

مطالعه اثر محلول پاشی سالیسیلیک اسید و کاربرد کودهای زیستی بر عملکرد، ویژگی‌های

فیزیولوژیک و سیستم دفاعی آنتی‌اکسیدانی گیاه لوبیا در شرایط تنش خشکی

حسین مهرآسا^۱، امین فرنیآ^{۲*}، مجتبی جعفرزاده کنارسری^۳ و شهرام نخجوان^۴

(۱) دانشجوی دکتری گروه زراعت، واحد بروجرد، دانشگاه آزاد اسلامی، بروجرد، ایران.

(۲، ۳ و ۴) استادیار گروه زراعت، واحد بروجرد، دانشگاه آزاد اسلامی، بروجرد، ایران.

*ایمیل نویسنده مسئول: aminfarnia@gmail.com

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۰۷/۲۸

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۰۴/۱۷

چکیده

این مطالعه به منظور بررسی اثر محلول پاشی سالیسیلیک اسید و کاربرد کودهای زیستی بر عملکرد و ویژگی‌های فیزیولوژیکی لوبیا سفید تحت شرایط تنش خشکی اجرا شد. آزمایش در طی دو سال زراعی متوالی ۱۳۹۷ و ۱۳۹۸ در پردیس تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی بروجرد واقع در استان لرستان به صورت اسپلیت فاکتوریل در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی در چهار تکرار اجرا شد. در کرت‌های اصلی تیمار تنش خشکی در دو سطح وجود و عدم وجود تنش خشکی به صورت کم آبیاری قرار داشت. همچنین در کرت‌های فرعی دو فاکتور کود زیستی و اسیدسالیسیلیک به صورت فاکتوریل قرار داشت. تیمار کود زیستی فسفری شامل سه سطح شاهد و کاربرد باکتری‌های باسیلوس و سودوموناس بود. همچنین تیمار سالیسیلیک اسید شامل محلول پاشی سالیسیلیک اسید در سطوح صفر، ۱ و ۲ میلی‌مولار بود. نتایج تجزیه مرکب نشان داد اثر تیمار سال، تنش خشکی، اسیدسالیسیلیک، کودهای زیستی و همچنین برهم کنش آن‌ها بر ویژگی‌های فیزیولوژیکی از قبیل کلروفیل a، b، کل، محتوای نسبی آب برگ، پروتئین محلول و آنزیم‌های کاتالاز و سوپراکسید دیسموتاز معنی‌دار شد. تنش خشکی منجر به افزایش محتوای پرولین و کاهش میزان پروتئین محلول و محتوای نسبی آب برگ شد در حالی که کاربرد سالیسیلیک اسید و کودهای زیستی در شرایط تنش خشکی منجر به بهبود این صفات گردید. میزان فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز نیز با کاربرد سالیسیلیک اسید و کودهای زیستی به میزان قابل توجهی افزایش یافت. تنش خشکی سبب کاهش عملکرد دانه شد و هر چند در هر دو شرایط تنش و عدم وجود تنش کاربرد کودهای زیستی منجر به افزایش عملکرد دانه شد ولی بیشترین میزان عملکرد دانه به میزان ۲۹۳۷ کیلوگرم در هکتار در تیمار کاربرد سودوموناس به دست آمد. در کل نتایج این مطالعه نشان داد که در شرایط تنش خشکی که ویژگی‌های فیزیولوژیکی گیاه در شرایط مطلوبی نیست سبب کاهش ۵۵ درصدی عملکرد دانه شد. کاربرد سالیسیلیک اسید منجر به بهبود ویژگی‌های فیزیولوژیکی و افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدانی گیاه شده که در نهایت با بهبود این ویژگی‌های میزان عملکرد دانه نیز افزایش یافت.

واژگان کلیدی: آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت، باسیلوس، پرولین و سودوموناس.

مقدمه

لوبیا سفید (*Phaseolus vulgaris* L.) یکی از مهم‌ترین حبوبات در جهان است که به عنوان غذای کاربردی عمل می‌کند زیرا حاوی چندین ماده فعال زیستی است. لکترین‌ها، فیتات‌ها، الیگوساکاریدها و فنولیک ترکیباتی هستند که ممکن است نقش متابولیسمی در غذای انسان و حیواناتی داشته باشند که به طور مکرر این ماده را مصرف می‌کنند (Mashaallah Hosseini and Amini, 2019). تنش دارای توان آسیب‌رسانی می‌باشد که به صورت نتیجه یک متابولیسم غیر عادی روی داده و ممکن است به صورت کاهش رشد، مرگ بخشی از گیاه و یا مرگ گیاه بروز کند (Farooq *et al.*, 2009). در شرایط تنش خشکی، پیری زودرس اندام‌های فتوسنتزکننده و همچنین کاهش فتوسنتز جاری گیاه باعث کاهش کل زیست‌توده و عملکرد نهایی گیاه زراعی می‌شود (امام و همکاران، ۱۳۸۶). سالیسیلیک اسید به عنوان یک تنظیم کننده شناخته می‌شود که در فرآیندهای فیزیولوژیکی گیاهان زراعی نقش مهمی را ایفا می‌کند. سالیسیلیک اسید سبب بهبود جذب عناصر غذایی در شرایط تنش شده که این خود می‌تواند افزایش رشد را به همراه داشته باشد. با افزایش غلظت اسید سالیسیلیک، میزان رنگیزه‌های فتوسنتز و به ویژه کلروفیل و همچنین تقسیمات سلولی در گیاه افزایش یافته و سبب افزایش عملکرد می‌شود (سپهری و همکاران، ۱۳۹۳). اسید سالیسیلیک ویژگی‌های فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی گیاهان تحت تنش‌های غیر زیستی را تنظیم نموده و نیز سبب مقاومت آن‌ها در برابر بیماری‌ها می‌شود. اسید سالیسیلیک به عنوان یک سیگنال مولکولی مهم در نوسانات گیاهی در پاسخ به تنش‌های محیطی شناخته شده است و در تنش‌های غیر زیستی به ویژه تنش خشکی در گیاهان افزایش پیدا نموده و سبب افزایش محتوای رنگیزه‌ها در شرایط تنش می‌شود (Ghai *et al.*, 2002). اسید سالیسیلیک اثر خود را بر فتوسنتز از طریق عوامل روزنه‌ای، رنگیزه‌ها، ساختار کلروپلاست و آنزیم‌های دخیل در مراحل فتوسنتز اعمال می‌کند (Ghai *et al.*, 2002). بنابراین، کاربرد اسید سالیسیلیک می‌تواند نقش مهمی در تحمل به تنش‌های غیرزیستی به عنوان یک ماده تنظیم کننده فرایندهای فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی داشته باشد که با اثر بر آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و همچنین تنظیم کننده‌های اسمزی مانند پرولین آثار ناشی از تنش خشکی را کاهش می‌دهد (Senaratna *et al.*, 2000). گزارش‌های مختلفی مربوط به نقش سالیسیلیک اسید در افزایش تحمل به خشکی در گیاهان مختلفی از تیره حبوبات وجود دارد (شوریابی و همکاران، ۱۳۹۱). کاربرد سالیسیلیک با افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی همچون آسکوربات پراکسیداز، سوپر اکسید دیسموتاز و کاتالاز سبب کاهش مقدار مالون دی‌آلدئید و پراکسید هیدروژن تحت تنش خشکی می‌گردد (Abadi *et al.*, 2015). فعالیت آنزیم کاتالاز در شرایط تنش خشکی افزایش بیشتری یافته و دلیل آن کاهش آب قابل دسترس برای گیاه و افزایش

تولید رادیکال‌های اکسیژن، می‌باشد (امانی و همکاران، ۱۳۹۶). محققان طی بررسی‌هایی در گیاه چچم *Lolium perenne* دریافتند که سالیسیلیک اسید در سطوح ۰/۷۵ و ۱/۵ میلی‌مولار با افزایش

محتوای کلروفیل a و b و کاهش نشت یونی، غلظت پرولین و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی باعث کاهش اثرات منفی ناشی از تنش خشکی گردید (Hosseini et al., 2015). کاربرد خارجی سالیسیلیک اسید با افزایش مقدار پرولین در گیاه سبب تحمل گیاه به خشکی می‌شود (Pospisilova, 2011). استفاده بیش از حد کودهای شیمیایی در کشاورزی برای تأمین فسفات مورد نیاز گیاهان همواره موجب ایجاد آثار سوء زیست محیطی شده و کاهش کیفیت محصولات کشاورزی را به دنبال داشته است (محمدی و همکاران، ۱۳۹۲). استفاده از کودهای زیستی، فواید زیادی نسبت به کودهای شیمیایی دارند که از جمله آن‌ها می‌توان به عدم تجمع مواد سمی در زنجیره غذایی، هزینه کمتر و بی‌خطر بودن برای محیط زیست اشاره نمود (Vassilev and Vassilev, 2003). با توجه به مطالب اشاره شده در بالا هدف از اجرای این تحقیق بررسی اثر کاربرد سالیسیلیک اسید و کودهای زیستی بر عملکرد و برخی از ویژگی‌های فیزیولوژیکی گیاه لوبیا سفید در شرایط وقوع تنش خشکی طی دو سال زراعی می‌باشد.

مواد و روش‌ها

این آزمایش در طی دو سال زراعی ۱۳۹۷ و ۱۳۹۸ در پردیس تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی بروجرد واقع در استان لرستان اجرا شد. طرح به صورت اسپلیت فاکتوریل در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی در چهار تکرار اجرا شد. در کرت‌های اصلی تیمار تنش خشکی در دو سطح وجود و عدم وجود تنش خشکی قرار داشت. همچنین در کرت‌های فرعی دو فاکتور کود زیستی و اسید سالیسیلیک به صورت فاکتوریل قرار داشت. تیمار کود زیستی فسفری شامل سه سطح شاهد و کاربرد باکتری‌های باسیلوس با نام علمی *Bacillus subtilis* و سودوموناس با نام علمی *Pseudomonas putida* بودند. جمعیت فعال کودهای زیستی در این تیمار برای لوبیا حدود 1×10^6 در هر کیلوگرم از کود بود. همچنین تیمار سالیسیلیک اسید شامل محلول‌پاشی در سطوح صفر، ۱ و ۲ میلی‌مولار بود. زمان اعمال تیمار اسید سالیسیلیک نیز مرحله ۶ تا ۸ برگی بوته‌های لوبیا بود. برای تهیه زمین ابتدا در پاییز شخم عمیق زده شد بعد کودهای پایه براساس آزمون خاک به زمین اضافه شد سپس دیسک و لولر و بعد هم فاروئر زده شد و کشت صورت گرفت. آبیاری تا قبل از گلدهی هر ۷ روز یکبار صورت گرفت، در زمان گلدهی دور آبیاری برای تیمار شاهد ۵ روز شد و مقدار آب برای تیمار تنش خشکی نیز براساس تبخیر از تشتک تبخیر پس از ۵۰ میلی‌متر تبخیر از تشتک نسبت به حالت عادی محاسبه گردید که حدود ۹ روز طول کشید. اسید سالیسیلیک و کودهای زیستی نیز از موسسه تحقیقات خاک و آب کرج تهیه گردید. کودهای زیستی

شامل در این مطالعه پس از اعمال تیمارهای آزمایشی نمونه برداری جهت اندازه گیری ویژگی‌های فیزیولوژیک از برگ‌های تازه گیاه صورت گرفت. زمان نمونه برداری نیز ۲/۵ ماه پس از انجام تیمار سالیسیلیک اسید بود. صفات فیزیولوژیک به صورت زیر اندازه گیری شدند:

تعیین غلظت کلروفیل‌های a, b و ab: برای تعیین غلظت کلروفیل‌های برگ ابتدا کلروفیل‌ها استخراج و میزان جذب نور توسط عصاره استخراج شده با استفاده از اسپکترو فتومتر در طول موج ۶۶۳ و ۶۴۵ نانومتر تعیین گردید (Arnon, 1965). در این روش میزان ۰/۵ گرم برگ تازه را با استفاده از نیتروژن مایع درهاون چینی به صورت پودر درآورده و آن را درون لوله‌های آزمایش ۱۵ میلی‌لیتر ریخته و ۱۰ میلی‌لیتر استون به آن اضافه کرده و سپس به مدت ۲ ساعت در تاریکی نگاه‌داری کرده و پس از آن سانتریفوژ نموده و مایع شفاف بالایی جدا گردیده و با استفاده از آن میزان جذب برای تعیین غلظت کلروفیل‌های a, b و ab در طول موج‌های مربوطه و با استفاده از رابطه‌های ۱، ۲ و ۳ زیر تعیین شد:

$$\text{Chl-a (mg/ml)} = \{ [12.7(\text{ABS663}) - 2.69(\text{ABS645})] \times V \} / (1000 \times W) \quad (1)$$

$$\text{Chl-b (mg/ml)} = \{ [22.9(\text{ABS645}) - 4.69(\text{ABS663})] \times V \} / (1000 \times W) \quad (2)$$

$$\text{Chl-ab (mg/ml)} = \{ [20.2(\text{ABS645}) + 8.02(\text{ABS663})] \times V \} / (1000 \times W) \quad (3)$$

ABS = میزان جذب در طول موج‌های مورد نظر (نانومتر)

W = وزن نمونه اندازه گیری شده (گرم)

V = حجم نمونه استخراج شده (میلی لیتر)

میزان پرولین: پس از اعمال تیمارهای اسید سالیسیلیک و در مرحله پرشدن دانه، مقدار ۰/۵ گرم برگ تازه از هر کرت نمونه برداری و به وسیله نیتروژن مایع پودر و سپس به لوله‌های آزمایش ۱۵ میلی‌لیتری منتقل گردید. سپس ۱۰ میلی‌لیتر محلول اسید سولفوسالیسیلیک (SSA) اضافه کرده و پس از ۴۸ ساعت نمونه‌ها با کاغذ صافی واتمن شماره یک صاف شده و از محلول صاف شده برای اندازه گیری میزان پرولین استفاده گردید (Bates *et al.*, 1973). دو میلی لیتر از محلول هر نمونه را در لوله آزمایش ریخته و به آن دو میلی‌لیتر معرف ناین هیدرین و دو میلی‌لیتر اسید استیک گلاسیال اضافه شد. آنگاه لوله‌های آزمایش به مدت یک ساعت در بن‌ماری جوشان ۱۰۰ °C (حمام آب جوش) قرار داده و به هر کدام از لوله‌ها چهار میلی‌لیتر تولون اضافه شد و درب لوله‌ها را بسته و به مدت ۱۵ تا ۲۰ ثانیه به شدت به هم زده شد. پس از اینکه دو فاز تشکیل داد، فاز بالایی را که رنگی و حاوی تولون به همراه اسید آمینه پرولین است در طول موج ۵۲۰ نانومتر در دستگاه اسپکتروفتومتر قرائت شد.

اندازه‌گیری میزان آب نسبی برگ (Relative Water Content, RWC): حدود ۰/۵ گرم از جوان‌ترین برگ توسعه یافته هر گیاه (FW) جدا شده و سپس نمونه‌ها به مدت ۲۴ ساعت روی آب مقطر شناور ماند. چهار ساعت بعد از آب‌گیری، قطعات برگ بلافاصله وزن شد تا وزن در هنگام تورژسانس (TW) محاسبه شد. پس از آن قطعات برگ در 70°C به مدت ۴۸ ساعت خشک شده تا وزن خشک ثابت (DW) به دست آمد سپس RWC از طریق رابطه ۴ زیر محاسبه شد (Sanchez et al., 1998).

$$\text{رابطه ۴: } \text{RWC}\% = (\text{FW} - \text{DW} / \text{TW} - \text{DW}) \times 100$$

FW = وزن تازه برگ‌ها بر حسب گرم

DW = وزن خشک برگ‌ها بر حسب گرم

TW = وزن برگ‌ها به هنگام تورژسانس بر حسب گرم

پروتئین محلول: میزان پروتئین محلول پس از اعمال تیمار محلول‌پاشی اسیدسالیسیلیک و در مرحله به نیام رفتن، با استفاده از روش (Bradford, 1976) اندازه‌گیری شد.

کاتالاز: برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیم کاتالاز یک گرم از بافت برگ با ۳ میلی‌لیتر بافر استخراج درهاون چینی بر روی یخ ساییده شده و پس از عبور از دو لایه پارچه ململ در میکروتیوب ریخته و به مدت ۱۵ دقیقه در 10000°C دور و در دمای 4°C درجه سانتیگراد سانتیفریوژ شده و تغییرات جذب در طول موج ۲۴۰ نانومتر به مدت دو دقیقه در دستگاه اسپکتروفوتومتر اندازه‌گیری و از یک دقیقه اول آن برای محاسبه فعالیت کاتالاز استفاده گردید. برای محاسبه فعالیت آنزیم کاتالاز از ضریب خاموشی $0/0394$ بر میلی مول بر سانتیمتر استفاده گردید (Chance and Maehly, 1955).

سوپراکسید دیسموتاز: سنجش سوپر اکسید دیسموتاز بر اساس تغییر شیمیائی نیتروبلوتترازولیوم انجام شد. بدین منظور محلول واکنش شامل $0/055$ مول نیتروبلوتترازولیوم، $1/42$ درصد تریتون EDTA، X-100 $0/1$ مولار و پیروگالول 16 میلی مولار بود که پس از اضافه کردن عصاره نمونه بافت تغییر جذب در اسپکتروفوتومتر در طول موج 560 نانومتر ارزیابی گردید. در پایان نیز داده‌های حاصل با استفاده از نرم‌افزار آماری SAS تجزیه و تحلیل و مقایسات میانگین با استفاده از روش LSD انجام گردید. توزیع نرمال داده‌ها نیز با استفاده از نرم‌افزار SAS مورد بررسی قرار گرفت.

نتایج و بحث

کلروفیل a:

نتایج تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد اثر تیمار سال، تنش خشکی، سالیسیلیک اسید و کود زیستی بر محتوای کلروفیل a معنی‌دار شد. همچنین برهم‌کنش سال \times تنش خشکی، تنش خشکی \times سالیسیلیک اسید، تنش خشکی \times کود

زیستی، تنش خشکی × سالیسیلیک اسید × کود زیستی، سال × تنش خشکی × سالیسیلیک اسید × کود زیستی و سال × تنش خشکی × سالیسیلیک اسید بر محتوای کلروفیل a معنی‌دار شد (جدول ۱). با توجه به معنی‌دار شدن برهم‌کنش سه‌گانه، نتایج مقایسه میانگین داده‌ها نشان داد در شرایط عدم تنش خشکی بیش‌ترین میزان کلروفیل a در سطح سالیسیلیک اسید یک میلی‌مولار و با کاربرد کود زیستی باسیلوس (۹/۴ میلی‌گرم بر گرم) به دست آمد. این نتایج نشان داد که در سطح تیمار عدم تنش خشکی کم‌ترین میزان کلروفیل a (۵/۹ میلی‌گرم بر گرم) در سطح تیمار اسید سالیسیلیک دو میلی‌مولار حاصل شد. در تیمار تنش خشکی بیش‌ترین میزان کلروفیل a در تیمار کاربرد باسیلوس و در سطح کاربرد اسید سالیسیلیک دو میلی‌مولار به میزان ۷/۳ میلی‌گرم بر گرم حاصل شد. کم‌ترین میزان کلروفیل a در این تیمار مربوط به عدم کاربرد سالیسیلیک اسید و کود زیستی بود (جدول ۳). این نتایج نشان داد که با توجه به اینکه تنش خشکی سبب کاهش محتوای کلروفیل a شد، کاربرد سالیسیلیک اسید به میزان یک میلی‌مولار سبب شد که محتوای کلروفیل a نیز افزایش یافته و از طرفی افزایش غلظت سالیسیلیک اسید تا سطح دو میلی‌مولار سبب کاهش محتوای کلروفیلی نسبت به سطح یک میلی‌مولار شد. کاهش میزان کلروفیل در شرایط وقوع تنش خشکی می‌تواند به واسطه کاهش سنتز کلروفیل و همچنین ناشی از تخریب آن باشد. تنش کمبود آب با بستن روزنه‌ها و تخریب کلروفیل و کلروپلاست باعث کاهش فتوسنتز می‌شود (Waraich *et al.*, 2011). با این وجود تحقیقات مختلف نیز حاکی از کاهش اثرات مخرب تنش خشکی بر محتوای کلروفیلی در شرایط کاربرد خارجی سالیسیلیک اسید می‌باشد. به عقیده محققان فیزیولوژی گیاهی تنش خشکی سبب کاهش محتوای کلروفیلی و کاروتنوئیدی برگ گیاهان زراعی می‌گردد و از طرفی کاربرد خارجی سالیسیلیک اسید سبب بهبود رشد و افزایش عملکرد و اجزای عملکرد گیاه ماش تحت تنش خشکی می‌گردد (Nezhad *et al.*, 2014).

کلروفیل b

نتایج تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد اثر تیمار سال، تنش خشکی، سالیسیلیک اسید و کود زیستی بر محتوای کلروفیل b معنی‌دار شد. همچنین برهم‌کنش تنش خشکی × سالیسیلیک اسید بر محتوای کلروفیل b معنی‌دار شد و اثر سایر تیمارها بر این صفت معنی‌دار نشد (جدول ۱). تنش خشکی سبب کاهش محتوای کلروفیل b شد به طوری که در تیمار شاهد و تیمار تنش خشکی محتوای کلروفیل b به ترتیب ۳/۵۱ و ۲/۹ میلی‌گرم بر گرم بود و بین این دو تیمار از این نظر اختلاف معنی‌دار وجود داشت (جدول ۲). همچنین در بین تیمارهای کاربرد سالیسیلیک اسید، بیش‌ترین میزان کلروفیل b مربوط به تیمار سالیسیلیک اسید یک میلی‌مولار بود و از این نظر کاربرد غلظت بیشتر سالیسیلیک اسید منجر به کاهش بیشتر محتوای کلروفیل b شد (جدول ۲).

جدول ۱: تجزیه واریانس صفات لوبیا تحت اثر کاربرد سالیسیلیک اسید و کودهای زیستی در شرایط تنش خشکی

عملکرد دانه	سوپراکسید دیسموتاز	کاتالاز	پروتئین محلول	محتوای پروتئین	محتوای نسبی آب برگ	کلروفیل کل	کلروفیل b	کلروفیل a	درجه آزادی	
ns _{۱۴۳۲۰}	۳۱۳۹۳۶**	۱۷۹۵۲۸**	۱۳۶**	ns _{./۰.۰۱}	۲۷۴**	۳۶۹**	۵۳**	۱۴۲**	۱	سال (Y)
ns _{۴۴۰۳۵}	ns _{۴۲۸}	۴۷۸۱۶**	۹/۶۴**	ns _{./۰.۰۰۴}	ns _{۴۵/۱}	ns _{./۰.۶۲}	ns _{./۰.۳}	ns _{./۰.۰۶}	۳	تکرار (Y) *(R)
۵۰۱۵۷۵۸۴**	۱۰۲۸۰۶۰**	۲۱۶۸۲۵۶**	۱۱۱۲**	./۰.۹۶**	۴۷۷۲**	۱۲۶/۹**	۹/۵۸**	۶۶/۷**	۱	تنش خشکی (DS)
ns _{۲۰۹۱۵۳}	ns _{./۰.۴۶}	ns _{۲۰۸۵۸}	ns _{./۰.۰۱}	ns _{./۰.۰۰۸}	۱۸۱**	۱/۹*	ns _{./۰.۰۵}	۲/۶۱**	۱	DS*Y
۶۸۸۴۸	۸۹۰	۴۲۴۹۴	۵/۷۲	./۰.۰۱۷	۲۸/۶۹	۱/۲۱	۰/۶۸	۰/۲۹	۹	خطای اصلی
ns _{۳۹۴۶۷}	۴۰۳۹۴۷**	۲۰۰۴۶۶۰.۹**	۱۳۷**	./۰.۳۸**	۲۰۳۴**	۲۴/۷**	۲/۵۶**	۱۱/۹**	۲	سالیسیلیک اسید (SA)
۲۲۵۸۹۳۱۷**	۱۵۳۳۴۹**	۹۶۰۰۶۲**	۵/۹۸*	./۰.۲۲**	ns _{۲۸/۴}	۲۰/۵**	۶/۳**	۶/۴**	۲	کود زیستی (PB)
ns _{۱۰۳۰۰}	ns _{۱۱۷۷}	ns _{۱۸۲۰۷}	ns _{./۰.۴}	ns _{./۰.۰۱}	۸۸*	۰/۶۱	ns _{./۰.۰۳}	ns _{./۰.۵۵}	۲	SA*Y
ns _{۱۷۸۹۰}	ns _{۷۱/۹}	ns _{۶۵}	ns _{./۰.۰۵}	./۰.۰۰۲*	۷۷*	ns _{./۰.۲۶}	ns _{./۰.۰۱}	ns _{./۰.۳۸}	۲	PB*Y
ns _{۲۴۷۴۰۴}	۴۳۸۳۴**	۱۵۰۲۶۵۹**	۱۹/۸**	./۰.۳۳**	۴۳۳**	۷/۱۹**	۱/۳۵**	۱۴/۲**	۲	SA*DS
۵۱۶۷۲۶۲**	۲۳۷۹۷**	۲۷۷۷۴*	ns _{./۰.۸۸}	./۰.۰۲۷**	۳۹۶**	ns _{./۰.۹۹}	ns _{./۰.۰۲}	۱/۳**	۲	PB*DS
ns _{۷۴۱۸۸}	ns _{۸۷۳}	۵۵۶۱۹۶**	۹/۷۴**	./۰.۰۲۹**	۷۸**	ns _{./۰.۲۹}	ns _{./۰.۲}	ns _{./۰.۰۱}	۴	SA*PB
ns _{۴۳۴۸۰}	ns _{۲۴۳}	ns _{۱۲۳۹۰}	ns _{./۰.۱۲}	ns _{./۰.۰۰۱۲}	۹۷**	۲/۰.۴**	ns _{./۰.۰۲}	۱/۸۷**	۲	SA*DS*Y
ns _{۴۶۵۰۱}	ns _{۱۸۰}	ns _{۴۶۹۶}	ns _{./۰.۱۱}	ns _{./۰.۰۰۰۲}	۷۰/۵*	ns _{./۰.۱}	ns _{./۰.۰۰۴}	ns _{./۰.۱۴}	۲	PB*DS*Y
ns _{۵۰۹۱}	ns _{۳۱/۸}	ns _{۲۰۵۱}	ns _{./۰.۰۴}	ns _{./۰.۰۰۰۰۱}	۷۶**	ns _{./۰.۳}	ns _{./۰.۰۰۴}	ns _{./۰.۳}	۴	PB*SA*Y
ns _{۴۳۵۱۶}	۴۲۲۴**	۸۲۴۲۱**	۵/۸**	./۰.۰۰۹**	۱۱۳**	۸/۷**	ns _{./۰.۰۴۴}	۶/۱**	۴	PB*SA*DS
ns _{۱۶۹۱۰}	ns _{۱۸۰}	ns _{۴۴۵۷}	ns _{./۰.۰۵}	ns _{./۰.۰۰۰۱۵}	۷۴**	ns _{./۰.۶}	ns _{./۰.۰۱}	۰/۵۸*	۴	PB*SA*DS*Y
۹۱۱۵۱	۱۱۶۲	۸۰۰۸	۱/۶۲	./۰.۰۰۰۶	۱۹/۶	۰/۳۸	۰/۱۶	۰/۱۹	۹۶	خطای فرعی
-	-	-	-	-	-	-	-	-	۱۴۳	خطای کل
۲۵	۵/۸۸	۵/۸۴	۸/۷	۴/۲	۶/۱	۶/۰۸	۱۲/۳	۶/۳		ضریب تغییرات (درصد)

این نتایج بیانگر این مطلب است که با افزایش غلظت سالیسیلیک اسید، در گیاه شرایط تنش ایجاد شده و این شرایط منجر به کاهش محتوای کلروفیل b شد. در بین تیمارهای مختلف کود زیستی نیز کاربرد باسیلوس منجر به افزایش بیشتر کلروفیل b نسبت به سایر تیمارهای کاربرد کود زیستی و تیمار شاهد شد. میزان کلروفیل در گیاهان یکی از فاکتورهای مهم در حفظ ظرفیت فتوسنتزی است. تحت شرایط تنش خشکی مقدار کلروفیل تحت عوامل مختلفی همچون کاهش آسیمیلایسیون کربن و افزایش گونه‌های فعال اکسیژن دچار تخریب شده و کاهش می‌یابد (Lawlor and Cornic, 2002). سالیسیلیک اسید با افزایش فعالیت آنزیمهای درگیر در فتوسنتز و همچنین کاهش گونه‌های فعال اکسیژن با تحت اثر قرار دادن فرآیندهای بیوشیمیایی و فعالیت آنزیمهای آنتی‌اکسیدانی و همچنین با توجه به خاصیت آنتی‌اکسیدانی که خود سالیسیلیک اسید دارد، منجر به افزایش محتوای کلروفیل در گیاه می‌شود. کامل‌منش و همکاران (۱۳۸۹) اثر تنش خشکی را بر محتوای کلروفیل و محتوای نسبی آب در سه ژنوتیپ لوبیای سفید دانشکده، شکوفه و G11867 را مورد بررسی قرار داد و عنوان نمودند که محتوای کلروفیل و محتوای نسبی آب در اثر تنش خشکی به ترتیب افزایش و کاهش یافتند.

کلروفیل کل

نتایج تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد اثر تیمار سال، تنش خشکی، سالیسیلیک اسید و کود زیستی بر محتوای کلروفیل کل معنی‌دار شد. همچنین برهم‌کنش سال \times تنش خشکی، تنش خشکی \times سالیسیلیک اسید، تنش خشکی \times سالیسیلیک اسید \times کود زیستی و سال \times تنش خشکی \times سالیسیلیک اسید بر محتوای کلروفیل کل معنی‌دار شد و اثر سایر تیمارها بر این صفت معنی‌دار نشد (جدول ۱). در تیمار عدم تنش خشکی میزان کلروفیل کل در تیمار سالیسیلیک اسید یک میلی‌مولار و کاربرد کود باسیلوس بیشتر از سایر تیمارها بود (۱۳/۶ میلی‌گرم بر گرم). در تیمار عدم کاربرد سالیسیلیک اسید نیز بیش‌ترین میزان کلروفیل کل در تیمار کاربرد باسیلوس حاصل شد در حالی که در تیمار کاربرد سالیسیلیک اسید دو میلی‌مولار بیش‌ترین میزان کلروفیل کل (۱۱ میلی‌گرم بر گرم) در تیمار کاربرد سودوموناس حاصل شد و بین این دو تیمار از نظر آماری تفاوت معنی‌داری وجود نداشت (جدول ۲). در شرایط وجود تنش خشکی محتوای کلروفیل کل در شرایط کاربرد سالیسیلیک اسید دو میلی‌مولار به همراه کاربرد باکتری باسیلوس (۱۰/۴ میلی‌گرم بر گرم) به دست آمد (جدول ۳). در هر دو شرایط تنش خشکی و شاهد کاربرد سالیسیلیک اسید در سطح یک میلی‌مولار سبب افزایش بیشتر محتوای کلروفیل کل نسبت به تیمار شاهد و تیمار کاربرد سالیسیلیک اسید دو میلی‌مولار شد. طی تحقیقی مشابه تنش خشکی سبب کاهش محتوای کلروفیلی لوبیا سبز گردید و با افزایش شدت تنش محتوای کلروفیلی به میزان بیشتری کاهش یافت (Yasar et al., 2010). افزایش محتوای کلروفیل به دنبال کاربرد خارجی اسید سالیسیلیک و به دنبال آن افزایش گیرنده‌های فتوسنتزی به خصوص در شرایط تنش به همراه افزایش محتوای قند در گیاهان تیمار شده با

اسید سالیسیلیک، ممکن است توجیهی برای بهبود واکنش گیاهان زراعی باشد. به عقیده شوقیان و روزبهانی (۱۳۹۶) خشکی اثر مخربی بر محتوای کلروفیلی گیاه لوبیا داشته که با کاربرد خارجی اسید سالیسیلیک، این اثر منفی کاهش یافته و در نتیجه بهبودی در گیاه حاصل می‌گردد.

محتوای نسبی آب برگ‌ها (RWC): نتایج تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد اثر تیمار سال، تنش خشکی و سالیسیلیک اسید بر محتوای نسبی آب برگ‌ها معنی‌دار شد. همچنین برهم‌کنش سال×تنش خشکی، سال × کود زیستی، سال × سالیسیلیک اسید، تنش خشکی × سالیسیلیک اسید، تنش خشکی × کود زیستی، تنش خشکی×سالیسیلیک اسید×کود زیستی، سال×تنش خشکی×سالیسیلیک اسید × کود زیستی، سال × تنش خشکی × سالیسیلیک اسید و سال × تنش خشکی × کود زیستی بر محتوای نسبی آب برگ‌ها معنی‌دار شد و اثر سایر تیمارها بر این صفت معنی‌دار نشد (جدول ۱). نتایج مقایسه میانگین برهم‌کنش سه‌گانه نشان داد نشان داد RWC در شرایط عدم تنش خشکی بیشتر از شرایط تنش خشکی بود و همچنین محلول‌پاشی سالیسیلیک اسید یک میلی‌مولار سبب افزایش RWC در برگ‌های لوبیا سفید در هر دو شرایط تنشی و شاهد شد. بالاترین میزان RWC در شرایط بدون تنش و در سطح محلول‌پاشی سالیسیلیک اسید یک میلی‌مولار به همراه کاربرد باسیلوس به میزان ۸۷ درصد به وقوع پیوست در حالی که در همین سطح تیماری کم‌ترین میزان RWC به مقدار ۷۰ درصد در تیمار محلول‌پاشی سالیسیلیک اسید ۲ میلی‌مولار و کاربرد سودوموناس حاصل شد (جدول ۴). شرایط تنش خشکی منجر به کاهش RWC در برگ‌های لوبیا سفید شد. در این شرایط با محلول‌پاشی سالیسیلیک اسید یکی میلی‌مولار تا حدودی جبران شد و کاربرد سالیسیلیک اسید در غلظت یک میلی‌مولار توانست تا حدودی اثرات منفی ناشی از تنش خشکی را جبران نماید. افزایش محتوای RWC در اثر کاربرد سالیسیلیک اسید در شرایط تنش خشکی توسط برخی دیگر از محققین گزارش شده است (دولتمند شهری و حق شناس، ۱۳۹۶). سالیسیلیک اسید از طریق افزایش آسیمیلات‌های محلول همچون پرولین در سلول باعث افزایش محتوای نسبی آب شده و با حفظ فشار اسمزی منجر به افزایش فتوسنتز و رشد گیاه می‌گردد (Hasegawa *et al.*, 2000)

محتوای پرولین برگ‌ها

نتایج تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد اثر تیمار سال، تنش خشکی و سالیسیلیک اسید و کودهای زیستی بر محتوای پرولین برگ‌ها معنی‌دار شد.

جدول ۲: مقایسه میانگین صفات لوبیا در تحت اثر کاربرد سالیسیلیک اسید و کودهای زیستی در شرایط تنش خشکی

تیمارها	کلروفیل a (میلی گرم بر گرم)	کلروفیل b (میلی گرم بر گرم)	کلروفیل کل (میلی گرم بر گرم)	محتوای نسبی آب برگ (درصد)	پرولین (میلی گرم بر گرم)	پروتئین محلول (میلی گرم بر گرم)	کاتالاز (نانومول بر دقیقه بر گرم)	سوپراکسید دیسموتاز (نانومول بر دقیقه بر گرم)	عملکرد دانه (کیلوگرم در هکتار)
سال									
اول	۵/۹۹b	۲/۶۴b	۸/۶b	۷۳/۴a	۰/۶۱a	۱۱/۶b	۱۴۹۵b	۵۳۳b	۱۱۸۹a
دوم	۷/۹۸a	۳/۸۶a	۱۱/۸a	۷۰/۶b	۰/۶۲a	۱۵/۵a	۱۵۶۵a	۶۲۶a	۱۱۶۹a
تنش خشکی									
شاهد	۷/۶a	۳/۵۱a	۱۱/۱۸a	۷۷/۷a	۰/۵۳b	۱۷/۳a	۱۴۰۷b	۶۶۴a	۱۷۶۹a
تنش	۶/۳b	۲/۹۹b	۹/۳b	۶۶/۲b	۰/۷a	۱۱/۸b	۱۶۵۳a	۴۹۵b	۵۸۸b
سالیسیلیک اسید									
صفر	۶/۷۲b	۳/۰۵b	۹/۷۷b	۷۲/۵b	۰/۵۱c	۱۳/۵b	۲۲۶۴a	۶۶۶a	۱۲۰۵a
۱ میلی مولار	۷/۵۶a	۳/۵a	۱۱a	۷۸a	۰/۶۴b	۱۳/۶b	۱۲۷۷b	۵۸۸b	۱۱۴۸a
۲ میلی مولار	۶/۶۷b	۳/۲b	۹/۸b	۶۵c	۰/۶۹a	۱۶/۵a	۱۰۴۹c	۴۸۳c	۱۱۸۳a
کود زیستی									
شاهد	۶/۶۳c	۳/۲۲b	۹/۸b	۷۲/۷a	۰/۶۳a	۱۴/۲b	۱۴۰۱c	۵۱۶c	۱۵۳۸b
باسیلوس	۷/۳۶a	۳/۶۲a	۱۰/۹a	۷۲a	۰/۶۲a	۱۴/۶ab	۱۶۸۱a	۶۲۵a	۱۸۲۹a
سودوموناس	۶/۹۵b	۲/۹۱c	۹/۸۷b	۷۱/۲a	۰/۵۹b	۱۴/۹a	۱۵۰۸b	۵۹۷b	۱۹۶۹a

جدول ۳: مقایسه میانگین برهم کنش تنش خشکی × اسیدسالیسیلیک × کودهای زیستی بر ویژگی‌های فیزیولوژیک و آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی لوبیا سفید

تنش خشکی	سالیسیلیک اسید	کود زیستی	کلروفیل a (میلی گرم بر گرم)	کلروفیل b (میلی گرم بر گرم)	کلروفیل کل (میلی گرم بر گرم)	محتوای نسبی آب برگ‌ها (درصد)	پرولین (میلی گرم بر گرم)	پروتئین محلول (میلی گرم بر گرم)	کاتالاز (نانومول بر دقیقه بر گرم)	سوپراکسید دیسموتاز (نانومول بر دقیقه بر گرم)
شاهد	شاهد	شاهد	۷/۵d	۳/۲b	۱۰/۷c	۷۴c	۰/۵۷b	۱۶/۱۲bc	۱۷۱۷c	۷۴۳b
		باسیلوس	۸/۴b	۳/۴b	۱۱/۹b	۷۷bc	۰/۴۹c	۱۷/۵b	۲۲۸۳a	۸۱۴a
		سودوموناس	۷/۱ d	۲/۸c	۱۰ c	۷۴c	۰/۴۶d	۱۶/۸bc	۱۸۴۸b	۷۹۰ ab
	۱ میلی مولار	شاهد	۸c	۳/۸ab	۱۱/۸b	۷۹b	۰/۵۵bc	۱۵/۵c	۱۰۸۱f	۶۳۱d
		باسیلوس	۹/۴a	۴/۲a	۱۳/۶a	۸۷a	۰/۵۶b	۱۵/۲c	۱۳۶۵d	۷۰۱d
		سودوموناس	۸/۱b	۳/۱b	۱۱/۲b	۸۶a	۰/۶۴a	۱۶/۲bc	۱۱۲۵e	۶۷۸dc
	۲ میلی مولار	شاهد	۵/۹ f	۳/۴b	۹/۳d	۷۳c	۰/۵۸b	۱۸/۸ab	۱۰۶۸f	۵۰۴f
		باسیلوس	۶/۷e	۳/۸ab	۱۰/۶c	۷۷bc	۰/۵c	۱۹/۴a	۱۰۷۶f	۵۸۸e
		سودوموناس	۷/۴ d	۳/۶b	۱۱b	۷۰d	۰/۴۶d	۲۰/۴a	۱۱۰۱e	۵۲۶f
تنش	شاهد	شاهد	۵/۱c	۲/۹c	۸c	۷۲a	۰/۵۶f	۱۱/۴c	۲۲۱۳c	۴۴۷d
		باسیلوس	۵/۹c	۳/۴a	۹/۳bc	۶۹b	۰/۵۳fg	۱۰/۳cd	۳۰۱۰a	۶۲۴a
		سودوموناس	۶b	۲/۴c	۸/۵c	۶۷b	۰/۴۹g	۹/۱d	۲۵۱۵b	۵۷۸b
	۱ میلی مولار	شاهد	۶/۵b	۳/۱b	۹/۶b	۷۴a	۰/۶۶de	۱۱/۲c	۱۲۷۷e	۴۲۵d
		باسیلوس	۶/۲b	۳/۶a	۹/۸b	۷۱ab	۰/۷۷cd	۱۱/۵c	۱۳۴۹e	۵۶۸b
		سودوموناس	۶/۹b	۳b	۱۰ ab	۶۹b	۰/۶۸d	۱۱/۹bc	۱۴۶۴d	۵۳۰c
	۲ میلی مولار	شاهد	۶/۶b	۲/۷c	۹/۴b	۶۲bc	۰/۸۷b	۱۲b	۱۰۴۷f	۳۴۷e
		باسیلوس	۷/۳a	۳/۱b	۱۰/۴a	۴۸e	۰/۹۰a	۱۳/۵ab	۱۰۰۲f	۴۵۴d
		سودوموناس	۵/۸ c	۲/۳c	۸/۲c	۵۸d	۰/۸۱c	۱۴/۸a	۹۹۷f	۴۸۱cd

همچنین برهم‌کنش سال×کود زیستی، تنش خشکی×سالیسیلیک اسید، تنش خشکی×کود زیستی و تنش خشکی×سالیسیلیک اسید×کود زیستی بر محتوای پرولین برگ‌ها معنی‌دار شد و اثر سایر تیمارها بر این صفت معنی‌دار نشد (جدول ۱). محتوای پرولین برگ‌ها از مهمترین نشانگرهای وجود گیاه در شرایط استرس‌زا می‌باشد. نتایج مقایسه میانگین داده‌ها نشان داد شرایط وقوع تنش خشکی منجر به تولید بیشتر پرولین شد. میزان پرولین در تیمار تنش خشکی و در سطح محلول پاشی سالیسیلیک اسید دو میلی‌مولار بیش‌ترین مقدار (۰/۹ میلی گرم بر گرم) بود که از نظر آماری با سایر تیمارها اختلاف معنی‌دار داشت (جدول ۳). در شرایط تنش خشکی، میزان پرولین با عدم کاربرد سالیسیلیک اسید کمتر از تیمارهای کاربرد یک و دو میلی‌مولار سالیسیلیک اسید بود به طوری که کم‌ترین میزان تولید سالیسیلیک اسید در تیمار تنش خشکی در سطح عدم کاربرد سالیسیلیک اسید و کاربرد سودوموناس به میزان ۰/۴۹ میلی‌گرم بر گرم بود که با سایر تیمارها به جز تیمار کاربرد باسیلوس در همین سطح از کاربرد سالیسیلیک اسید (۰/۵۳ میلی‌گرم بر گرم) اختلاف معنی‌دار داشت. در شرایط عدم وجود تنش خشکی تولید بیشتر پرولین در شرایط کاربرد سالیسیلیک اسید یک میلی‌مولار به همراه کاربرد سودوموناس بود (۰/۶۴ میلی‌گرم بر گرم) که این تیمار نیز با سایر تیمارهای آزمایشی از این نظر اختلاف معنی‌دار داشت. این در حالی بود که کم‌ترین میزان تولید پرولین در شرایط عدم وجود تنش خشکی به تیمار عدم کاربرد سالیسیلیک اسید و کاربرد باکتری باسیلوس به میزان ۰/۴۹ میلی‌گرم بر گرم اختصاص یافت (جدول ۴). اسیدآمین پرولین که تحت شرایط تنش خشکی در سلولهای گیاهی تجمع می‌یابد به عنوان یک آنتی اکسیدان غیرآنزیمی مطرح می‌شود و به دلیل نقش حافظتی که در سلول ایفا می‌کند، در شرایط تنش‌های محیطی می‌تواند گیاه را از آسیب‌های احتمالی حفظ کند. در سلول‌های تحت تنش، پرولین سبب محافظت سلول و ممانعت از ایجاد سمیت در سلول می‌شود (Bayoumi *et al.*, 2010). تولید و تجمع اسید آمینه پرولین به منظور تنظیم پتانسیل اسمزی در سیتوپلاسم طی تنش‌های غیر زیستی یک پاسخ سازگاری برای گیاه محسوب می‌شود (Hasegawa *et al.*, 2000). با توجه به اینکه در شرایط وجود تنش خشکی کاربرد سالیسیلیک اسید در سطح یک میلی‌مولار و دو میلی‌مولار سبب تولید بیشتر پرولین نسبت به تیمار شاهد شده است. کاربرد سالیسیلیک اسید در شرایط تنش خشکی منجر به افزایش تولید پرولین و واکنش بهتر گیاه در شرایط تنشی شده است. بایستی در نظر داشت که سالیسیلیک اسید با سنتز و تجمع پرولین به‌عنوان یک واکنش در برابر تنش عمل می‌کند (Khosravi *et al.*, 2011). براساس یافته‌های پژوهشگران سالیسیلیک اسید با افزایش محتوای نسبی آب از طریق افزایش اسیمیلات‌های محلول همچون پرولین در سلول، موجب حفظ فشار اسمزی، توسعه فتوسنتزی و افزایش رشد گیاه می‌گردد (Sanchez *et al.*, 1998). نتایج یافته‌های محققین بر گیاه تنباکو نیز تأیید کننده این مطلب است که کاربرد خارجی سالیسیلیک‌اسید با افزایش مقدار پرولین در گیاه سبب تحمل گیاه به خشکی گردیده است (Pospisilova, 2010).

2011). گزارش شده است که اسیدسالیسیلیک بر تشکیل پروتئین‌های دفاعی گیاه اثر می‌گذارد و افزودن اسید سالیسیلیک در غلظت‌های مختلف می‌تواند با افزایش مقدار پرولین سبب بهبود تحمل گیاه در شرایط تنش خشکی شود (یزدان پناه و همکاران، ۱۳۸۸) که با یافته‌های این تحقیق مطابقت دارد.

محتوای پروتئین محلول

با توجه به نتایج تجزیه واریانس داده‌ها مشخص شد که اثر تیمار سال، تنش خشکی و سالیسیلیک اسید و کودهای زیستی بر محتوای پروتئین محلول برگ‌ها معنی‌دار شد. همچنین برهم‌کنش تنش خشکی × سالیسیلیک اسید و تنش خشکی × سالیسیلیک اسید × کود زیستی بر محتوای پروتئین محلول برگ‌ها معنی‌دار شد و اثر سایر تیمارها بر این صفت معنی‌دار نشد (جدول ۱). نتایج نشان داد که محتوای پروتئین محلول برگ‌ها در شرایط تنش خشکی کمتر از شرایط عدم وجود تنش خشکی بود. کاهش محتوای پروتئین‌ها در شرایط تنش خشکی مربوط به افزایش تجزیه پروتئین‌ها در جهت تولید آمینواسیدهایی از قبیل پرولین بوده که سبب تنظیم اسمزی در شرایط خشکی می‌شوند. با این حال در این مطالعه با توجه به اینکه در شرایط شاهد مقدار پروتئین بیشتر از شرایط تنشی بود نتایج نشان داد در شرایط عدم وجود تنش خشکی میزان پروتئین در سطح تیمار سالیسیلیک اسید ۲ میلی‌مولار و به خصوص با کاربرد سودوموناس بیشتر از سایر تیمارها (۲۰/۴ میلی‌گرم بر گرم) بود و بین سطوح مختلف کودهای زیستی در سطح تیمار سالیسیلیک اسید ۲ میلی‌مولار اختلاف معنی‌داری وجود نداشت ولی با سایر تیمارهای کودهای زیستی در سطح تیمارهای سالیسیلیک اسید صفر و یک میلی‌مولار تفاوت معنی‌دار وجود داشت (جدول ۳). با این حال در شرایط عدم وجود تنش خشکی تیمار باسیلوس در سطح تیمار سالیسیلیک اسید یک میلی‌مولار دارای کم‌ترین میزان پروتئین محلول (۱۵/۲ میلی‌گرم بر گرم) بود. در شرایط تنش خشکی نیز مشاهده شد که در سطح تیمار سالیسیلیک اسید ۲ میلی‌مولار بیش‌ترین میزان پروتئین محلول به مقدار ۱۴/۸ میلی‌گرم بر گرم در تیمار کاربرد سودوموناس به دست آمد و این تیمار فقط با تیمار کاربرد باسیلوس در سطح تیمار سالیسیلیک اسید ۲ میلی‌مولار اختلاف معنی‌دار نداشت ولی با سایر تیمارها از این نظر دارای اختلاف معنی‌دار بود (جدول ۴). در شرایط تنش خشکی عدم کاربرد کودهای زیستی در تیمار شاهد منجر به کاهش میزان پروتئین محلول شد به طوری که کم‌ترین میزان پروتئین محلول در شرایط تنش خشکی در تیمار عدم کاربرد سالیسیلیک اسید به همراه کاربرد باکتری سودوموناس به میزان ۹/۱ میلی‌گرم بر گرم بود (جدول ۴). این نتایج بیان می‌دارد که در شرایط تنش خشکی کاربرد توأم باکتری‌های باسیلوس و سودوموناس به همراه کاربرد سالیسیلیک اسید سبب هم‌افزایی اثر آن‌ها در افزایش محتوای پروتئین محلول در برگ‌های لوبیا شده است به طوری که در شرایط تنش خشکی بالاترین میزان پروتئین محلول در تیمار کاربرد سالیسیلیک اسید ۲ میلی‌مولار به همراه کاربرد این دو باکتری بود و در این سطح تیماری از سالیسیلیک

اسید با تیمار عدم کاربرد کودهای زیستی دارای تفاوت معنی‌دار بودند. به عقیده یزدان پناه و همکاران (۱۳۸۸) تغییر در محتوای پروتئین‌های محلول و همچنین پرولین از سازوکارهای گیاه برای تحمل تنش خشکی می‌باشد. گیاه برای افزایش تحمل در برابر تنش خشکی به ناچار برخی از پروتئین‌های خود را در جهت تولید اسیدهای آمینه شکسته و در نتیجه محتوای پروتئین‌های محلول در گیاه کاهش یافته که کاربرد خارجی سالیسیلیک اسید منجر با اثر آنتی اکسیدانی خود بخشی از فعالیت‌های آنتی اکسیدانی گیاه را بر عهده گرفته و به دنبال آن میزان تجزیه پروتئین‌ها در جهت سنتز اسید آمینه پرولین نیز کاهش می‌یابد. افزایش پرولین در طی تنش ممکن است نتیجه تجزیه پروتئین‌ها و همچنین کاهش استفاده از آن‌ها به دلیل کاهش رشد گیاه باشد (امانی و همکاران، ۱۳۹۶).

فعالیت آنزیم کاتالاز

نتایج تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد اثر سال، تنش خشکی، کودهای زیستی، سالیسیلیک اسید، برهم‌کنش تنش خشکی × سالیسیلیک اسید، تنش خشکی × کودهای زیستی و برهم‌کنش سه‌گانه تنش خشکی × سالیسیلیک اسید × کودهای زیستی بر میزان فعالیت آنزیم کاتالاز معنی‌دار بود ولی اثر سایر تیمارها بر این صفت معنی‌دار نبود (جدول ۱). براساس نتایج حاصل از مقایسه میانگین اثرات متقابل سه‌گانه تنش خشکی × سالیسیلیک اسید × کودهای زیستی مشخص شد که به طور کلی در شرایط عدم کاربرد سالیسیلیک اسید میزان فعالیت این آنزیم در شرایط تنش خشکی بیشتر از شرایط عدم وجود تنش خشکی بود. در شرایط عدم وجود تنش خشکی نیز بیش‌ترین میزان فعالیت آنزیم کاتالاز در تیمار عدم کاربرد سالیسیلیک اسید و کاربرد باکتری باسیلوس به میزان ۲۲۸۳ نانومول بر دقیقه بر گرم به دست آمد حال آنکه افزایش غلظت کاربرد سالیسیلیک اسید به یک و دو میلی‌مولار منجر به کاهش میزان فعالیت این آنزیم شد به طوری که کم‌ترین میزان فعالیت این آنزیم در تیمار کاربرد سالیسیلیک اسید ۲ میلی‌مولار و عدم کاربرد هر یک از کودهای زیستی به میزان ۱۰۶۸ نانومول بر دقیقه بر گرم شد. همچنین در شرایط وقوع تنش خشکی نیز افزایش غلظت کاربرد سالیسیلیک اسید منجر به کاهش میزان فعالیت این آنزیم شد. براساس نتایج حاصل از این مطالعه مشخص شد که بیش‌ترین میزان فعالیت آنزیم کاتالاز در شرایط تنش خشکی در تیمار عدم کاربرد سالیسیلیک اسید و در سطح کاربرد باسیلوس به میزان ۳۰۱۰ نانومول بر دقیقه بر گرم به دست آمد در حالی که کم‌ترین میزان فعالیت آن در تیمار کاربرد سالیسیلیک اسید ۲ میلی‌مولار به همراه باکتری سودوموناس به میزان ۹۹۸ نانومول بر دقیقه بر گرم بود (جدول ۳).

سوپراکسید دیسموتاز

در این مطالعه مشاهده شد که اثر سال، تنش خشکی، سالیسیلیک اسید، کودهای زیستی و برهم‌کنش سه‌گانه تنش خشکی × سالیسیلیک اسید × کودهای زیستی بر میزان فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز معنی‌دار شد (جدول ۱). مقایسه

میانگین داده‌ها نشان داد بیش‌ترین میزان فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز به میزان ۸۱۴ نانومول بر دقیقه بر گرم در تیمار بدون تنش خشکی به همراه عدم محلول‌پاشی سالیسیلیک اسید و با کاربرد باکتری سودوموناس بود. این در حالی بود که کم‌ترین میزان فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز به میزان ۳۴۷ نانومول بر دقیقه بر گرم در تیمار تنش خشکی و کاربرد سالیسیلیک اسید ۲ میلی‌مولار و عدم کاربرد باسیلوس و سودوموناس بود (جدول ۳). در این مطالعه فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت تحت اثر تنش خشکی قرار گرفت و خشکی منجر به کاهش میزان فعالیت این آنزیم‌ها شد. نتایج برخی دیگر از محققین نیز نشان داد تنش خشکی منجر به کاهش میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت شده است (دولتمند شهری و حق شناس، ۱۳۹۶). آن‌ها همچنین عنوان داشتند کاربرد خارجی سالیسیلیک اسید میزان فعالیت آنزیم‌های کاتالاز و سوپراکسید دیسموتاز را در شرایط وقوع تنش خشکی افزایش داد. در تحقیقی که Saglam و همکاران (۲۰۱۱) انجام دادند به این نتیجه رسیدند که تنش خشکی منجر به کاهش میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت در لوبیا می‌گردد. این در حالی است که کاربرد خارجی سالیسیلیک اسید منجر به بهبود شرایط آنتی‌اکسیدانی گیاه شده و کارایی گیاه را در برابر تنش خشکی افزایش می‌دهد. البته بایستی در نظر داشت که کاربرد اسید سالیسیلیک در غلظت‌های مختلف دارای اثرات متفاوتی بر سیستم آنتی‌اکسیدانی گیاه می‌گردد (Iqbal et al., 2006). همچنین امینی و همکاران (۱۳۸۷) گزارش کردند تنش خشکی با اثر منفی بر فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت سبب کاهش کارایی گیاه در مواجهه با تنش می‌گردد. افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در شرایط تنش‌ها برای زنده ماندن سلول و ادامه یافتن فعالیت ارگانسم گیاه، حیاتی می‌باشد. بایستی در نظر داشت که در تنش ملایم میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت تا حدودی افزایش یافته و با افزایش شدت تنش خشکی و در نتیجه غلبه رادیکال‌های آزاد تولید شده در شرایط تنشی بر سیستم پالایش گونه‌های فعال اکسیژن میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت کاهش می‌یابد. در این مطالعه نیز چون فقط یک سطح تنش خشکی وجود داشت نتایج نشان داد که اعمال تنش خشکی منجر به کاهش میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت شده که به احتمال زیاد شدت تنش از حد متوسط بیشتر بوده که منجر به این شکست در سیستم آنتی‌اکسیدانت‌های آنزیمی گیاه شده و در نتیجه فعالیت این آنزیم‌ها را کاهش داده است. از طرفی محلول‌پاشی سالیسیلیک اسید و همچنین کاربرد کودهای زیستی تا حدودی اثرات تنش را کاهش داده و شدت تنش را به حد متوسط رسانده و منجر به افزایش میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت شده است. در این زمینه نادری (۱۳۹۲) نیز عنوان نمودند که کاربرد کودهای زیستی سبب بهبود فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت شده است که با یافته‌های حاصل از این مطالعه مطابقت داشت.

عملکرد دانه

نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد با توجه به اینکه میزان عملکرد دانه در سطح تنش خشکی کمتر از عدم تنش خشکی بود، در شرایط خشکی و عدم وجود تنش خشکی میزان عملکرد دانه با کاربرد کودهای زیستی افزایش یافت. نتایج نشان داد سودوموناس میزان عملکرد دانه را در تیمارهای وجود تنش خشکی و عدم وجود تنش خشکی به ترتیب به میزان ۱۴۰۳ و ۲۹۳۷ کیلوگرم بر هکتار رساند، در حالی که میزان عملکرد دانه در این دو سطح از تنش خشکی و در تیمار عدم کاربرد کودهای زیستی به ترتیب ۱۰۰۱ و ۲۲۵۴ کیلوگرم در هکتار بود و در سطح تیمار شاهد کاهش عملکرد دانه ۵۵ درصد بود. همچنین نتایج نشان داد میزان عملکرد دانه در تیمار کاربرد باسیلوس در تیمارهای وجود تنش خشکی و عدم وجود تنش خشکی به ترتیب ۱۳۱۶ و ۲۶۱۶ کیلوگرم در هکتار بود (جدول ۴). تنش خشکی با تحت اثر قرار دادن شرایط فیزیولوژیکی گیاه، اعم از ظرفیت فتوسنتزی، وضعیت آبی گیاه و فعالیت آنزیم‌ها عملکرد لوبیا را تحت اثر قرار می‌دهد. در مطالعه ای مشابه که شوقیان و روزبهانی (۱۳۹۶) روی لوبیا انجام دادند به این نتیجه رسیدند که تنش خشکی منجر به کاهش عملکرد دانه در لوبیا شده و کاربرد خارجی سالیسیلیک اسید با اثر بر بهبود روابط آبی گیاه منجر به افزایش عملکرد دانه نسبت به تیمار عدم کاربرد آن شده است. در این مطالعه کاربرد باکتری‌های باسیلوس و سودوموناس در دو شرایط تنش و غیر تنش به ترتیب منجر به افزایش ۴۸ و ۵۳ درصدی میزان عملکرد دانه نسبت به عدم کاربرد آن‌ها شد. افزایش عملکرد دانه در شرایط تنشی به دلیل اثر این باکتری‌ها بر افزایش تحمل گیاه لوبیا نسبت به تنش خشکی می‌باشد. محققین دیگری نیز عنوان داشتند که کاربرد باکتری‌های محرک رشد در شرایط تنش خشکی منجر به القای بیشتر تحمل به خشکی در گیاهان زراعی شده و در نتیجه میزان عملکرد دانه در شرایط نامساعد محیطی از قبیل تنش خشکی افزایش می‌یابد (Timmusk and Wanger, 1999). اثرات مفید باکتری‌های ازتوباکتر، آزوسپیریوم و سودوموناس ممکن است به خاطر مشارکت آن‌ها در افزایش رشد گیاه به واسطه جذب بیشتر مواد غذایی توسط گیاه منجر به بهبود فرآیند فتوسنتز و در نتیجه افزایش رشد و عملکرد گیاه شود.

جدول ۴: برهم‌کنش تنش خشکی و کودهای زیستی بر عملکرد دانه لوبیا

عملکرد دانه (کیلوگرم در هکتار)	کود زیستی	تنش
۲۲۵۴c	شاهد	شاهد
۲۶۱۶b	باسیلوس	
۲۹۳۷a	سودوموناس	
۱۰۰۱e	شاهد	تنش خشکی
۱۳۶۱d	باسیلوس	
۱۴۰۳d	سودوموناس	

نتیجه گیری

نتایج این مطالعه نشان داد اثر تیمار تنش خشکی، اسید سالیسیلیک، کودهای زیستی و همچنین برهم کنش آن‌ها بر ویژگی‌های فیزیولوژیکی از قبیل کلروفیل a, b، کل، محتوای نسبی آب برگ، محتوای پرولین، پروتئین محلول و آنزیم‌های کاتالاز و سوپراکسید دیسموتاز معنی‌دار شد. تنش خشکی منجر به افزایش محتوای پرولین و کاهش میزان پروتئین محلول و محتوای نسبی آب برگ‌ها شد در حالی که کاربرد سالیسیلیک اسید و کودهای زیستی در شرایط تنش خشکی منجر به بهبود این صفات گردید. میزان فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز نیز با کاربرد سالیسیلیک اسید و کودهای زیستی به میزان قابل توجهی افزایش یافت. در کل نتایج این مطالعه نشان داد که در شرایط تنش خشکی که ویژگی‌های فیزیولوژیکی گیاه در شرایط مطلوبی نیست، کاربرد سالیسیلیک اسید منجر به بهبود ویژگی‌های فیزیولوژیکی و افزایش فعالیت آنتی-اکسیدانی گیاه شده که در نهایت با بهبود این ویژگی‌های میزان عملکرد دانه نیز افزایش یافت. همچنین کاربرد کودهای زیستی باسیلوس و سودوموناس نیز منجر به بهبود ویژگی‌های فیزیولوژیکی گیاه و به دنبال آن افزایش عملکرد دانه لوبیا سفید شد ضمن اینکه بایستی در نظر داشت که وقوع تنش خشکی عملکرد دانه را حدود ۵۵ درصد کاهش داده و حتی الامکان نبایستی این گیاه در معرض تنش خشکی قرار گیرد.

منابع

- امام، ی.، رنجبری، ع.م. و بحرانی، م.ج. ۱۳۸۶. ارزیابی عملکرد دانه و اجزای آن در ژنوتیپهای گندم تحت تأثیر تنش خشکی پس از گلدهی. مجله علوم و فنون کشاورزی و منابع طبیعی، علوم آب و خاک. ۱۱(۱): ۳۱۷-۳۲۷.
- امانی، ن.، سهرابی، ی. و حیدری، غ. ۱۳۹۶. عملکرد و برخی خصوصیات فیزیولوژیک ذرت با کاربرد کودهای زیستی و شیمیایی تحت سطوح خشکی. نشریه دانش کشاورزی و تولید پایدار. ۲۷(۲): ۶۵-۷۹.
- امینی، ز.، حداد، ر. و مرادی، ف. ۱۳۸۷. بررسی اثر تنش کم‌آبی بر نحوه فعالیت آنزیمهای ضد اکسنده در مراحل رشد رویشی گیاه جو. مجله علوم و فنون کشاورزی و منابع طبیعی، ۴۶(۱): ۶۵-۷۴.
- دولتمند شهری، ن. و حق شناس، م. ۱۳۹۶. اثر مقادیر مختلف رطوبتی خاک در سطوح مختلف سالیسیلیک اسید بر فعالیت آنزیمی و ویژگی‌های مورفوفیزیولوژیکی یونجه. فصلنامه علمی پژوهشی فیزیولوژی گیاهان زراعی. ۹(۳۳): ۹۹-۱۱۸.
- سپهری، ع.، عباسی، ر و وکرمی، ا. ۱۳۹۳. اثر تنش خشکی و اسید سالیسیلیک بر عملکرد و اجزای عملکرد ژنوتیپ‌های لوبیا قرمز. مجله به زراعی کشاورزی. ۱۷(۲): ۵۰۳-۵۱۶.
- شوربایی، م.، گنجعلی، ع. و ابریشم چی، پ. ۱۳۹۱. بررسی تأثیر اسید سالیسیلیک بر فعالیت آنزیمها و ترکیبات آنتیاکسیدانی ارقام نخود *Cicer arietinum* L. در مواجهه با تنش خشکی. مجله تنشهای محیطی در علوم زراعی. ۵(۱): ۴۱-۵۴.
- شوقیان، م. روزبهانی، آ. ۱۳۹۶. اثر محلولپاشی سالیسیلیک اسید بر صفات مورفوفیزیولوژیکی، عملکرد و اجزای عملکرد لوبیا قرمز در شرایط تنش خشکی. فصلنامه علمی پژوهشی فیزیولوژی گیاهان زراعی. ۹(۳۴): ۱۳۱-۱۴۸.

- کامل منش، م.، زاده باقری، م. و جوانمردی، ش. ۱۳۸۹. اثر تنش خشکی بر تغییرات محتوای یونی، میزان کربوهیدراتهای محلول، محتوای کلروفیل و محتوای آب نسبی در ژنوتیپهای لوبیا سفید. دومین همایش ملی کشاورزی و توسعه پایدار، فرصت‌ها و چالش‌های پیشرو. دانشگاه آزاد اسلامی شیراز
- محمدی، ع.، اصغری، ح.ر. و غلامی، ا. ۱۳۹۲. بررسی امکان استفاده از کود بیولوژیک میکوریزا در تأمین بخشی از فسفر در زراعت نخود. نشریه پژوهش‌های زراعی ایران. ۱۱(۴): ۶۵۸-۶۶۵.
- نادری، ط. ۱۳۹۲. تأثیر کودهای بیولوژیکی و شیمیایی بر صفات کمی و کیفی ذرت (*Zea mays* L.) تحت تنش خشکی. پایان نامه کارشناسی ارشد. دانشگاه کردستان
- یزدان پناه، س.، عباسی، ف. و باقی زاده، ا. ۱۳۸۸. اثر تیمار اسید سالیسیلیک و اسید آسکوربیک بر میزان پرولین، قند و پروتئین در گیاه مرزه تحت تنش خشکی. اولین همایش ملی تشنه‌های محیطی در علوم کشاورزی، دانشگاه بیرجند.
- Abbadi, A., Shekari, F. and Mustafavi, S. H. 2015.** Effect of paclobutrazol and salicylic acid on antioxidants enzyme activity in drought stress in wheat. *Idesia*. 33: 5-13.
- Arnon, D. J. 1956.** Chlorophyll absorption spectrum and quantitative determination. *Biochemical and Biophysical Acta*. 20: 449-461
- Bates, L. S., Waldren, R. P. and Teare, I. D. 1973.** Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant and Soil*. 39: 205-207.
- Bayoumi, T., Eid, M. H., and Metwali, E. 2010.** Application of physiological and biochemical indices as a screening technique for drought tolerance in wheat genotypes. *African Journal of Biotechnology*. 7:2341-2352.
- Bradford, M.M. 1976.** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Journal of Analytical Biochemistry*. 72: 248-254.
- Chance, B., and Maehly, A.C. 1955.** Assay of catalase and peroxidases. *Methods Enzymol*. 2: 764-775.
- Farooq, M., Wahid, A., Kobayashi, N., Fujita, D. B. S. M. A., & Basra, S. M. A. 2009.** Plant drought stress: effects, mechanisms and management. *Sustainable agriculture*. 153-188.
- Ghai, N. Setia, R. C., Setia, N. 2002.** Effect of paclobutrazol and salicylic acid on chlorophyll content, hill activity and yield components in *Brescia napus* L. (cv. GSL-1) *Phytomorphol*. 52: 83-87.
- Hasegawa, P. M., Bressan, R. A., Zhu, J.K. and Bohnert, H. J. 2000.** Plant cellular and molecular responses to high salinity. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. 51: 463-499.
- Hosseini, S., Kafi, M. and Arghavani, M. 2015.** The effect of Salicylic acid on physiological characteristics of *Lolium perenne* cv. "Numan" under drought stress. *International Journal of Agronomy and Agricultural Research*. 7: 7-14.
- Iqbal, M., Ashraf, M. Jamil, A. and Shafiq, U. R. M. 2006.** Does seed priming induce changes in the levels of some endogenous plant hormones in hexaploid wheat plant under salt stress? *Journal of Integrative Plant Biology*. 48(2): 181-189.
- Khosravi, S., Baghizadeh, A. and Nezami, M. T. 2011.** The salicylic acid effect on the *Salvia officianlis* L. sugar, protein and proline contents under salinity (NaCl) stress. *Journal Stress Physiology Biochemistry*. 7: 80-87.
- Lawlor, D. W. and Cornic, G. 2002.** Photosynthetic carbon assimilation and associated metabolism in relation to water deficits in higher plants. *Plant cell and Environment*. 25: 275-294.
- Mashaallah Hosseini, S., & Amini, Z. 2019.** Yield and yield components of white bean (*Phaseolus vulgaris* L.) cultivars affected by boric acid rates and methods of application. *Journal of Plant Nutrition*. 42(11-12), 1378-1385.
- Nezhad, T. S., Mobasser, H. R. Dahmardeh, M. and Karimian, M. 2014.** Effect of foliar application of salicylic acid and drought stress on quantitative yield of mungbean (*Vigna radiate* L.). *Journal of Novel Applied Sciences*. 3(5):512-515

Pospisilova, J. 2011. Responses of Transgenic Tobacco Plants with Increased Proline Content to Drought and/or Heat Stress. *American Journal of Plant Sciences*. 2: 318–324.

Saglam, A., Saruhan, N., Terzi, R. and Kadioglu, A. 2011. The relations between antioxidant enzymes and chlorophyll fluorescence parameters in common bean cultivars differing in sensitivity to drought stress. *Russian Journal of Plant Physiology*. 58(1): 60–68

Sanchez, F. J., Manzanares, M., de Andres, E. F., Tenorio, J. L. and Ayerbe, L. 1998. Turgor maintenance, osmotic adjustment and soluble sugar and proline accumulation in 49 pea cultivars in response to water stress. *Field Crops Research*. 59: 225–235.

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

Timmusk, S. and Wagner, E.G.H. 1999. The plant-growth-promoting rhizobacterium *Paenibacillus polymyxa* induces changes in *Arabidopsis thaliana* gene expression: a possible connection between biotic and abiotic stress responses. *Molecular Plant–Microbe Interactions* 12: 951–959.

Vassilev, N., and Vassilev, M. 2003. Biotechnological solubilization of rock phosphate on media containing agro-industrial wastes. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 61- 435–440.

Waraich, E. A., Amad, R. Ashraf, M. Y. and Ahmad, M. 2011. Improving agricultural water use efficiency by nutrient management. *Acta Agriculturae Scandinavica, Section B - Soil and Plant Science*. 61(4): 291-304.

Yasar, F., Uzal, O. and Ozpay, T. 2010. Changes of the lipid peroxidation and chlorophyll amount of green bean genotypes under drought stress. *African Journal of Agricultural Research*. 5(19):2705-2709.