

اثر مقادیر مختلف رطوبتی خاک در سطوح مختلف سالیسیلیک اسید بر فعالیت آنزیمی و

ویژگی‌های مورفوفیزیولوژیکی یونجه

نرگس دولتمند شهری^{۱*} و مسعود حق‌شناس^۲

(۱) دانش آموخته کارشناسی ارشد گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشگاه کردستان، سنندج، ایران.
(۲) دانش آموخته کارشناسی ارشد گروه تولیدات گیاهی، واحد مهاباد، دانشگاه آزاد اسلامی، مهاباد، ایران.

* نویسنده مسئول: nargesdolatmand@yahoo.com

تاریخ پذیرش: ۹۵/۰۶/۱۵

تاریخ دریافت: ۹۵/۰۳/۱۹

چکیده

به منظور بررسی اثر مقادیر مختلف رطوبتی خاک در سطوح مختلف سالیسیلیک اسید بر فعالیت آنزیم‌ها و ویژگی‌های مورفوفیزیولوژیکی یونجه، آزمایشی به صورت فاکتوریل در قالب طرح بلوک کامل تصادفی با سه تکرار در ایستگاه تحقیقاتی کشاورزی دانشگاه کردستان، در تابستان سال ۱۳۹۲ به صورت مزرعه‌ای طراحی و اجرا شد. عامل اول شامل دو سطح آبیاری نرمال (۱۰۰ درصد ظرفیت زراعی) و تنش خشکی (۵۰ درصد ظرفیت زراعی) و عامل دوم شامل پنج سطح محلول‌پاشی سالیسیلیک اسید (صفر، ۷، ۲۱، ۳۵ و ۴۹ درصد) بود. نتایج بیانگر اثر معنی‌دار برهمکنش تنش خشکی و محلول‌پاشی سالیسیلیک اسید بر عملکرد بیولوژیک، تعداد برگ، سطح برگ، رنگیزه‌های فتوسنتزی ($P < 0/01$)، فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز (APX) و بیوسنتز اسید آمینه پرولین ($P < 0/05$) بود. کاربرد سالیسیلیک در هر سطح آبیاری باعث بهبود رشد و افزایش فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز و محتوای پرولین برگ شد، که این اثر مثبت نسبت به تیمار شاهد در شرایط تنش بیش‌تر بود، به طوری که عملکرد خشک علوفه در سطح آبیاری نرمال و تنش خشکی با ۷۲۸۹ و ۵۸۷۱ کیلوگرم در هکتار به ترتیب به تیمارهای سطوح ۲۱ و ۳۵ درصد سالیسیلیک اسید اختصاص یافت که نسبت به تیمار شاهد به ترتیب افزایش ۱۹/۹۳ و ۵۳/۶۲ درصدی داشتند. به طور کلی، تنش خشکی باعث کاهش عملکرد دانه و صفات وابسته به آن شد، که کاربرد سالیسیلیک اسید با اثر بر افزایش سنتز پرولین، بهبود پتانسیل آبی گیاه و فتوسنتز تا حدودی توانست کاهش عملکرد محصول را جبران کند.

واژه‌های کلیدی: آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی، رادیکال‌های آزاد و عملکرد بیولوژیک.

مقدمه

یونجه (*Medicago sativa* L.) یکی از مهم‌ترین گیاهان علوفه‌ای و جزء خانواده نیامداران می‌باشد که غنی از مواد غذایی بوده و از لحاظ زراعی و محیط زیست اهمیت زیادی دارد (Azarfard and others, 2008). یونجه به دلیل سیستم ریشه‌ای عمیق و مستقیم به عنوان گیاهی متحمل به خشکی با توانایی بقاء در ماه‌های خشک برای مناطق کم آب محسوب می‌شود (Lindenmayer *et al.*, 2007). با این وجود برای تولید یونجه با عملکرد بالا نیاز به مقادیر زیادی آب است (Shalhevet, 1993). زیرا تنش کمبود آب به عنوان مهم‌ترین فاکتور محدودیت فیزیولوژیکی، رشد و نمو، عملکرد و کیفیت علوفه را تحت تأثیر قرار می‌دهد. تنش خشکی با کوتاه کردن دوره‌ی رشد گیاه (Muller *et al.*, 2011) و پیری زودرس برگ (Gregersen *et al.*, 2013) ظرفیت فتوسنتزی را تحت تأثیر قرار داده و با تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن همچون آنیون سوپراکسید، پراکسید هیدروژن و رادیکال‌های با بنیان هیدروکسیل (Zhu, 2000) باعث ایجاد تنش اکسیداتیوی در سلول‌های گیاهی شده که خود منجر به تخریب سامانه فتوسنتزی، مهار فرآیندهای متابولیکی، کلروز، پراکسیداسیون لیپیدها، تغییر در نفوذپذیری غشاء و نشت یون‌ها می‌گردد (جعفری و همکاران، ۱۳۸۶). در مقابل گیاهان با دارا بودن سیستم‌های ضد اکسایشی آنزیمی (سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز، پراکسیداز، آسکوربیت پراکسیداز و گلوتاتیون ردوکتاز)، غیر آنزیمی (ترکیبات فنلی، اسید آسکوربیک، گلوتاتیون، کارتنوئیدها و آلفا-توکوفرول)، آنیون‌ها، قندها و اسیدهای آمینه نظیر پرولین، ساختار غشاء و قسمت‌های مختلف سلول را در برابر تنش اکسایشی تا حدودی مقاوم می‌کنند (Wei *et al.*, 2015). در شرایط تنش شدید، خودتنظیمی گیاه مختل شده و عدم کارایی سیستم آنتی‌اکسیدانی موجب اثر نامطلوب بر فیزیولوژی گیاه و خسارت اکسیداتیو می‌گردد. بنابراین، اعمال اسید سالیسیلیک خارجی به عنوان یک مولکول پیام‌رسان سلولی، می‌تواند نقش مهمی در القای تحمل به تنش‌های زیستی و غیرزیستی همچون تنش شوری (Khan *et al.*, 2014)، خشکی (Yazdanpanah *et al.*, 2011) و دمایی (Wang *et al.*, 2010) ایفا کند. سالیسیلیک اسید به عنوان یک ماده تنظیم کننده فرایندهای فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی (Nazar *et al.*, 2011) با اثر بر آنزیم‌های آنتی اکسیدانی و همچنین تنظیم‌کننده‌های 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 قره داغ (*Nitraria shoberi* L. (بیان و همکاران، ۱۳۹۲)، نخود (شوریابی و همکاران، ۱۳۹۱) و جو (Habibi, 2012) وجود دارد. همچنین نتایج بررسی‌های محققان بر گندم نشان داد که گیاهان محلول‌پاشی شده با ۲۰۰ میلی‌گرم بر لیتر سالیسیلیک اسید از مقاومت بالایی در برابر نوسانات تنش آبی برخوردار بودند (Noreen *et al.*, 2017). در پژوهشی دیگر بر گندم، کاربرد سالیسیلیک با افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی همچون آسکوربات پراکسیداز، سوپر اکسید دیسموتاز و کاتالاز

سبب کاهش مقدار مالون دی‌آلدهید و پراکسید هیدروژن تحت تنش خشکی گردید (Abbadi et al., 2015). محققان طی بررسی‌هایی بر گیاه چمن چچم (*Lolium perenne* cv.) 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). پژوهشگران در تحقیقات خود بر یونجه رقم جیرفت نتیجه گرفتند که، تنش خشکی منجر به کاهش ویژگی‌های مرفولوژیکی و عملکرد علوفه تولیدی گردید (Afsharmanesh, 2009). در بررسی دیگر محققان بر روی پنج رقم یونجه، تأخیر در آبیاری با کاهش ارتفاع ساقه، سطح برگ و وزن تک ساقه باعث کاهش عملکرد علوفه خشک در تمامی ارقام گردید (بهنام‌فر و همکاران، ۱۳۹۴). با توجه به اینکه تحقیقات متعددی در زمینه اثر تنش خشکی بر رشد و نمو یونجه انجام گرفته، اما مطالعات اندکی در زمینه بررسی اثر محلول‌پاشی سالیسیلیک اسید بر گیاهان علوفه‌ای به ویژه یونجه تحت تنش خشکی در دسترس می‌باشد. در همین راستا نتایج بررسی‌های محققان بر تولید علوفه ذرت نشان داد که کاربرد سالیسیلیک اسید منجر به افزایش محتوای کلروفیل، محتوای نسبی آب، وزن تر و خشک علوفه ذرت گردید (نعمت‌اللهی و همکاران، ۱۳۹۲). با توجه به اهمیت گیاهان علوفه‌ای و همچنین مشکلات کمبود آب برای تولید حداکثر عملکرد علوفه، چنانچه سالیسیلیک اسید بتواند در مراحلی که گیاه دچار تنش شده با سنتز اسید آمینه‌ها و تقویت سیستم آنتی‌اکسیدانی سبب افزایش تحمل و یا بهبود رشد گیاه شود، می‌توان با مصرف این ماده از کاهش عملکرد تا حدودی جلوگیری کرد. بنابراین مهم‌ترین هدف از پژوهش حاضر بررسی اثر مقادیر مختلف رطوبتی خاک در سطوح مختلف سالیسیلیک اسید بر فعالیت آنزیم‌ها و ویژگی‌های مورفوفیزیولوژیکی یونجه بود.

مواد و روش‌ها

شرایط رشدی و تیمارهای مورد بررسی

این آزمایش در تابستان سال ۱۳۹۲ به صورت فاکتوریل در قالب طرح بلوک کامل تصادفی با سه تکرار تحت شرایط مزرعه‌ای در ایستگاه تحقیقاتی کشاورزی دانشگاه کردستان واقع در روستای دوشان با ارتفاع ۱۳۰۰ متر از سطح دریا و عرض جغرافیایی ۳۵ درجه و ۲۴ دقیقه شمالی و طول ۴۷ درجه و دو دقیقه شرقی، طراحی و اجرا شد. فاکتور اول شامل آبیاری نرمال (۱۰۰ درصد ظرفیت زراعی) و تنش خشکی (۵۰ درصد ظرفیت زراعی) و فاکتور دوم پنج سطح محلول‌پاشی سالیسیلیک اسید (SA) شامل غلظت‌های ۰، ۷، ۲۱، ۳۵ و ۴۹ درصد به همراه یک تیمار شاهد (بدون کاربرد سالیسیلیک اسید) بود. قبل از اجرای آزمایش نمونه‌هایی از عمق ۳۰-۳۰ و ۶۰-۳۰ سانتی‌متری خاک مزرعه تهیه و ویژگی‌های شیمیایی و درصد عناصر موجود در خاک (لومی شنی)، تعیین و توصیه‌های کودی انجام شد (جدول ۱). در این نوع خاک در عمق

۳۰-۰ سانتی‌متری ظرفیت زراعی مزرعه ۲۱ درصد بود.

جدول ۱: ویژگی‌های فیزیکی شیمیایی خاک محل آزمایش

عمق (cm)	N (%)	P (mg/kg)	K (mg/kg)	pH	Ec (ds/m)	کربن آلی (%)	آهن (mg/kg)	مس (mg/kg)	روی (mg/kg)	شن (%)	لای (%)	رس (%)
۰-۳۰	۰/۰۷	۶/۸	۲۶۰	۸/۰۵	۰/۷۰	۰/۷۰	۹/۳۸	۱/۱۳	۶/۷	۴۴	۳۱	۲۵
۳۰-۶۰	۰/۱۰۵	۴/۷	۲۸۰	۸	۰/۸۰	۱/۰۵	۳/۴۸	۱/۱۷	۴/۵۸	۵۲	۲۸	۲۰

جهت تقویت و تأمین عناصر مورد نیاز بعد از شخم زدن توسط گاو آهن برگردان‌دار، بر اساس توصیه کودی آزمون خاک انجام شده، مقدار ۲۰۰ کیلوگرم در هکتار کود سوپر فسفات تریپل و مقدار ۱۰۰ کیلوگرم در هکتار کود سولفات پتاسیم به زمین داده شد و بعد از دیسک زدن زمین کرت‌هایی در ابعاد ۲ × ۲ مترمربع ایجاد شد. بذور یونجه رقم همدانی به مقدار پنج کیلوگرم در هکتار به صورت دستی در هر کرت در خرداد ماه کشت گردید. بعد از کاشت در مرحله اولیه رشد (جوانه‌زنی) مقدار ۱۳۰ کیلوگرم در هکتار کود نیتروژن از منبع کود اوره به عنوان استارتر به زمین داده شد. اولین آبیاری بلافاصله بعد از کشت و آبیاری‌های بعدی هر چهار روز یکبار برای کرت‌های آبیاری نرمال به صورت بارانی انجام شد. جهت اعمال تنش آبیاری ابتدا ظرفیت زراعی مزرعه اندازه‌گیری شد، به این صورت که قبل از کشت یکی از کرت‌های ۲×۲ را کاملاً پر از آب نموده و روی آن با پلاستیک پوشانده شد تا خاک کاملاً اشباع شود و بعد از مدت ۲۴ ساعت که آب خلل و فرج درشت خاک توسط نیروی ثقل خارج شد، نمونه خاکی پس از برداشت پلاستیک توزین گردید و در آون با درجه حرارت ۱۰۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت قرار داده شد. سپس نمونه با ترازوی دقیق وزن و میزان رطوبت تبخیر شده محاسبه شد. در هنگامی که پلاستیک از روی کرت برداشته شد ظرفیت زراعی با دستگاه رطوبت‌سنج دستی نیز اندازه‌گیری گردید تا دو روش با هم مقایسه شود به منظور این‌که تفاوت چندانی بین آن‌ها مشاهده نگردد. اعمال تیمار تنش ۵۰ درصد ظرفیت زراعی به این صورت انجام گرفت که رطوبت خاک پس از اینکه به میزان مورد نظر توسط کنترل رطوبت با دستگاه رطوبت سنج رسید، آبیاری انجام گیرد که در این شرایط دور آبیاری هر دو هفته یکبار برای کرت‌های تنش دیده در نظر گرفته شد. علف‌های هرز مزرعه نیز تا بسته شدن کانوپی به صورت دستی وجین شدند.

اندازه‌گیری‌ها

عملکرد بیولوژیکی (علوفه خشک)

جهت تعیین عملکرد علوفه خشک در مرحله ۲۵ درصد گل‌دهی، با استفاده از یک کوادرات به ابعاد ۵۰×۵۰ به صورت تصادفی در هر کرت آزمایشی، بوته‌های یونجه از سطح زمین قطع شده و پس از قرار دادن در آون با دمای ۷۵ درجه

سانتی گراد به مدت ۴۸ ساعت، وزن خشک بوته‌ها توزین شده و نسبت به سطح محاسبه گردید.

تعداد برگ در بوته

جهت تعیین تعداد برگ در هر بوته در مرحله گل‌دهی تعداد ده بوته از هر کرت را بعد حذف اثر حاشیه‌ای انتخاب و بعد از شمارش برگ‌ها و میانگین‌گیری از کل برگ‌های برداشت شده ۱۰ بوته، تعداد برگ در هر بوته ثبت گردید.

سطح برگ

سطح برگ ۱۰ بوته برداشت شده توسط دستگاه سطح برگ سنج (Li-Cor, Model 7 Li-1300; USA) اندازه‌گیری شد و بعد از میانگین‌گیری ۱۰ بوته برداشت شده به عنوان سطح برگ هر بوته ثبت گردید.

کلروفیل a و b و کل

جهت سنجش کلروفیل a، b و کلروفیل کل، از برگ‌های کاملاً توسعه یافته بالغ نمونه‌برداری و پس از هضم توسط استن ۸۰ درصد و سانتی‌فیوژ نمودن نمونه‌ها، مقدار جذب هر نمونه با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر (UV/VIS Lambda25) در طول موج‌های ۶۶۳/۲، ۶۴۶/۸ نانومتر به ترتیب برای کلروفیل a و b قرائت و بر اساس روابط ۱، ۲ و ۳ مقادیر رنگیزه‌ها برحسب میکروگرم بر گرم وزن تر محاسبه گردید (Lichtenthaler and Wellburn, 1983).

$$\text{Chlorophyll a} = (12.25 \times A_{663.2}) - (2.79 \times A_{646.8}) \quad \text{رابطه ۱:}$$

$$\text{Chlorophyll b} = (21.21 \times A_{646.8}) - (5.1 \times A_{663.2}) \quad \text{رابطه ۲:}$$

$$\text{Total Chlorophyll (a+b)} = (7.15 \times A_{663.2} + 18.71 \times A_{646.8}) \quad \text{رابطه ۳:}$$

محتوای نسبی آب (RWC)^۱

برای اندازه‌گیری محتوای نسبی آب چهار یا پنج قطعه از برگ تازه به قطر یک سانتی‌متر برش و توزین شدند (FW)^۲، سپس نمونه‌ها در پتری‌دیش همراه مقداری آب به مدت چهار ساعت در انکوباتور در دمای چهار درجه سانتی‌گراد قرار داده شده و مجدداً توزین شدند (TW)^۳ در انتها نمونه‌ها به مدت ۷۲ ساعت در آون در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد قرار داده و مجدداً توزین گردیدند (DW)^۴. سپس با استفاده از رابطه (۴) محتوای نسبی آب برگ محاسبه گردید (Ritchie et al., 1990).

^۱ Relative water content

^۲ Fresh Weight

^۳ Turgur Weight

^۴ Dry Weight

$$RWC = \frac{FW-DW}{TW-DW} \times 100$$

رابطه ۴:

استخراج عصاره گیاهی برای سنجش فعالیت آنزیمی

برای استخراج عصاره گیاهی از روش Kang و Saltveit (۲۰۰۲) با اندکی تغییرات، استفاده شد. بدین منظور ابتدا ۰/۵ گرم از بافت تر برگ به همراه سه میلی‌لیتر بافر تریس-اسید کلریدریک ۵۰ میلی‌مولار (pH=۷) (محتوی سه میلی‌مولار کلرید منیزیم (MgCl₂))، یک میلی‌مولار اتیلن دی‌آمین تترا استیک اسید (EDTA))، در هاون سرد ساییده شد. هموژنات حاصل به مدت ۱۰ دقیقه در دمای چهار درجه سانتیگراد با سرعت ۱۰۰۰۰ دور سانتریفیوژ (Hermle Z216, MK, Germany) گردید. سپس محلول رویی در فریزر ۲۶- درجه سانتی‌گراد جهت سنجش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی نگهداری شد.

سنجش فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز (APX, EC 1.11.1.11)

سنجش فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز با استفاده از روش Nakano و Asada (۱۹۸۱) انجام شد. مخلوط واکنش شامل ۲/۵ میلی‌لیتر بافر فسفات ۵۰ میلی‌مولار (pH=۷) (محتوی ۰/۱ میلی‌مولار EDTA، یک میلی‌مولار آسکوربات سدیم، ۰/۲ میلی‌لیتر پراکسید هیدروژن (H₂O₂) یک درصد و ۰/۱ میلی‌لیتر عصاره استخراجی) بود. فعالیت APX به صورت کاهشی در جذب طی یک دقیقه در طول موج ۲۴۰ نانومتر محاسبه شد. برای سنجش میزان فعالیت از ضریب خاموشی (2.8 mm⁻¹ cm⁻¹) و طبق رابطه ۵ استفاده شد.

رابطه ۵: Units (mM/min) = (doD/(min (slope)) × Vol. of assay (0.0001)) (Extinction coefficient (2.8))

پراکسیداسیون لیپید غشاء

اندازه‌گیری مقدار مالون‌دی‌آلدئید (MDA) به عنوان شاخص پراکسیداسیون لیپید غشاء طبق روش Heath و Packer (۱۹۶۸) صورت گرفت. بدین منظور ۰/۲ گرم از بافت تازه برگ‌گی توزین و در هاون چینی حاوی پنج میلی‌لیتر تری کلرواستیک اسید (TCA) ۰/۱ درصد سائیده شد. عصاره حاصل به مدت پنج دقیقه در ۱۰۰۰۰ دور سانتریفیوژ (Hermle Z216 MK; Germany) شد. روی یک میلی‌لیتر از محلول رویی حاصل از سانتریفیوژ، چهار میلی‌لیتر محلول کلرواستیک اسید ۲۰ درصد که حاوی ۰/۵ درصد تیو باربیتوریک اسید (TBA) بود اضافه شد. مخلوط حاصل به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتیگراد حمام آب گرم (بن ماری) حرارت داده شد. سپس نمونه‌ها بلافاصله در یخ سرد شد و دوباره مخلوط به مدت ۱۰ دقیقه در ۱۰۰۰۰ دور سانتریفیوژ گردید. شدت جذب این محلول با استفاده از اسپکتروفوتومتر (Perkin Elmer, Lambda 25, UV/VIS) در طول موج ۵۳۲ نانومتر خوانده شد. ماده مورد نظر برای جذب در این طول موج کمپلکس قرمز (TBA-MDA) است، جذب بقیه رنگیزه‌های غیر اختصاصی در ۶۰۰ نانومتر تعیین و از این

مقدار کسر گردید. برای محاسبه غلظت مالون دی آلدئید از ضریب خاموشی ($155 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) و با استفاده از رابطه ۶ محاسبه شد.

رابطه ۶: $\text{MDA } (\mu\text{mol g}^{-1} \text{ Fw}) = [\text{A}532 - \text{A}600 / 155] \times 1000$

پرولین

برای سنجش میزان پرولین ۰/۱ گرم از بافت تر برگ را در ۱۰ میلی لیتر محلول سه درصد اسید سولفوسالیسیلیک ساییده و عصاره حاصل به مدت ۱۵ دقیقه در ۴۰۰۰ دور سانتریفیوژ (Hermle Z216 MK) گردید. سپس دو میلی لیتر از مایع رویی را با دو میلی گرم معرف نین هیدرین و دو میلی لیتر اسید استیک خالص مخلوط کرده و یک ساعت در دمای ۱۰۰ درجه سانتی گراد حمام آب گرم قرار گرفت. بعد از این مدت، جهت قطع انجام کلیه واکنش‌ها، لوله‌های محتوی مخلوط را در حمام یخ، سرد گردید، سپس چهار میلی لیتر تولوئن به مخلوط اضافه گردید و لوله‌ها میکس شده بعد از ۱۵-۲۰ ثانیه، دو لایه کاملاً مجزا در آن‌ها تشکیل شدند. از لایه رنگی فوقانی که حاوی تولوئن و پرولین بود، برای اندازه‌گیری غلظت پرولین استفاده گردید. جذب مقدار مشخصی از این ماده رنگی در طول موج ۵۲۰ نانومتر تعیین شد و مقدار پرولین در هر نمونه با استفاده از منحنی استاندارد، تعیین گردید (Bates *et al.*, 1973).

محاسبات آماری

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها با استفاده از نرم‌افزاری آماری SAS 9.2 و آزمون مقایسه میانگین داده‌ها با استفاده از روش دانکن در سطح احتمال پنج درصد انجام گرفت. نمودارها نیز در برنامه اکسل ترسیم گردید.

نتایج و بحث

عملکرد علوفه خشک

با توجه به نتایج جدول تجزیه واریانس داده‌ها، عامل‌های اصلی سالیسیلیک اسید، تنش خشکی و برهمکنش این دو عامل اثر معنی‌داری در سطح احتمال یک درصد بر عملکرد خشک علوفه داشتند (جدول ۲). نتایج مقایسه میانگین برهمکنش سالیسیلیک اسید در سطوح آبیاری نشان داد که در هر دو سطح آبیاری سالیسیلیک اسید اثر مثبت و معنی‌داری بر عملکرد علوفه خشک یونجه داشت، به طوری که در شرایط آبیاری کامل (۱۰۰ درصد ظرفیت مزرعه‌ای) افزایش غلظت سالیسیلیک اسید تا ۲۱ درصد منجر به بیش‌ترین عملکرد علوفه خشک به میزان ۷۲۸۹ کیلوگرم در هکتار نسبت به سایر ترکیب‌های تیماری گردید که این مقدار نسبت به تیمار شاهد افزایش ۱۹/۹۳ درصدی داشت. در همین سطح آبیاری با کاربرد غلظت‌های بیش‌تر از ۲۱ درصد سالیسیلیک اسید عملکرد علوفه خشک کاهش یافت، طوری که سطح ۴۹ درصد سالیسیلیک اسید تفاوت معنی‌داری با تیمار شاهد نداشت.

جدول ۲: نتایج تجزیه واریانس اثر سطوح آبیاری و سالیسیلیک اسید بر ویژگی‌های مورفوفیز یولوژیکی و فعالیت آنزیمی

یونجه رقم همدانی

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات		
		عملکرد علوفه خشک	سطح برگ	تعداد برگ
کلروفیل a	کلروفیل b	کلروفیل a	کلروفیل b	کلروفیل b
تکرار (بلوک)	۲	۳۵۳۷۳۲/۳	۱۳۹۴/۶	۲۹۲/۹۳
سطوح آبیاری	۱	۲۱۲۷۹۶۳۰/۵ ^{**}	۴۵۱۴۱۳۳ ^{**}	۳۰۴۶۱۷/۶ ^{**}
سالیسیلیک اسید (SA)	۴	۴۲۴۷۴۳۸/۸ ^{**}	۶۳۹۸/۶ ^{**}	۶۹۷۱/۶ ^{**}
سطوح آبیاری در SA	۴	۱۲۶۲۰۸۲/۸ [*]	۲۹۷۱/۱ ^{**}	۳۷۲۵/۷ ^{**}
خطای کل	۱۸	۳۲۹۲۲۵/۳	۵۰۲/۰۰۴	۳۳۹/۲۳
ضریب تغییرات (%)		۱۰/۵۱	۹/۲۹	۸/۲۴

ادامه جدول ۲: نتایج تجزیه واریانس اثر سطوح آبیاری و سالیسیلیک اسید بر ویژگی‌های مورفوفیز یولوژیکی و فعالیت

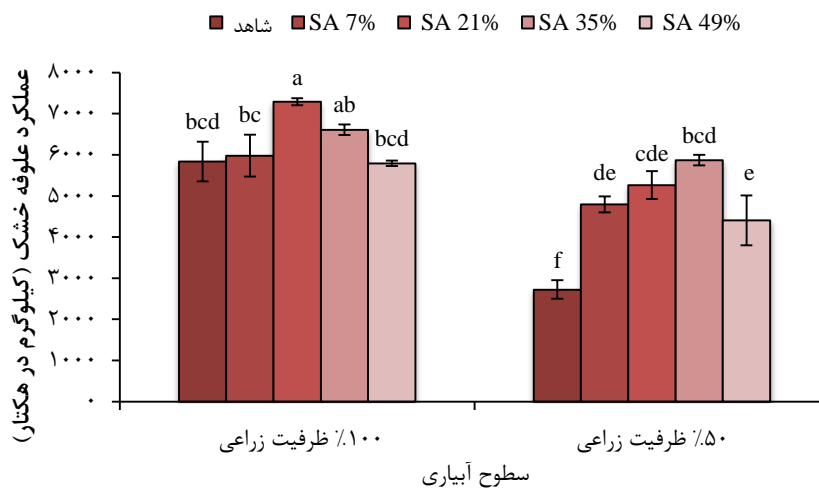
آنزیمی یونجه رقم همدانی

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات		
		کلروفیل کل	محتوای نسبی آب	آنزیم آسکوربات پراکسیداز
مالون دی آلدید	پرویلین	مالون دی آلدید	پرویلین	مالون دی آلدید
تکرار (بلوک)	۲	۰/۳	۰/۲۶	۸/۵۸
سطوح آبیاری	۱	۲۱/۳۵ ^{**}	۲۰۴/۷ ^{**}	۳۱۹۹/۲ ^{**}
سالیسیلیک اسید (SA)	۴	۶/۳۶ ^{**}	۸۳/۱ ^{**}	۴۵/۴۵ ^{**}
سطوح آبیاری در SA	۴	۰/۶۳ ^{**}	۸/۴۸ [*]	۱۹/۳۳ [*]
خطای کل	۱۸	۰/۱۱	۲/۱۴	۴/۶۱
ضریب تغییرات (%)		۶/۵۳	۸/۶۶	۵/۹۳

ns, **, * به ترتیب غیر معنی‌دار و معنی‌دار در سطوح احتمال پنج و یک درصد.

تحت شرایط تنش خشکی (۵۰ درصد ظرفیت زراعی) نیز افزایش غلظت سالیسیلیک اسید تا ۳۵ درصد منجر به افزایش عملکرد علوفه خشک گردید، طوری که نسبت به تیمار شاهد افزایشی ۵۳/۶۲ درصدی و معنی‌داری داشت، اما با افزایش غلظت به ۴۹ درصد سالیسیلیک اسید عملکرد علوفه خشک نسبت به غلظت ۳۵ درصد، کاهش معنی‌دار و نسبت به تیمار شاهد افزایش ۳۸/۲۰ درصدی و معنی‌داری در همین سطح آبیاری داشت (شکل ۱). طی بررسی‌هایی بر گیاه یونجه، تولید ماده خشک یونجه تحت خشکی شدید، متوسط و کم به ترتیب ۱/۴۶، ۱/۶۷ و ۲/۳۳ تن بر هکتار بود (Afsharmanesh, 2009). در پژوهشی دیگر نیز بر یونجه عملکرد علوفه خشک تحت تنش خشکی کاهش معنی‌داری داشت (اسیلان و جاجیلویی، ۱۳۸۹) که با نتایج این بررسی مبنی بر کاهش ماده خشک گیاه با افزایش تنش خشکی مطابقت دارد. تنش خشکی با تحت تأثیر قرار دادن شرایط فیزیولوژیکی گیاه، اعم از ظرفیت فتوسنتزی، وضعیت آبی گیاه، فعالیت آنزیم‌ها و میزان ذخیره کربوهیدرات‌ها رشد گیاه را تحت تأثیر قرار می‌دهد (Colom and Vazzana, 2003; Jaleel et al., 2007). در مقابل سالیسیلیک در شرایط محدودیت دسترسی به آب با غلبه بر روند کاهش شدید عملکرد و

افزایش غلظت کلروفیل (Habibi, 2012) به ثبات فتوسنتز در این شرایط کمک کرده و در نتیجه موجب افزایش رشد و در نهایت افزایش عملکرد ماده خشک گیاه (شکل ۱) گردید. نتایج بررسی‌های محققان نشان می‌دهد که کاربرد سالیسیلیک اسید تا حدودی با کاهش اثر تنش خشکی موجب بهبود عملکرد علوفه تر و خشک هیبریدهای ذرت شیرین گردید (جیب پور و همکاران، ۱۳۹۴)، که با نتایج حاصل از این بررسی همخوانی دارد.



شکل ۱: مقایسه میانگین برهمکنش سالیسیلیک اسید در سطوح آبیاری بر عملکرد علوفه خشک یونجه رقم همدانی (حروف غیر مشابه و میله‌های روی هر ستون (Error Bars) به ترتیب بیانگر اختلاف معنی‌دار بر اساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن ($P < 0.05$) و خطای استاندارد ($\text{Mean} \pm \text{SEM}$) می‌باشد).

سطح برگ و تعداد برگ

نتایج تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که اثر غلظت‌های مختلف سالیسیلیک اسید، سطوح آبیاری و برهمکنش این دو عامل بر سطح برگ و تعداد برگ معنی‌دار ($P < 0.01$) بود (جدول ۲). نتایج مقایسه میانگین برهمکنش سالیسیلیک اسید در سطوح آبیاری بر سطح و تعداد برگ نشان داد که افزایش غلظت سالیسیلیک اسید تا حدودی در هر دو سطح آبیاری نتوانست منجر به افزایش سطح و تعداد برگ یونجه شود، به طوری که در شرایط ۱۰۰ درصد ظرفیت زراعی افزایش غلظت سالیسیلیک اسید تا ۲۱ درصد، سطح برگ و تعداد برگ به ترتیب افزایش ۱۸/۶۷ و ۲۹/۸۷ درصدی و معنی‌داری داشتند، اما با کاربرد غلظت‌های بیش‌تر سطح و تعداد برگ کاهش یافت طوری که در غلظت ۴۹ درصد حدود ۱۳/۶۶ درصد سطح برگ کم‌تری نسبت به تیمار شاهد داشت. نتایج همچنین نشان داد تحت شرایط ۵۰ درصد ظرفیت زراعی کاربرد محلول پاشی سالیسیلیک اسید بر برگ‌های یونجه منجر به افزایش سطح و تعداد برگ گردید و غلظت ۳۵ درصد سالیسیلیک اسید بیش‌ترین سطح و تعداد برگ را داشت هرچند که تفاوت معنی‌داری با غلظت‌های کم‌تر سالیسیلیک اسید نداشته اما نسبت به تیمار شاهد دارای ۵۰/۳۵ درصد سطح برگ و ۳۴/۷۸ درصد تعداد برگ بیش‌تری بودند (جدول ۳).

مطالعات متعددی در زمینه اثر تنش خشکی بر شاخص سطح برگ و تعداد برگ وجود دارد (بیات و همکاران، ۱۳۹۰). کاهش سطح برگ اولین پاسخ گیاه به تنش خشکی است، با کاهش محتوای آب در گیاه، فشار تورژانس در سلول‌های گیاه پایین آمده که این خود باعث کاهش حجم سلول و کوچک شدن سطح برگ می‌گردد، زیرا بزرگ شدن سلول فرایندی کاملاً وابسته به فشار تورژانس می‌باشد (Gratani and Varone, 2004). با تداوم تنش آبی به دلیل افزایش هورمون اتیلن، برگ‌ها پیر شده و ریزش می‌کنند که نتیجه آن کاهش تعداد برگ در بوته می‌باشد (Taiz and Zeiger, 2010). سالیسیلیک اسید با حفظ روابط آبی گیاه و عملکرد روزنه‌ها (Barkosky and Einhellig, 1993) می‌تواند سطح برگ در گیاه را افزایش دهد. از طرف دیگر سالیسیلیک اسید با جلوگیری از اکسیداسیون اکسین (Fariduddin *et al.*, 2003) بر مریستم‌های رویشی اثر گذاشته و موجب افزایش تعداد میان‌گره در ساقه اصلی و تعداد برگ در گیاه می‌گردد (Takeda *et al.*, 1995) و با جلوگیری از سنتز اتیلن (Srivastava and Dwivedi, 2000) مانع از پیری و ریزش برگ‌ها می‌شود.

کلروفیل a, b و کل

نتایج تجزیه واریانس داده‌ها بیانگر اثر معنی‌دار ($P < 0.01$) درصد‌های مختلف سالیسیلیک اسید، سطوح آبیاری و برهمکنش این دو فاکتور بر مقادیر کلروفیل a, b و کل بود (جدول ۲). نتایج مقایسه میانگین‌ها نشان داد، با افزایش غلظت سالیسیلیک اسید در هر دو شرایط تنش و بدون تنش رنگیزه‌های فتوسنتزی افزایش یافتند، به طوری که سطح ۳۵ درصد سالیسیلیک اسید بیش‌ترین مقدار کلروفیل a, b و کل را به خود اختصاص داد که در شرایط آبیاری کامل نسبت به تیمار شاهد به ترتیب افزایش ۲۵/۹، ۲۸/۳۸ و ۳۱/۵۷ درصدی و تحت شرایط تنش به ترتیب دارای افزایش ۵۳/۰۹، ۳۴/۶۷ و ۵۶/۶۹ درصدی و معنی‌داری بودند. با افزایش غلظت سالیسیلیک اسید به ۴۹ درصد، مقادیر رنگیزه‌های فتوسنتزی در گیاهان تحت تنش و بدون تنش کاهش معنی‌داری داشتند (جدول ۳).

همان‌گونه که از نتایج این بررسی مشاهده می‌شود سالیسیلیک اسید در شرایط ۵۰ درصد ظرفیت زراعی (تنش) اثر بیش‌تری بر افزایش مقدار رنگیزه‌های فتوسنتزی نسبت به آبیاری کامل داشت. کاهش محتوای کلروفیل تحت شرایط تنش و افزایش آن تحت محلول‌پاشی با سالیسیلیک اسید توسط محققین دیگری نیز گزارش شده است (نعمت‌اللهی و همکاران، ۱۳۹۲؛ Habibi, 2012). 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 تأثیر قرار دادن فرآیندهای بیوشیمیایی (شکل ۲ب و شکل ۳ب) و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی (شکل ۲الف) منجر به افزایش محتوای کلروفیل (جدول ۳) در گیاه می‌شود.

محتوای نسبی آب (RWC)

محتوای نسبی آب به طور معنی داری ($P < 0/01$) تحت تأثیر درصدهای مختلف سالیسیلیک اسید و سطوح آبیاری قرار گرفت، همچنین برهمکنش این دو عامل نیز اثر معنی داری ($P < 0/05$) بر محتوای نسبی آب داشت (جدول ۲). بر اساس نتایج مقایسات میانگین برهمکنش تیمارها، کاربرد سالیسیلیک اسید در هر دو سطح آبیاری باعث افزایش محتوای نسبی آب گردید، به طوری که در شرایط آبیاری کامل بیشترین محتوای نسبی آب به میزان ۲۴/۳۱ درصد مربوط به کاربرد ۳۵ درصد سالیسیلیک اسید بود که نسبت به تیمار شاهد افزایش ۳۷/۴۷ درصدی داشت. تحت تنش خشکی (۵۰ درصد ظرفیت زراعی) بیشترین محتوای نسبی آب برگ (۱۸/۷۸ درصد) از غلظت ۲۱ درصد سالیسیلیک اسید به دست آمد که نسبت به تیمار شاهد حدود ۵۵/۷ درصد محتوای نسبی آب برگ بیشتری داشت (جدول ۳). با افزایش غلظت سالیسیلیک اسید به ۴۹ درصد محتوای نسبی برگ در هر دو سطح آبیاری کاهش معنی داری داشت (جدول ۳).

جدول ۳: نتایج مقایسه میانگین برهمکنش سالیسیلیک اسید در سطوح آبیاری (۱۰۰٪ و ۵۰٪ ظرفیت زراعی) بر ظرفیت فتوسنتزی و محتوای نسبی آب برگ یونجه رقم همدانی

محتوای نسبی آب (درصد)	کلروفیل کل (میلی گرم بر گرم وزن تر)	کلروفیل b (میلی گرم بر گرم وزن تر)	کلروفیل a (میلی گرم بر گرم وزن تر)	تعداد برگ	سطح برگ (سانتی متر مربع)	سالیسیلیک اسید (درصد)	سطوح آبیاری
۱۵/۲±۱/۴ ef	۴/۹±۰/۲ cde	۲/۲±۰/۲ bcd	۳/۷±۰/۰۹ cd	۲۹۷±۱/۷ †† b	۳۴۴±۱۲/۰۵ c [†]	شاهد	
۱۹/۶±۰/۷ bc	۶/۱۶±۰/۲۴ b	۲/۲±۰/۱۴ bc	۴/۵±۰/۲۴ ab	۲۹۵±۲/۸ b	۳۶۳±۶/۳۶ bc	۷	
۲۱/۸±۰/۳ ab	۶/۷±۰/۴۲ ab	۲/۵۳±۰/۰۷ b	۴/۱±۰/۲۵ bc	۴۲۳±۱۴/۵ a	۴۲۳±۳/۸ a	۲۱	بدون تنش
۲۴/۳۱±۰/۷ a	۷/۱۹±۰/۱۱ a	۳/۱±۰/۱۵ a	۴/۹۸±۰/۳۱ a	۳۱۰±۲۰/۸ b	۳۹۲±۶/۲ ab	۳۵	
۱۶/۷±۰/۶ def	۵/۵±۰/۱۸ c	۱/۲۷±۰/۱۹ g	۲/۳±۰/۳۶ de	۲۹۶/۷±۱۷/۶ b	۲۹۷±۸/۹ d	۴۹	
۸/۳۳±۰/۷ h	۲/۳۳±۰/۰۳ f	۱/۳±۰/۱۵ fg	۱/۸۲±۰/۰۵ f	۹۴/۳±۲/۷ d	۶۸±۱۰/۴ f	شاهد	
۱۲/۱۸±۰/۴۷ g	۴/۳۷±۰/۰۸ e	۱/۷±۰/۰۸ ef	۲/۷±۰/۰۳۵ e	۱۲۶±۵/۸ cd	۱۳۱±۳/۸ e	۷	تنش
۱۸/۸±۰/۹۷ cd	۵/۲±۰/۰۴ cd	۱/۸۲±۰/۰۶ de	۳/۸±۰/۰۲۱ cd	۱۴۱/۷±۸/۸ c	۱۳۵±۴/۰۴ e	۲۱	خشکی
۱۷/۵±۰/۴ cde	۵/۳۸±۰/۳۴ c	۱/۹±۰/۰۵ cde	۳/۹±۰/۰۴ bc	۱۴۴/۶±۴/۴ c	۱۳۷±۴/۳۷ e	۳۵	
۱۴/۴±۰/۹۸ fg	۴/۷±۰/۰۸ de	۱/۳۲±۰/۰۷ fg	۲/۹۷±۰/۰۷ e	۱۰۷/۷±۴/۳ d	۱۲۱±۵/۷ e	۴۹	

[†] میانگین‌هایی دارای حروف مشترک در هر ستون، بیانگر عدم اختلاف معنی دار براساس آزمون دانکن در سطح پنج درصد می‌باشند.

^{††} بیانگر خطای استاندارد (Mean ± SEM) می‌باشد.

محتوای نسبی آب یکی از صفات فیزیولوژیکی پاسخ‌دهنده به تنش خشکی است که همبستگی بالایی در تحمل به تنش خشکی دارد (Colom and Vazzana, 2003). در شکل (ب) همان‌طور که مشخص است در تمامی غلظت‌های سالیسیلیک اسید با محدودیت آبیاری به ۵۰ درصد ظرفیت مزرعه‌ای محتوای نسبی آب برگ کاهش یافت، که مشابه این نتایج در یافته‌های محققین دیگر بر لوبیا چشم بلبلی (*Vigna unguiculata* L.) گزارش شده است (Anyia and Herzog, 2004). همین‌طور این شکل نشان می‌دهد که کاربرد سالیسیلیک اسید تا غلظت ۳۵ درصد تا حدودی توانست کاهش محتوای نسبی آب را تحت تنش خشکی و آبیاری کامل بهبود دهد، که با نتایج دیگر محققین همخوانی دارد

(Abbadi *et al.*, 2015). سالیسیلیک اسید از طریق افزایش اسیمیلات‌های 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).

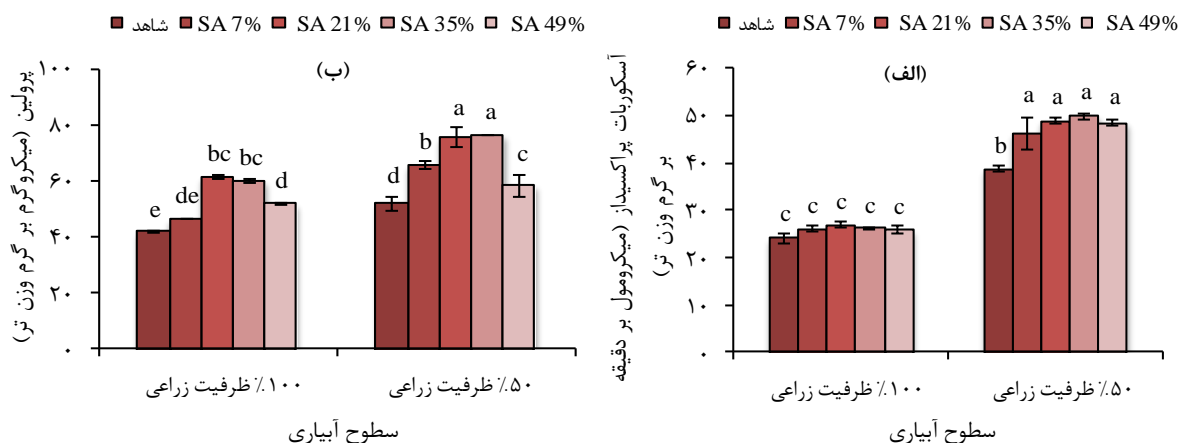
ظرفیت آنتی‌اکسیدانی آنزیمی

فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز به عنوان یکی از آنزیم‌های مهم آنتی‌اکسیدانی، به‌طور معنی‌داری تحت تأثیر درصدهای مختلف سالیسیلیک اسید، سطوح آبیاری ($P < 0/01$) و همچنین برهمکنش این دو عامل ($P < 0/05$) قرار گرفتند (جدول ۲). نتایج برهمکنش سالیسیلیک اسید در تنش خشکی بر فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز نشان می‌دهد که در شرایط آبیاری کامل، کاربرد سالیسیلیک اسید اثر معنی‌داری بر فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز نداشت، ولی تحت تنش خشکی محلول‌پاشی بوته‌ها با سالیسیلیک اسید منجر به افزایش فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز گردید (شکل ۲الف). بررسی‌های متعددی در زمینه افزایش فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز تحت تنش خشکی وجود دارد (Habibi, 2012; Rubio *et al.*, 2002)، که با نتایج این تحقیق مطابقت دارد. آنزیم آسکوربات پراکسیداز از مهم‌ترین آنزیم‌های جمع‌آوری کننده پراکسید هیدروژن و کاهنده مقدار مالون دی‌آلدهید حاصل از پراکسیداسیون لیپیدی غشاء به شمار می‌آید (Zhang *et al.*, 2004).

سالیسیلیک اسید می‌تواند با افزایش توانایی آنتی‌اکسیدانی خسارات ناشی از تنش خشکی بر گیاه را کاهش دهد (Amin *et al.*, 2009). نتایج یافته‌های محققین بر گوجه فرنگی (Hayat *et al.*, 2008) و جو (Habibi, 2012) تأیید کننده نتایج حاصل از این بررسی بود، که سالیسیلیک اسید باعث تحریک فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز تحت تنش خشکی می‌گردد.

پرولین

مقدار پرولین به‌طور معنی‌داری تحت اثر سطوح سالیسیلیک اسید، تنش خشکی ($P < 0/01$) و برهمکنش این دو عامل ($P < 0/05$) قرار گرفت (جدول ۲). بر اساس نتایج مقایسه میانگین برهمکنش سالیسیلیک اسید در تنش خشکی، در هر سطح آبیاری با افزایش غلظت سالیسیلیک اسید مقدار پرولین افزایش معنی‌داری داشت که این افزایش در بوته‌های آبیاری شده با ۵۰ درصد ظرفیت زراعی (تنش خشکی) بیش‌تر بود، به‌طوری‌که در تیمارهای تنش دیده، غلظت‌های ۲۱ و ۳۵ درصد سالیسیلیک اسید به‌ترتیب با ۷۵/۵۴ و ۷۶/۳۴ میکروگرم بر گرم وزن تر بیش‌ترین مقدار پرولین را به خود اختصاص دادند. با افزایش غلظت سالیسیلیک اسید از ۳۵ و ۴۹ درصد مقدار پرولین در هر دو سطح آبیاری کاهش معنی‌داری داشت (شکل ۲ب).



شکل ۲: مقایسه میانگین برهمکنش سالیسیلیک اسید در سطوح آبیاری بر فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز (الف) و

محتوای پرولین (ب) برگ یونجه رقم همدانی

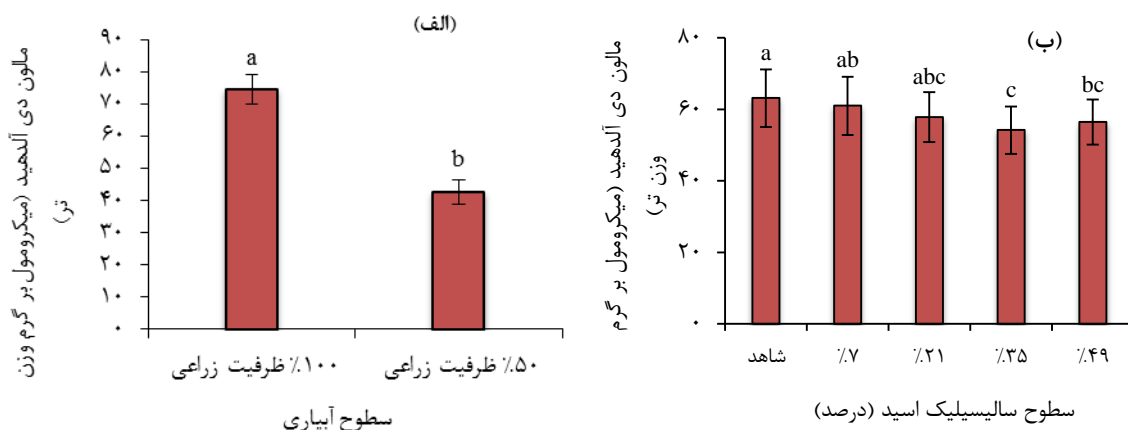
(حروف غیر مشابه و میله‌های روی هر ستون (Error Bars) به ترتیب بیانگر اختلاف معنی‌دار بر اساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن ($P < 0.05$) و خطای استاندارد (Mean \pm SEM) می‌باشد).

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). بر اساس نتایج این بررسی مقدار پرولین با کاهش آب خاک از ۱۰۰ به ۵۰ درصد ظرفیت زراعی افزایش یافت که با نتایج آزمایش‌های سایر محققان مبنی بر افزایش پرولین با تنش خشکی بر ارقام مختلف یونجه (آخوندی و همکاران، ۱۳۸۵)، نخود فرنگی (Sanchez *et al.*, 1998)، بابونه (آرزمجو و همکاران، ۱۳۸۹)، ذرت (دولت آبادیان و همکاران، ۱۳۸۸) و بادام زمینی (Girija *et al.*, 2002) مطابقت دارد. تجمع پرولین تحت تنش کم آبی در گیاه می‌تواند به دلیل اثر تنظیمی اسید آسبزیک بر فرآیندهای نوری در متابولیسم پرولین (Serraj and Sinclair, 2002) و یا به علت وجود ترکیبات پر انرژی حاصل از فتوسنتز باشد که سبب تحریک سنتز پرولین می‌گردد (Mattioni *et al.*, 1997). اختصاص کربوهیدرات‌های بیش‌تر در ساختار مواد آلی مؤثر در تنظیم اسمزی پرولین می‌تواند باعث کاهش رشد نیز شود (Masoumzadeh *et al.*, 2012). بنابراین سنتز بیش‌تر پرولین در اثر افزایش خشکی (شکل ۲ب) ممکن است یکی از عوامل کاهنده رشد و عملکرد ماده خشک (شکل ۱) باشد. سالیسیلیک اسید با سنتز و تجمع پرولین به عنوان 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 سالیسیلیک اسید با افزایش مقدار پرولین

در گیاه سبب تحمل گیاه به خشکی گردیده است (Pospisilova, 2011) که تأییدکننده نتایج حاصل از این بررسی است.

پراکسیداسیون لیپید غشاء

بر اساس تجزیه واریانس داده‌های مربوط به صفت مالون دی‌آلدهید، عوامل سالیسیلیک اسید و تنش اثر معنی‌داری در سطح احتمال یک درصد بر این صفت داشتند، اما برهمکنش این دو عامل اثر معنی‌داری از نظر آماری بر این صفت نداشت (جدول ۲). با اعمال تنش خشکی (۵۰ درصد ظرفیت زراعی) مقدار مالون دی‌آلدهید بوته‌های یونجه نسبت به شرایط آبیاری ۴۲/۷۹ درصد افزایش یافت (شکل ۳الف). کاربرد و افزایش غلظت سالیسیلیک اسید منجر به کاهش پراکسیداسیون لیپیدی غشاء و مقدار مالون دی‌آلدهید در بوته‌های یونجه گردید، به طوری که غلظت‌های ۳۵ و ۴۹ درصد سالیسیلیک اسید به ترتیب با ۵۴/۱۸ و ۵۶/۴۵ میکرومول بر گرم وزن تر دارای کم‌ترین مقدار مالون دی‌آلدهید بودند (شکل ۳ب). نتایج بررسی‌های متعددی نشان‌دهنده افزایش مقدار مالون دی‌آلدهید تحت تنش خشکی می‌باشد (Zabet *et al.*, 2003)، که با نتایج حاضر همخوانی دارد. افزایش مقدار مالون دی‌آلدهید در شرایط تنش نشان‌دهنده افزایش مقدار پراکسیداسیون لیپیدهای غشاء توسط گونه‌های فعال اکسیژن می‌باشد (زینالی یادگاری و همکاران، ۱۳۸۸). کاربرد خارجی سالیسیلیک اسید بر گیاهان می‌تواند پاسخ مناسبی برای کاهش پراکسیداسیون لیپیدهای غشاء از طریق جلوگیری از فعالیت لیپواکسیژن‌ها و کاهش محتوای H_2O_2 ، به منظور حفظ غشای سلولی تحت تنش خشکی باشد (Janda *et al.*, 2007) و مانع از افزایش مقدار مالون دی‌آلدهید شود (Noctor and Foyer, 1998). طی آزمایشی محققان نشان دادند که کاربرد سالیسیلیک اسید بر *Satureja hortensis* منجر به کاهش معنی‌دار مقدار مالون دی‌آلدهید تحت تنش خشکی گردیده است (Yazdanpanah *et al.*, 2011)، که با نتایج این بررسی همخوانی دارد.



شکل ۳: مقایسه میانگین اثر سطوح آبیاری (۱۰۰٪ و ۵۰٪ درصد ظرفیت زراعی) (الف) و سالیسیلیک اسید (ب) بر مقدار

مالون دی‌آلدهید برگ یونجه رقم همدانی

(حروف غیر مشابه و میله‌های روی هر ستون (Error Bars) به ترتیب بیانگر اختلاف معنی‌دار بر اساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن ($P < 0.05$) و خطای استاندارد (Mean \pm SEM) می‌باشد).

نتیجه گیری

با توجه به نتایج کلی از این بررسی، حفظ غلظت کلروفیل در شرایط دشوار محیطی، به ثبات فتوسنتز در این شرایط کمک کرده و سبب کاهش خسارت‌های وارده به گیاه در تنش‌های محیطی می‌گردد. سالیسیلیک اسید تا سطح ۳۵ درصد با افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدان باعث پاکسازی گونه‌های فعال اکسیژن و مانع از خسارت اکسیداسیون به سلول‌های گیاهی می‌شود. همچنین این ماده با بالا بردن محتوای تنظیم کننده اسمزی همچون پرولین باعث حفظ تعادل آبی سلول شده که این امر سبب پایداری ساختار سلولی در برابر تنش کم آبی است، ولی غلظت‌های بالاتر سالیسیلیک اسید در ۴۹ درصد با اثر بر کاهش فعالیت آنزیم‌های کاتالاز و پراکسیداز سبب افزایش پراکسید هیدروژن و خسارت اکسیداتیو به گیاه و در نتیجه کاهش رشد گردید.

منابع

- آرزمجو، ا.، حیدری، م. و قربانی، ع. ۱۳۸۹. اثر تنش خشکی و سه منبع از کودها بر عملکرد گل، پارامترهای فیزیولوژیکی و جذب عناصر غذایی در بابونه (*Matricaria chamomolla* L.). مجله گیاهان دارویی و معطر. ۲۵(۱): ۴۸۲-۴۹۴.
- آخوندی، م.، صفر نژاد، ع. و لاهوتی، م. ۱۳۸۵. اثر تنش خشکی بر تجمع پرولین و تغییرات عناصر در یونجه‌های یزدی، نیکشهری و رنجر (*Medicago sativa* L.). علوم و فنون کشاورزی و منابع طبیعی. ۱۱۰(۱): ۱۷۴-۱۶۵.
- اسیلان، ک. س. و حاجیلویی، س. ۱۳۸۹. بررسی تأثیر تنش کم آبی بر صفات کمی و کیفی ارقام بونجه (*Medicago sativa* L.). فصلنامه علمی اکوفیزیولوژی گیاهان زراعی. ۱۲(۱): ۵۱-۴۱.
- بهنام‌فر، ک.، سیادت، س. ع.، بخشنده، ع. م.، عالمی سعید، خ.، کاشفی پور، س. م. و جعفری، ع. ا. ۱۳۹۴. بررسی تأثیر کم آبیاری بر صفات موفولوژیک و تولید ارقام مختلف یونجه در شرایط آب و هوایی خوزستان- اهواز. نشریه تولید و فرآوری محصولات زراعی و باغی. ۵(۱۷): ۱۷۹-۱۷۱.
- بیات ح.، مردانی، ح.، آروبی، ح. و سلاح‌ورزی، ی. ۱۳۹۰. تأثیر سالیسیلیک اسید بر خصوصیات مورفولوژیکی و فیزیولوژیکی دانه‌های خیار (*Cucumis sativus* cv. Super Dominus) تحت شرایط تنش خشکی. مجله پژوهش‌های تولید گیاهی. ۱۸(۳): ۷۶-۶۳.
- بیان، م.، امینی، ف. و عسکری، م. ۱۳۹۲. تأثیر پیش تیمار اسید سالیسیلیک بر تجمع آسمولیت‌های آلی و فعالیت آنتی اکسیدانی گیاه قره داغ (*Nitraria shoberi* L.) در شرایط تنش خشکی. نشریه پژوهش‌های تولید گیاهی. ۲۰(۴): ۱۷۷-۱۸۸.

حبیب پور، س. س.، نادری، ا.، لک، ش.، فرجی، ه. و مجدم، م. ۱۳۹۴. اثر سالیسیلیک اسید بر عملکرد و برخی ویژگی‌های فیزیولوژیکی هیبریدهای ذرت شیرین در شرایط تنش کمبود آب. مجله فیزیولوژی و بیوشیمی گیاهی ایران، ۱۵(۲): ۱-۱۵.

جعفری، س. ر.، منوچهری کلانتری، خ. و احمدی موسوی، ع. ا. ۱۳۸۶. اثر پاکلوبوترازول بر تجمع آنتی آکسیدان-ها در نهال‌های گوجه فرنگی (*Lycopersicon esculentum* L.) تحت تنش سرما. مجله زیست شناسی ایران، ۲۰(۳): ۲۰۶-۲۱۷.

دولت آبادیان، آ.، مدرس ثانوی، س. ع. م. و شریفی، م. ۱۳۸۸. اثر تنش آبی و محلول پاشی اسید آسکوربیک بر میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و برخی تغییرات بیوشیمیایی در برگ ذرت دانه‌ای (*Zea mays* L.). مجله زیست شناسی ایران، ۲۲(۳): ۴۰۷-۴۲۲.

زینالی یادگاری، ل.، حیدری، ر. و کاراپتیان، ژ. ۱۳۸۸. تغییر نفوذپذیری غشاهای زیستی و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی گیاه سویا در پاسخ به دمای پایین. مجله زیست شناسی ایران، ۲۲(۲): ۲۳۶-۲۲۹.

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، ۵۴(۱): ۴۱-۵۴.

نعمت‌اللهی، ا.، جعفری، ع. ر. و باقری، ع. ر. ۱۳۹۲. اثر تنش خشکی و سالیسیلیک اسید روی رنگدانه‌های فتوسنتزی و جذب عناصر غذایی ارقام زراعی آفتابگردان (*Helianthus annuus* L.). مجله اکوفیزیولوژی گیاهی، ۱۲(۵): ۳۷-۵۱.

Abbadi, A., Shekari, F. and Mustafavi, S. H. 2015. Effect of paclobutrazol and salicylic acid on antioxidants enzyme activity in drought stress in wheat. *Investigaciones*, 33: 5–13.

Afsharmanesh, G. 2009. Study of some morphological traits and selection of drought-resistant alfalfa cultivars (*Medicago sativa* L.) in Jiroft, Iran. *Journal of Plant Ecophysiol.* 1: 109–118.

Amin, B., Mahleghah, G., Mahmood, H. M. R., Hossein, M., others. 2009. Evaluation of interaction effect of drought stress with ascorbate and salicylic acid on some of physiological and biochemical parameters in okra (*Hibiscus esculentus* L.). *Research Journal Biological sciences*, 4: 380–387.

Anya, A.O. and Herzog, H. 2004. Water-use efficiency, leaf area and leaf gas exchange of cowpeas under mid-season drought. *European Journal of Agronomy*, 20: 327–339.

Azarfard, F., others. 2008. Effect of Prangos ferulacea replacement for alfalfa on growth

performance and carcass characteristics of Lori lambs. *International Journal of Agricultural and Biology*, 10: 224–226.

Barkosky, R. R. and Einhellig, F. A. 1993. Effects of salicylic acid on plant-water relationships. *Journal of chemical Ecology*, 19: 237–247.

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.

Colom, M. R. and Vazzana, C. 2003. Photosynthesis and PSII functionality of drought-resistant and drought-sensitive weeping lovegrass plants. *Environmental and Experimental Botany*, 49: 135–144.

Fariduddin, Q., Hayat, S. and Ahmad, A. 2003. Salicylic acid influences net photosynthetic rate, carboxylation efficiency, nitrate reductase activity, and seed yield in *Brassica juncea*. *Photosynthetica*, 41: 281–284.

Girija, C., Smith, B. N. and Swamy, P. M. 2002. Interactive effects of sodium chloride and calcium chloride on the accumulation of proline and glycinebetaine in peanut (*Arachis hypogaea* L.). *Environment and Experiment Botany*, 47: 1–10.

Gratani, L. and Varone, L. 2004. Leaf key traits of *Erica arborea* L., *Erica multiflora* L. and *Rosmarinus officinalis* L. co-occurring in the Mediterranean maquis. *Flora-Morphology, Distribution, Functional Ecology Plants*, 199: 58–69.

Gregersen, P. L., Culetic, A., Boschian, L. and Krupinska, K. 2013. Plant senescence and crop productivity. *Plant Molecular Biology*, 82: 603–622.

Habibi, G. 2012. Exogenous salicylic acid alleviates oxidative damage of barley plants under drought stress. *Acta Biologica Szegediensis*, 56: 57–63.

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.

Hayat, S., Hasan, S. A., Fariduddin, Q. and Ahmad, A. 2008. Growth of tomato (*Lycopersicon esculentum*) in response to salicylic acid under water stress. *Journal of Plant Interactions*, 3, 297–304.

Heath, R. L. and Packer, L. 1968. Photoperoxidation in isolated chloroplasts: I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 125: 189–198.

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.

Jaleel, C. A., Manivannan, P., Kishorekumar, A., Sankar, B., Gopi, R., Somasundaram, R. and Panneerselvam, R. 2007. Alterations in osmoregulation, antioxidant enzymes and indole

alkaloid levels in *Catharanthus roseus* exposed to water deficit. *Colloids Surfaces B: Biointerfaces*, 59: 150–157.

Janda, T., Horváth, E., Szalai, G. and Páldi, E. 2007. Chapter 5, Role of salicylic acid in the induction of abiotic stress tolerance. In: Hayat S, Ahmad A, editors. *Salicylic acid: a plant hormone*. The Netherlands: Springer, 91–150.

Kang, H.-M. and Saltveit, M. E. 2002. Chilling tolerance of maize, cucumber and rice seedling leaves and roots are differentially affected by salicylic acid. *Physiologia plantarum*, 115: 571–576.

Khan, M. I. R., Asgher, M. and Khan, N. A. 2014. Alleviation of salt-induced photosynthesis and growth inhibition by salicylic acid involves glycinebetaine and ethylene in mungbean (*Vigna radiata* L.). *Plant Physiology Biochemistry*, 80: 67–74.

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.

Lichtenthaler, H. and Wellburn, A. 1983. Determinations of total carotenoids and chlorophylls b of leaf extracts in different solvents. *Biochemical Society Transactions*, 11: 591–592.

Lindenmayer, R. B., Hansen, N. and Brummer, J. 2007. Alfalfa growth responses to water and partial season irrigation strategies. ASA – CSSA – SSSA 2007 International Annual meetings November 4 – 8. New Orleans, Louisiana available at: <http://a-c-s,cont-ex.Com/a-c-s/2007am/techprogram/p34995,HTM>.

Masoumzadeh, B. M., Imani, A. A. and Khayamaim, S. 2012. Salinity Stress Effect on Proline and Chlorophyll Rate in Four Beet Cultivars. *Sugar Beet Seed Research Institute (SBSI)*, Iran, 3: 5453–5456.

Mattioni, C., Lacerenza, N. G., Troccoli, A., Leonardis, A. M. and de, Fonzo, N. di. 1997. Water and salt stress-induced alterations in proline metabolism of *Triticum durum* seedlings. *Physiologia Plantarum*, 101: 787–792.

Muller, B., Pantin, F., Génard, M., Turc, O., Freixes, S., Piques, M. and Gibon, Y. 2011. Water deficits uncouple growth from photosynthesis, increase C content, and modify the relationships between C and growth in sink organs. *Journal Experiment Botany*, 62: 1715–1729.

Nakano, Y. and Asada, K. 1981. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant Cell Physiology*, 22: 867–880.

Nazar, R., Iqbal, N., Syeed, S. and Khan, N. A. 2011. Salicylic acid alleviates decreases in

photosynthesis under salt stress by enhancing nitrogen and sulfur assimilation and antioxidant metabolism differentially in two mungbean cultivars. *Journal Plant Physiology*, 168: 807–815.

Noctor, G. and Foyer, C.H. 1998. Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 49: 249–279.

Noreen, S., Fatima, K., Athar, H. U. R., Ahmad, S. and Hussain, K. 2017. Enhancement of physio-biochemical parameters of wheat through exogenous application of salicylic acid under drought stress. *The Journal of Animal and Plant Sciences*, 27: 153–163.

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.

Ritchie, S. W., Nguyen, H.T. and Scott Holaday, A. 1990. Leaf Water Content and Gas-Exchange Parameters of Two Wheat Genotypes Differing in Drought Resistance. *Crop Science*, 30: 105–111.

Rubio, M.C., González, E. M., Minchin, F.R., Webb, K.J., Arrese-Igor, C., Ramos, J. and Becana, M. 2002. Effects of water stress on antioxidant enzymes of leaves and nodules of transgenic alfalfa overexpressing superoxide dismutases. *Physiologia Plantarum*, 115: 531–540.

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.

Serraj, R. and Sinclair, T. R. 2002. Osmolyte accumulation: can it really help increase crop yield under drought conditions? *Plant Cell Environment*, 25: 333–341.

Shalhevet, J. 1993. Plants under salt and water stress. *Plant Adapt. to Environ. Stress* 133–154.

Srivastava, M. K. and Dwivedi, U. N. 2000. Delayed ripening of banana fruit by salicylic acid. *Plant Science*. 158: 87–96.

Taiz, L. and Zeiger, E. 2010. *Plant physiology* 5th Ed. Sunderland. Sinauer Assoc.

Takeda, T., Yokota, A. and Shigeoka, S. 1995. Resistance of photosynthesis to hydrogen peroxide in algae. *Plant Cell Physiology*, 36: 1089–1095.

Wang, L.-J., Fan, L., Loescher, W., Duan, W., Liu, G.-J., Cheng, J.-S., Luo, H.-B. and Li, S.-H. 2010. Salicylic acid alleviates decreases in photosynthesis under heat stress and accelerates recovery in grapevine leaves. *BMC Plant Biology*, 10: 34–40.

Wei, P., Yang, Y., Wang, F. and Chen, H. 2015. Effects of drought stress on the antioxidant systems in three species of *Diospyros L.* *Horticulture Environment and Biotechnology*, 56: 597–605.

Yazdanpanah, S., Baghizadeh, A. and Abbassi, F. 2011. The interaction between drought stress and salicylic and ascorbic acids on some biochemical characteristics of *Satureja hortensis*. *African Journal Agricultural*, 6: 798–807.

Zabet, M., Hosseinzadeh, A.H., Ahmadi, A. and Khialparast, F. 2003. Effect of water stress on different traits and determination of the best water stress index in Mung Bean (*Vigna radiate*). *Iran. Agricultural Science in Iran*, 34: 889–898.

Zhang, F., Guo, J.-K., Yang, Y.-L., He, W.-L. and Zhang, L.-X. 2004. Changes in the pattern of antioxidant enzymes in wheat exposed to water deficit and rewatering. *Acta Physiologiae Plantarum*, 26: 345–352.

Zhu, J.-K. 2000. Genetic analysis of plant salt tolerance using *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 124: 941–948.