشد. در چنین شرایطی، تجمع کوئینون A احیاء نیز افزایش می‌یابد. علت این امر هنوز به طور کامل مشخص نیست، ولی احتمال می‌رود کاهش اسیمیلاسیون $CO_2$ به دلیل بسته شدن روزنه‌ها و متعاقب آن، عدم مصرف محصولات حاصل از زنجیره انتقال الکترون (ATP، NADPH) و افزایش میزان فرودوکسین احیاء شده علت آن باشد. به دنبال افزایش فرودوکسین احیاء شده، تولید رادیکال‌های واکنش گر نظیر آنیون سوپر اکسید، افزایش یافته و از این طریق تغییر و یا تخریب پروتئین‌های غشاء تیلاکوئید صورت می‌گیرد که با ممانعت از انتقال الکترون از جایگاه پذیرنده فتوسیستم II، موجب کاهش سرعت انتقال الکترون، افزایش فلورسانس کلروفیل، کاهش نسبت Fv/Fm و کاهش عملکرد فتوسیستم II می‌شود (Piper et al., 2007).

کاهش بیشتر عملکرد فتوسیستم II در رقم MCC414 در مقایسه با رقم MCC361، نشانه حساسیت بیشتر این رقم به تنش خشکی است. وسیم (Waseem, 2006) گزارش کرد که نسبت Fv/Fm در گیاهان گندم مواجه با تنش خشکی، کاهش یافت. در یک مطالعه روی لوبیا کاهش مقدار Fv/Fm در شرایط تنش خشکی نیز گزارش شده است (Cronic and Briantais, 1991).

در این بررسی کاربرد خارجی اسید سالیسیلیک در شرایط تنش تأثیر مثبتی بر کارآیی فتوسیستم II در رقم MCC361 داشت. نتایج تحقیق مشابه‌ای نشان داد که در گیاه گوجه فرنگی تحت تنش خشکی ناشی از پلی اتیلن گلایکول، SA با غلظت‌های $۱۰^{-۴}$ و $۱۰^{-۷}$ مولار، موجب افزایش نسبت Fv/Fm شد (Szepesi et al., 2005). برخی منابع عدم تأثیر تیمار SA بر نسبت Fv/Fm را تایید نمودند، در این رابطه وسیم (Waseem, 2006) گزارش کرد در گیاه گندم با وجود بهبود مقدار Fv/Fm با کاربرد SA، اما این تأثیر معنی‌دار نبود.

این بررسی نشان داد تنش خشکی اثر معنی‌داری بر میزان مالون دی آلدئید نداشت. در آزمایشی مشابه، عدم تجمع مالون دی آلدئید در شرایط تنش خشکی در گیاهچه های آفتابگردان گزارش شده است (Quartacci and Navarri-Izzo,1992). در این رابطه در یک بررسی روی دو گونه حساس و مقاوم به خشکی ذرت، مشخص شد که در گونه‌ی حساس، مالون دی آلدئید به صورت معنی‌داری افزایش یافت (Janda et al., 1997).

در شرایط ۲۵٪ ظرفیت زراعی، استفاده از SA تنها در رقم MCC414 موجب افزایش میزان مالون دی آلدئید شد، در صورتی که در رقم MCC361 تأثیری بر تولید مالون دی آلدئید نداشت (شکل ۹). عدم تغییرات قابل توجه در میزان مالون دی آلدئید و اثر تحریکی SA بر فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدان و نهایتاً رشد گیاهان گندم در شرایط تنش خشکی نیز گزارش شده است (Hayat and Ahmad, 2007).

در بررسی حاضر، تنش خشکی تأثیر معنی‌داری بر میزان پروتئین‌های محلول برگ نداشت. سنتز پروتئین یک فرایند متابولیکی اساسی است که موجب بهبود تحمل به خشکی گیاه می‌شود. تنش خشکی از طریق افزایش تجمع پروتئین‌ها، موجب سازگاری فیزیولوژیکی در شرایط تنش خشکی می‌شود (Hayat and Ahmad, 2007)، از طرفی در شرایط تنش خشکی افزایش پروتئولیز و کاهش سنتز پروتئین و نهایتاً کاهش پروتئین‌های محلول در گیاه گزارش شده است (Farooq et al., 2009).

در مطالعه حاضر، SA اگر چه توأم با تنش خشکی، تأثیر قابل ملاحظه‌ای بر میزان پروتئین‌های محلول نداشت،

اما کاربرد این ماده در شرایط بدون تنش، به صورت معنی-داری سبب افزایش میزان پروتئین‌های محلول رقم MCC361 شد. برخی محققین نشان دادند در گیاه نخود، تیمار SA (غلظت ۰/۱ میلی مولار) در شرایط بدون تنش، میزان پروتئین و فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدان را نسبت به شاهد افزایش داد (Chakraborty and Tongden, 2005).

شواهد موجود حاکی از آن است که تنش خشکی با القاء تنش اکسیداتیو در گیاهان موجب افزایش ترکیبات ROS می‌شود. در این شرایط فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدان مانند SOD، پراکسیداز و کاتالاز افزایش می‌یابد (Hayat and Ahmad, 2007). در این آزمایش تیمار SA (یک میلی مولار) در رقم MCC414 در شرایط ۲۵٪ ظرفیت زراعی موجب افزایش قابل توجهی در فعالیت آنزیم پراکسیداز شد. کاربرد خارجی SA با غلظت یک میلی مولار به همراه تنش خشکی، میزان فعالیت آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز را در رقم MCC414 افزایش داد. همچنین تیمار SA فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز را در هر دو رقم و در شرایط ۲۵٪ ظرفیت زراعی افزایش داد.

در پژوهشی بر روی دو گیاه لوبیا و گوجه فرنگی مشاهده شد که کاربرد خارجی SA در شرایط تنش، فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدان از جمله سوپر اکسید دیسموتاز و پراکسیداز را افزایش داد (Senaratna et al., 2000). در تحقیق مشابه افزایش فعالیت این دو آنزیم تحت تنش سرما در گیاه ذرت گزارش شده است (Janda et al., 1999). در یک مطالعه روی گیاه نخود، کاربرد خارجی SA در شرایط تنش گرما، موجب افزایش فعالیت پراکسیداز و آسکوربات پراکسیداز شد (Chakraborty and Tongden, 2005). گزارش‌ها مؤید آن است که SA از طریق تجمع موقتی ABA، فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدان را کنترل می‌کند (Hayat and Ahmad, 2007).

در این بررسی در رقم MCC414، تنش خشکی محتوای $H_2O_2$ موجود در برگ‌ها را به صورت معنی‌داری افزایش داد. بررسی‌ها مؤید این است که در شرایط تنش، به دلیل عدم تعادل بین تولید و حذف ROS، میزان این ترکیبات افزایش می‌یابد. در یک تحقیق در شرایط تنش خشکی و در پی افزایش میزان ABA، افزایش تولید $H_2O_2$ در گیاه ذرت گزارش شد (Guan et al., 2000).

گزارش‌های مختلف حاکی از آن است که $H_2O_2$ به عنوان مولکول پیام رسان عمل می‌کند و آبشار واکنش‌های حفاظتی را در گیاهان در مقابله با تنش به راه می‌اندازند (Wang et al., 2007). از جمله اینکه پراکسید هیدروژن موجب فعال شدن کانال‌های کلسیمی می‌شود. یکی از مکانیسم‌های عمل اسید سالیسیلیک، افزایش پراکسید هیدروژن می‌باشد که به دنبال آن دیگر مسیرهای پاسخ به تنش خشکی به راه می‌افتند (Hayat and Ahmad, 2007). در بررسی حاضر در رقم MCC414، کاربرد اسید سالیسیلیک (۱ میلی مولار) در شرایط ۲۵٪ ظرفیت زراعی، مقدار $H_2O_2$ را به طور مشخصی افزایش داد، حال آن که در رقم MCC361، SA تغییر معنی‌داری در میزان $H_2O_2$ ایجاد نکرد.

در این مطالعه SA در شرایط ۲۵٪ ظرفیت زراعی، تأثیر معنی داری بر مقدار اسید آسکوربیک نداشت، گرچه گزارش‌هایی وجود دارد که SA در شرایط تنش شوری و خشکی، میزان آسکوربات را در برخی از گیاهان افزایش داده است (Idrees et al., 2011).

## سپاسگزاری

با تشکر از پژوهشکده‌ی علوم گیاهی دانشگاه فردوسی مشهد و آزمایشگاه فیزیولوژی گیاهی دانشکده‌ی علوم پایه دانشگاه فردوسی مشهد که امکانات لازم جهت انجام این طرح را در اختیار ما قرار دادند.

**منابع**

Ahmed, S., Nawata, E, Hosokawa, M., Domae, Y., Sakuratani, T., 2002. Alterations in photosynthesis and some antioxidant enzymatic activities of mungbean subjected to waterlogging. Plant Sci. 163, 117-123.

Allen, R.D., 1995. Dissection of oxidative stress tolerance using transgenic plants. Plant Physiol. 57, 1049-1054.

Arrigoni, O., Gara, L., Tommasi, F., Liso, R., 1992. Changes in ascorbate system during seed development of *Vicia faba*. Plant Physiol. 99, 235-238.

Borzoi, A., Khazai, H., Shahriyari, F., 2006. Effect of drought stress after pollination on the physiological properties and antioxidants content in different cultivars of wheat (*Triticum aestivum* L.) under greenhouse conditions. J. Agric. Sci. Technol. 20, 1-7. [In Persian with English Summary].

Chakraborty, U., Tongden, C., 2005. Evaluation of heat acclimation and salicylic acid treatments as potent inducers of thermotolerance in *Cicer arietinum* L. Current Sci. 89, 384-389.

Cronic, G., Briantais, J.M., 1991. Partitioning of photosynthetic electron flow between $CO_2$ and $O_2$ reduction in a $C_3$ leaf (*Phaseolus vulgaris* L.) at different $CO_2$ concenrtations and during water stress, Planta, 183, 178-184.

Dulai, S., Molnár, I., Prónay, J., Csernák, Á., Tarnai, R., Molnár-Láng, M., 2006. Effects of drought on photosynthetic parameters and heat stability of PSII in wheat and in *Aegilops* species originating from dry habitats. Acta Biologica Szegediensis. 50,11-17.

El Tayeb, M.A., 2005. Response of barley grains to the interactive effect of salinity and salicylic acid, Plant Growth Regul., 45, 215-224.

Eraslan, F., Inal, A., Gunes, A., Alpaslan, M., 2007. Impact of exogenous salicylic acid on the growth, antioxidant activity and physiology of carrot plants subjected to combined salinity and boron toxicity. Sci. Horti. 113, 120–128.

FAO, 2010. FaoStatistics. From http://faostat3.fao.org

Farooq, M., Wahid, A., Kobayashi, N., Fujita, D., Basra, S.M.A., 2009. Plant drought stress: effects, mechanisms and management, Agron. Sustain. Dev. 29, 185–212.

Ganjeali, A., Kafi, M., 2007. Genotypic differences for allometric relationships between root and shoot characteristics in chickpea (*Cicer arietinum* L.). Pak. J. Bot. 39, 1523-1531.

Ghassemian, M., Lutes, J., Chang, H., Lange, I., Chen, W., Zhu, T., Wang, X., Lange, B.M., 2008. Abscisic acid-induced modulation of metabolic and redox control pathways in *Arabidopsis thaliana*. Phytochem. 69, 2899–2911.

Giannopolitis, C.N., Ries, S.K., 1997. Superoxid dismutase I. occurrence in higher plants. Plant Physiol. 59, 309-317.

Hayat, S., Ahmad, A., 2007. Salicylic Acid: A Plant Hormone. Springer. 97-99.

Hoyle, M.C. 1972. Indole acetic acid oxidase: a dual catalytic enzyme. Plant Physiol. 50, 15-18.

Idrees, M., Naeem, M., Tariq A., Masroor, M., Khan, A., 2011. Salicylic acid mitigates salinity stress by improving antioxidant defence system and enhances vincristine and vinblastine alkaloids production in periwinkle [*Catharanthus roseus* (L.) G. Don]. Acta Physiol Plant, 33, 987-999.

Jaleel, C.A., Manivannan, P., Kishorekumar, A., Sankar, B., Gopi, R., Somasundaram, R., Panneerselvam, R. 2007. Alterations in osmoregulation, antioxidant enzymes and indole alkaloid levels in *Catharanthus roseus* exposed to water deficit. Colloids Surf. B. 59, 150–157.

Jaleel, C.A., Manivannan, P., Wahid, A., Farooq, M., Somasundaram, R., Panneerselvam, R., 2009. Drought stress in plants: a review on morphological characteristics and pigments composition. Int. J. Agric. & Biol. Eng. 11, 100–105.

Janda, T., Szalai, G., Tari, I., Páldi, E., 1997. Exogenous salicylic acid has an effect on chilling symptoms in maize (*Zea mays* L.) plants. In: Crop development for cool and wet Europian climate. Brussels. Belgium, 179-187.

Janda, T., Szalai, G., Tari, I., Páldi, E., 1999. Hydroponic treatment with salicylic acid decreases the effect of chilling injury in maize (*Zea mays* L.) plants. Planta. 208, 175-180.

Kiani, S.P., Maury, P., Sarrafi, A., Grieu, P., 2008. QTL analysis of chlorophyll fluorescence parameters in sunflower (*Helianthus annuus* L.) under well-watered and water-stressed conditions. Plant Sci. 175, 565–573.

Lowry, O. H., Rosebrough, N.J. Rand, R.J., 1951. Protein measurement with the folinphenol reagent. J. Biol. Chem. 193, 265-275.

Lu, C., Zhang, J., 1998. Effects of water stress on photosynthesis, chlorophyll fluorescence and photoinhibitation in wheat plants. Aust. J. Plant Physiol. 25, 883-894.

Mukherjee, S.P., Choudhuri, M.A., 1983. Implication of water stress-induced changes in the levels of endogenous ascorbic acid and hydrogen peroxide in *Figna* seedlings. Plant Physiol. 58, 166–170.

Piper, F.I., Corcuera, L.J., Alberdi, M., Lusk, C., 2007. Differential photosynthetic and survival responses to soil drought in two evergreen Nothofagus species, INRA EDP Sciences, 64: 447-452.

Quartacci, M.F., Navarri-Izzo F., 1992. Water stress and free radical mediated changes in sunflower seedling. Plant Physiol. 139, 621-625.

Sairam, R.K., Saxena, D.C., 2000. Oxidative stress and antioxidant in wheat genotypes: possible mechanism of water stress tolerance. Agron. Crop Sci. 184, 55-61.

Sairam, R.K., Srivastava, G.C., 2001. Water stress tolerance of wheat (*Triticum aestivum* L.): Variation in hydrogen peroxide accumulation and antioxidant activity in tolerant and susceptible genotype. Agron. Crop Sci. 186, 63-70.

Senaratna, T., Touchell, D., Bunn, E., Dixon, K., 2000. Acetyl salicylic acid (Aspirin) and salicylic acid induce multiple stress tolerance in bean and tomato plants. Plant Growth Reg. 30, 157-161.

Singh, B., Usha, K., 2003. Salicylic acid induced physiological and biochemical changes in wheat seedlings under water stress. Plant Growth Reg. 39, 137-141.

Szepesi, Á., Csiszár, J., Bajkán, Sz., Gémes, K., Horváth F., Erdei, L., Deér, A., Simon, L.M., Tari, I., 2005. Role of salicylic aicd pre-treatment on the acclimation of tomato plants to salt- and osmotic stress. Acta Biologica Szegediensis. 49, 123-125.

Tari, I., Simon, L. M., Deér, K. A., Csiszár, J., Bajkán, Sz., Kis, Gy., Szepesi, Á., 2004. Influence of salicylic acid on salt stress acclimation of tomato plants: oxidative stress responses and osmotic adaptation. Acta Physiol. Plant., 26, 237-244.

Velikova, V., Yordanov, I., Edreva, A., 2000. Oxidative stress and some antioxidant systems in acid rain-treated bean plants, Protextive role of exogenous polyamines. Plant Sci. 151, 59–66.

Yordanova, R., Popova L., 2007. Effect of exogenous treatment with salicylic acid on photosynthetic activity and antioxidant capacity of chilled wheat plants, Gen. Appl. Plant Physiol., 33, 155-170.

Wang, Y., Liu, C., Li, K., Sun, F., Hu, H., Li, X., Zhao, Y., Han, C., Zhang, W., Duan, Y., Liu, M., Li, X., 2007. Arabidopsis EIN2 modulates stress response through abscisic acid response pathway. Plant Mol. Biol. 64, 633–644.

Waseem, M., Athar,H., Ashraf, M. 2006. Effect of salicylic acid applied through rooting medium on drought tolerance of wheat. Pak. J. Bot. 38(4), 1127-1136.

Zaho, S.J., Xu, C.C. Zou, Q., 1994. Improvements of the method for measurement of malondialdehyde in plant tissue. Plant Physiol. 30, 207–210.