



پاسخ‌های ریشه عدس (*Lens culinaris Medikus.*) به محلول پاشی متانول تحت شرایط تنش کم‌آبی

سعیدرضا حسین‌زاده^۱، فرزاد پاک‌نژاد^{۲*}، محمدنبی ایلکایی^۳ و راهله احمدپور^۴

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۱۱/۱۹

تاریخ بازنگری: ۱۳۹۶/۱۱/۱۷

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۳/۲۷

چکیده

کمبود آب قابل دسترس در محیط ریشه، یکی از عوامل اصلی محدود کننده رشد و تولید محصول در مناطق خشک به‌شمار می‌آید. محلول‌پاشی متانول در افزایش تحمل به خشکی در گیاهان ۳ کربنه نقش دارد. به این منظور آزمایشی به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار در دانشگاه صنعتی خاتم الانبیاء بهبهان در سال ۱۳۹۴ به اجرا درآمد. محلول‌پاشی متانول با ۵ سطح، شاهد، ۵، ۱۵، ۲۵ و ۳۵ درصد حجمی و تنش کم‌آبی با سه سطح: شامل بدون تنش (آبیاری در ۱۰۰ درصد ظرفیت زراعی)، تنش آبی ملایم (آبیاری در ۷۵ درصد ظرفیت زراعی) و تنش آبی شدید (آبیاری در ۲۵ درصد ظرفیت زراعی) در نظر گرفته شدند. محلول‌پاشی متانول ۳ بار در طول فصل رشد گیاه (در مراحل گیاهچه‌ای، گلدهی و غلافدهی گیاه) و با فواصل ۱۰ روز انجام شد. نتایج نشان داد اثرات متقابل متانول و تنش خشکی بر وزن خشک ریشه، قطر ریشه، طول ریشه در سطح ۵ درصد و بر سطح ریشه در سطح ۱ درصد معنی‌دار شد. در شرایط آبیاری نرمال تیمار ۵، ۱۵ و ۲۵ درصد محلول‌پاشی متانول باعث افزایش معنی‌دار وزن خشک ریشه نسبت به تیمار شاهد گردید. اثرات متقابل متانول و تنش بر پروتئین و پرولین در سطح ۱ درصد معنی‌دار شد. محلول‌پاشی متانول منجر به افزایش معنی‌دار محتوای پرولین و پروتئین ریشه شد. اثرات متقابل متانول و تنش بر غلظت سدیم و پتاسیم ریشه در سطح ۵ درصد و بر غلظت کلسیم ریشه در سطح ۱ درصد معنی‌دار شد. اثرات متقابل متانول و تنش بر فعالیت آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز و پراکسیداز در سطح ۵ درصد معنی‌دار شدند. همچنین، اثر تنش خشکی بر فعالیت آنزیم کاتالاز در سطح ۱ درصد معنی‌دار شد. محلول‌پاشی متانول منجر به کاهش معنی‌دار فعالیت آنزیم‌های پراکسیداز و سوپراکسید دیسموتاز ریشه شد.

واژگان کلیدی: تنش خشکی، ریشه، فعالیت آنتی‌اکسیدانت، عدس، مورفولوژیک.

مقدمه

حبوبات به دلیل دارا بودن برخی خصوصیات غذایی و زراعی قابل ملاحظه اهمیت ویژه‌ای در نظام‌های کشاورزی کشورهای در حال توسعه دارند (Ahmadpour *et al.*, 2016). عدس از مهم‌ترین حبوبات به‌شمار می‌رود و با داشتن ۲۸ درصد پروتئین، مواد مغذی (پتاسیم، فسفر، آهن و روی) و ویتامین‌ها نقش مهمی در رژیم غذایی اقشار کم درآمد ایفا می‌کند (Ahmadpour *et al.*, 2015). با توجه به این‌که بیش از ۸۰ درصد کشت عدس در کشور به‌صورت دیم می‌باشد، خشکی و کمبود آب در خاک بیشترین تأثیر را در کاهش عملکرد این گیاه در مراحل مختلف رشد و نمو گیاه دارد (Parsa and Bagheri, 2008). از آنجا که آب قابل دسترس عامل اصلی محدود کننده رشد در محیط‌های خشک می‌باشد، بیشترین بازده از نظر رشد و تولید محصول، زمانی حاصل می‌شود که از آب محدود موجود در خاک، حداکثر جذب صورت پذیرد (Hosseinzadeh *et al.*, 2012). بنابراین، از میان کلیه صفات مورفولوژی تحمل به تنش خشکی در حبوبات، بیشترین توجه معطوف به ریشه‌ها می‌باشد (Parsa and Bagheri, 2008). نسبت بالاتر ریشه (اندام جذب کننده آب) به اندام هوایی (اندام مصرف کننده) توان گیاه را برای افزایش تحمل به خشکی بهبود می‌بخشد (Ganjeali and Bagheri, 2011). بدین منظور برخی محققان گزارش کردند که یکی از دلایل اصلی تحمل حبوبات به شرایط دیم (کم‌آبی)، اولویت تخصیص مواد فتوسنتزی در مراحل اولیه رشد به سمت ریشه‌ها در برابر اندام‌های هوایی است، بر این مبنی، حبوبات معمولاً از سیستم ریشه‌ای کارآمدتری برخوردار هستند (Hosseinzadeh *et al.*, 2016). بذرهای گیاه

عدس در خاک ایجاد یک ریشه اصلی و مستقیم می‌کنند و سپس از ریشه اصلی انشعابات فرعی ظاهر می‌شود که منشأ ریشه‌های جانبی خواهد بود و این ریشه‌های جانبی ممکن است خود نیز انشعاب یافته و ریشه‌های جانبی ثانویه ایجاد کنند که در جذب بیشتر آب از خاک مؤثر است (Parsa and Bagheri, 2008). بنابراین، جذب کارآمد آب توسط ریشه، یک مشخصه مهم برای تحمل به تنش کمبود آب است، بدین منظور افزایش در ویژگی‌های مورفولوژیکی ریشه از قبیل طول ریشه اصلی، تعداد ریشه‌های جانبی، سطح، قطر و حجم ریشه در بهبود تحمل به تنش کم‌آبی بسیار مؤثر است (Ganjeali and Bagheri, 2011). پاسخ‌های ریشه گیاهان مختلف به تنش کم‌آبی با توجه به شدت و مدت زمان تنش متغیر است و می‌توان در دو بخش آن را شرح داد: الف) تنش کم‌آبی در شدت‌های پایین از یک طرف با کاهش تعرق و اختلال در فرآیند انتقال آب از ریشه به اندام هوایی منجر به کاهش محتوای آب نسبی در اندام‌های فتوسنتزی شده و از طرف دیگر با بستن روزنه‌ها و کاهش ورود CO₂ به سلول‌های مزوفیل در برگ منجر به کاهش فعالیت سیستم فتوسنتزی و در نهایت کاهش تخصیص مواد فتوسنتزی به ریشه‌ها می‌گردد که این رخداد، کاهش ویژگی‌های مورفولوژیک ریشه را به دنبال دارد (Hosseinzadeh *et al.*, 2016). ب) تنش کم‌آبی در شدت‌های بالا که از یک سو با تولید گونه‌های واکنش‌گر اکسیژن (ROS)، تخریب پروتئین D₁ در فتوسیستم نوری II و کاهش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و فتوسنتزی منجر به تخریب سیستم‌های فتوسنتزی و کاهش شدید تولید مواد فتوسنتزی شده و از سوی دیگر با کاهش شدید جذب آب از خاک توسط ریشه‌ها،

مورد استفاده قرار دهند (Ramirez *et al.*, 2006; Nadali *et al.*, 2016). تحقیق حاضر تلاش دارد کلیه صفات مورفولوژی، فیزیولوژی (غلظت عناصر ریشه) و بیوشیمیایی (محتوای پرولین، پروتئین محلول و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان) را در ریشه‌های عدس بررسی کرده و نشان دهد که آیا محلول‌پاشی متانول بر روی برگ‌ها و ساقه‌های این گیاه می‌تواند با تأثیر بر سیستم ریشه‌ای در افزایش تحمل این گیاه به تنش کم‌آبی نقش ایفا کند.

مواد و روش‌ها

به‌منظور بررسی پاسخ‌های ریشه گیاه عدس تحت تأثیر محلول‌پاشی متانول و تنش کم‌آبی آزمایشی در آذر ماه سال ۱۳۹۴ در آزمایشگاه تحقیقاتی فیزیولوژی گیاهی دانشگاه صنعتی خاتم الانبیاء اجرا گردید. آزمایش به‌صورت فاکتوریل بر پایه طرح کاملاً تصادفی با ۳ تکرار انجام شد. تیمارهای مورد بررسی در آزمایش عبارت بودند از محلول‌پاشی متانول در ۵ سطح شامل شاهد (بدون محلول‌پاشی)، ۵، ۱۵، ۲۵ و ۳۵ درصد حجمی و تنش کم‌آبی در ۳ سطح بدون تنش (۱۰۰ درصد ظرفیت زراعی)، تنش ملایم (۷۵ درصد ظرفیت زراعی) و تنش شدید (۲۵ درصد ظرفیت زراعی). تیمارهای مورد بررسی بر اساس آزمایش‌های مقدماتی و نتایج تحقیقات سایر محققان انتخاب شد. برای تهیه خاک هر واحد آزمایشی، خاک تهیه شده ابتدا از الک دو میلی‌متر عبور داده شد و به میزان ۲/۵ کیلوگرم در هر گلدان ریخته شد. بذره‌های عدس (رقم گچساران) به مدت ۲۴ ساعت در آب خیسانده شده و سپس در چهار قسمت از گلدان کشت شدند. گلدان‌ها در اتاقک رشد در شرایط کنترل شده با درجه حرارت روز و شب به ترتیب ۲۵ و ۲۰ درجه سلسیوس و

روند انتقال شیره پرورده در آوند آبکش دچار اختلال شده که در نهایت علاوه بر تأثیر شدید بر ویژگی‌های مورفولوژیک ریشه، فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان ریشه و جذب عناصر غذایی از خاک را نیز به شدت کاهش می‌دهد (Armand *et al.*, 2016). تنظیم اسمزی، تجمع فعال مواد محلول توسط گیاه در واکنش به افزایش کمبود آب در خاک است (Hu and Schmidhalter, 2005). بسیاری از گیاهان به‌منظور تنظیم اسمزی از اسمولیت‌های سازگار مانند پرولین و یا تجمع یون‌های معدنی به‌ویژه کلسیم و پتاسیم استفاده می‌کنند (Cakmak, 2005). همان‌طور که اشاره شد تنش‌های کمبود آب در شدت‌های بالا با تنش اکسیداتیو همراه است، در نتیجه مکانیسم‌های کاهش دهنده تنش اکسیداتیو نقش مهمی در بهبود تحمل به تنش کم‌آبی دارد (Nadali *et al.*, 2015). از مهم‌ترین سیستم‌های دفاع آنتی‌اکسیدانی که نقش مهمی در حذف رادیکال‌های آزاد تولید شده در ریشه را دارند، می‌توان به کاتالاز (CAT)، سوپر اکسید دیسموتاز (SOD) و پراکسیداز (POX) اشاره کرد (Armand *et al.*, 2016). برخی محققان بر این باور هستند که استفاده از ترکیبات افزایش دهنده غلظت CO₂ درون برگ‌ها مثل متانول و اتانول بر نخود می‌تواند اثرات منفی ناشی از تنش کم‌آبی را جبران کرد (Naeimi *et al.*, 2012; Khalilvand Behrouzfar *et al.*, 2014; Armand *et al.*, 2015). متانول در حالت طبیعی در طی رشد برگ‌ها در آفتابگردان و لوبیا بر اثر دمتیلاسیون پکتین در دیواره‌های سلول پدیدار شده و مطالعات نشان داده است که گیاهان مختلف قادر هستند متانول محلول‌پاشی شده بر برگ‌ها و ساقه‌ها را به راحتی جذب کرده و آن را به‌عنوان منبع کربنی اضافه بر کربن اتمسفری

این است که صفات مختلفی از قبیل سطح، قطر، حجم، تعداد میان‌گره‌ها و مجموع طول ریشه‌ها را با استفاده از اسکن ریشه محاسبه می‌کند.

غلظت عناصر سدیم، پتاسیم و کلسیم در

بافت ریشه: اندازه‌گیری میزان عناصر موجود در بافت ریشه، به‌وسیله دستگاه فلیم‌فوتومتر (Sherwood Scientific, Cambridge, United Kingdom) انجام شد (Chapman and Pratt, 1982) بدین صورت که در یک ارلن ۱۰۰ میلی‌لیتری، ۰/۰۵ گرم پودر حاصل از بافت ریشه خشک شده هر تیمار، به‌طور جداگانه با سه میلی‌لیتر اسید نیتریک غلیظ مخلوط شدند. سپس به مدت ۷۲-۴۸ ساعت در محیط آزمایشگاه قرار گرفتند و در نهایت ارلن‌ها در زیر هود و بر روی کوره دمایی به آرامی حرارت داده شد. تصاعد دود سفید و بی‌رنگ شدن محلول اسیدی، نشانه پایان عمل هضم بود. حجم محلول باقی‌مانده با آب مقطر به ۵۰ میلی‌لیتر رسید، سپس غلظت سدیم، پتاسیم و کلسیم با استفاده از منحنی استاندارد بر حسب گرم در صد گرم وزن خشک بافت برگ محاسبه شد.

صفات بیوشیمیایی ریشه: برای استخراج و

سنجش پروتئین و پرولین به‌ترتیب از روش کیرازوف و همکاران (Kirazov *et al.*, 1993) و عزیز و همکاران (Aziz *et al.*, 1999) استفاده شد. مقدار پرولین بر اساس میکرومول در گرم وزن تر نمونه ریشه مطابق فرمول زیر محاسبه شد:

$$\text{میکرومول پرولین در گرم وزن تر} = \left(\frac{\sim g \text{ prolin}}{ml} \times \frac{ml \text{ toloen}}{115} \right) \cdot \frac{gr \text{ sample}}{5} \cdot \frac{1}{\sim g / \sim mol}$$

برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیم پراکسیداز ریشه گیاه عدس منحنی جذب نوری نمونه‌ها با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر (SPEKOL 2000,)

۱۲/۵ ساعت روشنایی و ۱۱/۵ ساعت تاریکی قرار گرفتند. تیمار تنش کم‌آبی بر اساس درصد رطوبت وزنی اعمال شد به‌طوری‌که در ابتدا وزن خاک خشک تعیین شد و در مرحله بعد به آرامی و تا حد اشباع، آب به خاک اضافه شد و پس از خارج شدن کامل آب ثقیلی، گلدان توزین شد و پس از کسر وزن گلدان و خاک خشک، مقدار آب نگهداری شده در ظرفیت زراعی تعیین و تیمارهای مختلف بر این اساس محاسبه شدند (Hosseinzadeh *et al.*, 2016). محلول‌پاشی متانول بر روی برگ‌ها، ساقه‌ها و بستر کشت گیاه ۳ بار در طی مراحل فنولوژی گیاه عدس به‌ترتیب گیاهچه‌ای (۳۰ روز پس از کاشت)، گلدهی و غلاف‌دهی انجام شد. محلول‌پاشی تا زمان جاری شدن قطره‌های محلول بر تمامی قسمت‌های گیاه ادامه یافت (برای هر گلدان حدوداً ۶۷ میلی‌لیتر استفاده شد).

صفات مورفولوژی ریشه: در پایان دوره

رشد، نمونه‌برداری به‌صورت تخریبی انجام شد و جهت خارج نمودن ریشه‌ها از خاک، ابتدا هر گلدان به‌صورت مایل نگه داشته شد و سپس با استفاده از فشار متوسط آب، خاک گلدان نرم شد و در نهایت با خارج کردن آن، ریشه‌ها به‌طور کامل و سالم خارج شدند. به‌منظور تعیین وزن خشک ریشه، نمونه‌ها به مدت ۴۸ ساعت در آون ۷۲ درجه سلسیوس خشک شدند و سپس وزن آنها با ترازوی AND مدل GT-300 ساخت کشور آلمان با دقت ۰/۰۰۱ گرم تعیین شد. صفات ریشه شامل سطح، قطر و حجم ریشه به‌وسیله دستگاه WinRHIZO Pro V ساخت کانادا اندازه‌گیری شد (Regent, Instruments Inc., QC, Canada). این دستگاه از یک اسکنر متصل به کامپیوتر و نرم‌افزار WinRHIZO تشکیل شده و ویژگی این نرم‌افزار

منجر به کاهش صفات عملکردی و مورفولوژیکی می‌شود (Armand *et al.*, 2015). کاهش شدید آب قابل دسترس در محیط کشت منجر به کاهش معنی‌دار وزن خشک ریشه در گیاه نخود شد که محققان علت را کاهش شدید خصوصیات ریشه از قبیل طول، سطح و قطر ریشه‌ها بیان کردند (Hosseinzadeh *et al.*, 2012). در یک آزمایش بر روی سویا کاربرد ۲۱ درصد متانول سبب افزایش ۳۸ درصدی عملکرد و وزن خشک ریشه نسبت به سطح شاهد شد، میرآخوری و همکاران (Mirakhori *et al.*, 2010) بیان کردند که متانول با افزایش میزان تثبیت CO₂ باعث افزایش ماده خشک ریشه می‌شود. آزمایش‌های مختلفی در این زمینه وجود دارد که افزایش فعالیت فتوسنتزی برگ‌ها را در اثر استفاده از محلول‌پاشی متانول تأیید می‌کند (Hosseinzadeh *et al.*, 2016; Armand *et al.*, 2015). یکی از راهبردهای مقاومت به تنش خشکی در گیاهان، اختصاص بیشتر مواد فتوسنتزی به ریشه‌ها نسبت به اندام‌های هوایی است تا رشد ریشه محدود نگردد (Ganjeali and Bagheri, 2011). به نظر می‌رسد که افزایش تولیدات فتوسنتزی در برگ‌ها در اثر محلول‌پاشی متانول و انتقال به ریشه‌ها در تنظیم اسمزی سلول‌های ریشه به علت کاهش تلفات قند تولیدی حاصل از تنفس نوری، نقش مهمی داشته و منجر به افزایش وزن خشک ریشه می‌شوند (Armand *et al.*, 2015). نتایج جدول ۳ نشان می‌دهد که در شرایط بدون تنش کم‌آبی، سطوح ۱۵ درصد حجمی متانول منجر به افزایش معنی‌دار طول ریشه اصلی (۳۵/۵ سانتی‌متر) در مقایسه با سطح شاهد شد (Hosseinzadeh *et al.*, 2012). در شرایط تنش کم‌آبی ملایم و شدید، سطوح ۵ و ۱۵ درصد حجمی متانول به‌صورت

(Analytic Jena, Germany) هر ۳۰ ثانیه به مدت ۳ دقیقه در طول موج ۵۳۰ نانومتر رسم شد و در نهایت فعالیت ویژه آنزیم بر حسب تغییرات واحد آنزیم در دقیقه به ازای هر میلی‌گرم پروتئین محاسبه شد (Liu *et al.*, 1995). فعالیت آنزیم کاتالاز در بافت ریشه با استفاده از روش کندلی و اسکاندلیوس (Candlee and Scandalios, 1984) انجام شد. در این روش منحنی تغییرات جذب در طول موج ۲۴۰ نانومتر به مدت ۳-۴ دقیقه بررسی شد. فعالیت آنزیم بر حسب تغییرات واحد در دقیقه به ازای هر میلی‌گرم پروتئین محاسبه شد. سنجش فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز بافت ریشه به‌وسیله روش بیوچمپ و فری‌دوویچ (Beauchamp and Fridovich, 1971) انجام شد. آنالیزهای آماری به‌وسیله نرم‌افزار MASTATC انجام شد. به‌منظور تعیین سطح معنی‌داری شاخص‌های مورد بررسی در اثر محلول‌پاشی متانول و تنش کم‌آبی از تجزیه واریانس (ANOVA) استفاده شد. میانگین‌ها با استفاده از آزمون دانکن ($p \leq 0.05$) مقایسه شدند.

نتایج و بحث

بررسی صفات کیفی و مورفولوژیک ریشه

نتایج تجزیه واریانس داده‌ها در این مطالعه نشان داد که اثرات متقابل محلول‌پاشی متانول و تنش کم‌آبی بر پروتئین و پرولین (۱ درصد) معنی‌دار شد (جدول ۱ و ۲). حداکثر وزن خشک ریشه در تیمار محلول‌پاشی ۱۵ درصد متانول در هر سه روش آبیاری نسبت به شاهد حاصل شد (جدول ۳). در شرایط تنش ملایم نیز، سطوح ۵ و ۱۵ درصد متانول به‌ترتیب با ۳/۶۷ و ۳/۷۱ گرم افزایش معنی‌داری در مقایسه با سطح شاهد داشت (جدول ۳). تنش کم‌آبی شدید با تغییر در فعالیت‌های متابولیکی و فیزیولوژیکی در گیاهان

تنش ملایم و شدید، تفاوت معنی‌داری بین سطوح متانول و شاهد مشاهده نشد (جدول ۳). سیستم ریشه گیاه از لحاظ انتشار آن در لایه‌های سطحی، عمق متوسط و لایه عمیق از لحاظ جذب آب از رطوبت موجود در خاک و میزان بخش فعال ریشه از جهت جذب آب و عناصر غذایی و افزایش فشار اسمزی در سلول برای تحمل در برابر تنش کمبود آب، نقش مهمی ایفا می‌نماید (Ganjeali and Bagheri, 2011; Bahadoran *et al.*, 2015). افزایش صفات مورفولوژیکی ریشه از قبیل طول، سطح، قطر و حجم به این علت که می‌توانند در بهره‌برداری ریشه از رطوبت و عناصر غذایی موجود در خاک موثر باشند، می‌توانند در تحمل به تنش کمبود آب نقش به‌سزایی داشته باشند (Hosseinzadeh *et al.*, 2012). کاهش آب قابل دسترس در خاک به دلیل تحت تأثیر قرار دادن تغییرات فشار آماس در سلول‌های ریشه، منجر به توقف رشد ریشه می‌گردد، به این صورت که با کمبود آب پیوندهای موجود در دیواره سلول‌های ریشه سخت‌تر شده و در نتیجه توسعه‌پذیری و رشد طولی ریشه محدود می‌شود (Rahbarian *et al.*, 2011). در این تحقیق مشاهده شد که محلول‌پاشی متانول در شرایط تنش ملایم و شدید اثر مثبت معنی‌داری بر طول ریشه داشت. یکی از مهم‌ترین مزایای محلول‌پاشی متانول افزایش جذب آب به‌واسطه حفظ پتانسیل اسمزی سلول‌های ریشه است. متانول بعد از محلول‌پاشی متابولیزه شده و با افزایش میزان CO_2 درون برگ‌گی سبب افزایش فتوسنتز و تولید کربوهیدرات شده که این ترکیبات از طریق آوند آبکش به ریشه‌ها منتقل شده و در نتیجه منجر به برقراری پتانسیل اسمزی منفی‌تر و جذب بیشتر آب در سلول‌های ریشه

معنی‌داری طول ریشه اصلی را در مقایسه با سطح شاهد افزایش داد (جدول ۳). مقایسه میانگین داده‌ها در برهم‌کنش متانول و تنش کم‌آبی بر سطح ریشه گیاهچه‌های عدس نشان داد که در شرایط بدون تنش کم‌آبی، تمامی سطوح متانول منجر به افزایش معنی‌دار این صفت نسبت به شاهد شد. در شرایط تنش ملایم، سطوح ۵، ۱۵ و ۲۵ درصد حجمی متانول با $۸/۷۱$ ، $۸/۳۸$ و $۷/۸۵$ میلی‌متر مربع افزایش معنی‌داری در مقایسه با سطح شاهد داشت. مقایسه تیمارهای متانول در شرایط تنش شدید تفاوت معنی‌داری را نشان نداد (جدول ۱). احتمالاً در شرایط تنش شدید، گیاه با تنفس بالایی همراه بوده و در نتیجه گیاه نتوانسته است اثرات متمایز تحریکات هورمونی مؤثر بر رشد را در غلظت‌های مختلف، از خود نشان دهد. نتایج این تحقیق در ارتباط با اثر تیمارهای مورد مطالعه بر حجم ریشه نشان می‌دهد که در شرایط بدون تنش کم‌آبی، سطوح ۱۵ و ۲۵ درصد حجمی به صورت معنی‌داری این صفت را در مقایسه با شاهد افزایش داد. محلول‌پاشی متانول به‌دلیل غنی‌سازی دی‌اکسید کربن و کاهش تنفس نوری می‌تواند بر رشد بخش هوایی گیاه نقش مثبتی نشان دهد، رشد مطلوب بخش‌های فتوسنتز کننده نیز بر توسعه ریشه و افزایش عمق نفوذ ریشه و حجم ریشه نیز اثرات مثبتی اعمال می‌نماید (Armand *et al.*, 2016). در شرایط تنش کم‌آبی ملایم و شدید، اختلاف معنی‌داری بین تیمار از لحاظ حجم ریشه مشاهده نشد (جدول ۳). مقایسه میانگین‌ها نشان داد که در تیمار بدون تنش کم‌آبی، سطوح ۵، ۱۵ و ۲۵ درصد حجمی به‌ترتیب با $۰/۶۲۳$ ، $۰/۶۲۰$ و $۰/۶۴۶$ میلی‌متر مربع منجر به افزایش معنی‌دار قطر ریشه در مقایسه با سطح شاهد ($۰/۴۵۶$ میلی‌متر مربع) شد. در شرایط

تنگاتنگی با وضعیت آب قابل دسترس برای گیاه دارد (Arndt et al., 2001). محدودیت در فرآیند تعرق، کاهش انتقال فعال و قابلیت نفوذ غشا از جمله عواملی است که در اثر کمبود آب به وجود آمده و منجر به کاهش انتقال عناصر از محیط ریشه به داخل گیاه می‌شود (Armand et al., 2016). در آزمایشی روی لوبیا که تحت شوری قرار گرفته بود، مشاهده شد با اعمال تنش و خشکی فیزیولوژیک (کمبود آب قابل دسترس) برای گیاه جذب پتاسیم به صورت معنی‌داری کاهش یافت که علت را کاهش حلالیت پتاسیم در محیط ریشه بیان کردند (Beyk Khurmizi et al., 2013). در تحقیقی مشابه مشاهده شد در شرایط تنش کم آبی کلونیدهای خاک با قدرت بیشتری پتاسیم را جذب می‌کنند و منجر به کاهش حلالیت این عنصر و عدم جذب آن توسط ریشه شدند (Cakmak, 2005). در این تحقیق نیز تنش کم آبی شدید در کاهش معنی‌دار جذب پتاسیم از خاک مؤثر بود.

بررسی غلظت کلسیم ریشه

اثرات برهمکنش محلول‌پاشی متانول و تنش خشکی بر کلسیم ریشه در سطح احتمال ۱ درصد معنی‌دار شد (جدول ۱ و ۲). نتایج شکل ۳ نشان می‌دهد که محلول‌پاشی متانول در سطوح ۵، ۱۵ و ۲۵ درصد به ترتیب با ۳/۱۰۷، ۳/۰۶۷ و ۲/۹۶۳ (گرم در ۱۰۰ گرم وزن خشک ریشه) منجر به افزایش معنی‌دار غلظت کلسیم ریشه نسبت به سطح شاهد در شرایط بدون تنش شد. مطابق نتایج برخی پژوهشگران تنش خشکی از طریق انتقال کلسیم از ریشه به بخش هوایی با کاهش کلسیم ریشه همراه می‌باشد اما شرایط بدون تنش خشکی مانع از انتقال کلسیم ریشه به بخش هوایی شده (Nudrat Ashia et al., 2008) و

شده که در حفظ فشار آماس و افزایش رشد طولی ریشه بسیار مؤثر است (Hosseinzadeh et al., 2012). بنابراین، افزایش سطح ریشه در سطوح ۵، ۱۵ و ۲۵ درصد متانول را در شرایط بدون تنش و تنش ملایم را می‌توان به افزایش طول و وزن خشک ریشه در این سطوح نسبت داد که این نتایج با گزارش پارسا و باقری (Parsa and Bagheri, 2008) مطابقت داشت.

بررسی غلظت سدیم ریشه

اثرات برهمکنش محلول‌پاشی متانول و تنش خشکی بر سدیم ریشه در سطح احتمال ۵ درصد معنی‌دار شد (جدول ۱ و ۲ و شکل ۱). غلظت زیاد سدیم در ریشه و برگ بروز مشکلات اسمزی و متابولیک را در گیاه موجب شده و سمیت حاصل از تجمع بیش از حد این عنصر در گیاه منجر به کاهش فتوسنتز و تولید ماده خشک می‌شود (Tester and Davenport, 2003). مطالعات نشان می‌دهد که در هنگام تنش خشکی، میزان سدیم در ریشه افزایش می‌یابد و برای جلوگیری از سمیت آن، گیاه سعی در خروج و یا به واکوئل فرستادن آن دارد (Tester and Davenport, 2003).

بررسی غلظت پتاسیم ریشه

اثرات برهمکنش محلول‌پاشی متانول و تنش خشکی بر پتاسیم ریشه در سطح احتمال ۵ درصد معنی‌دار شد (جدول ۱ و ۲). غلظت پتاسیم ریشه در تیمار آبیاری نرمال و محلول‌پاشی ۵، ۱۵ و ۲۵ درصد متانول نسبت به غلظت محلول‌پاشی ۳۵ درصد از لحاظ آماری در گروه متفاوت بالاتری قرار گرفتند (شکل ۲). کمبود آب در خاک منجر به کاهش انتقال مواد غذایی از خاک به ریشه‌ها می‌گردد، به طوری که محققین اعتقاد دارند که جذب مواد غذایی از خاک ارتباط مستقیم و

متانول از طریق افزایش تحریک هورمون‌های رشد و توسعه ریشه در افزایش کارایی جذب کلسیم مؤثر بوده و از این طریق کلسیم سلول ریشه افزایش یافته است (Pardo *et al.*, 1998). در شرایط تنش ملایم، سطوح ۵ و ۱۵ درصد متانول (با ۲/۳۷۳ و ۲/۴۲۷ گرم در ۱۰۰ گرم وزن خشک ریشه) میزان این عنصر را به صورت معنی‌داری در مقایسه با سطح شاهد افزایش داد اما در شرایط تنش شدید، سطوح متانول و سطح شاهد اختلاف معنی‌داری با یکدیگر نداشتند (شکل ۳). در حقیقت، در شرایط تنش شدید انتقال مواد هورمونی در گیاه به شکل مناسب صورت نمی‌گیرد و در نتیجه مانع از بروز تفاوت‌های میان تیمارهای متانول نسبت به شاهد شده است (Khalilvand Behrouzfar *et al.*, 2014).

کلسیم در گیاهان نقش‌های مهمی از قبیل حفظ و پایداری غشا سلول، جوانه‌زنی و رشد دانه، فعال کردن تعدادی از آنزیم‌ها، تقسیم و بزرگ شدن سلول‌ها و استحکام دیواره‌ها دارند (Hu and Schmidhalter, 2005). علاوه بر این، یون کلسیم به عنوان پیک ثانویه در گیاهان عمل می‌کند و در ترارسانی انواع وسیعی از علائم شرکت دارد، بنابراین ممکن است جزء مهمی از پاسخ گیاهان به خشکی باشد (Beyk Khurmizi *et al.*, 2013).

با کاهش رطوبت خاک، حرکت کلسیم از خاک به سطح ریشه‌ها کاهش می‌یابد و این کاهش به دلیل بسته شدن روزنه‌ها و به دنبال آن محدود شدن سرعت تعرق، افزایش می‌یابد (Hu and Schmidhalter, 2005). یکی از مهم‌ترین نقش‌های محلول‌پاشی متانول در گیاهانی که با کمبود آب مواجه هستند، افزایش رطوبت و محتوای نسبی آب برگ‌ها است که در افزایش سرعت تعرق نقش به‌سزایی دارند (Nadali *et al.*, 2016; Wei *et al.*, 2015).

نتایج این تحقیق نشان داد که متانول تأثیر مثبتی در شرایط بدون تنش و تنش ملایم بر جذب کلسیم از خاک دارد که احتمالاً با افزایش سرعت تعرق در گیاه و افزایش صفات مورفولوژیک ریشه مرتبط است. در شرایط تنش خشکی میزان جذب پتاسیم توسط ریشه کاهش یافته و در نتیجه نسبت پتاسیم به سدیم ریشه کاهش می‌یابد که این امر منجر به کاهش عملکرد دانه می‌شود (Fanaei *et al.*, 2013). عوامل تخفیف دهنده تنش خشکی مانند مصرف متانول با غلظت مناسب با کاهش میزان تنفس نوری با توسعه بیشتر ریشه همراه بوده و این امر در جذب موفق‌تر پتاسیم و افزایش نسبت پتاسیم به سدیم می‌شود که از این طریق مانع کاهش عملکرد می‌گردد (Hosseinzadeh *et al.*, 2012).

حقیقت افزایش میزان پتاسیم در ریشه در تنظیمات تعرقی تحت شرایط تنش خشکی مانع از بسته شدن روزنه‌ای و مانع از جذب پتاسیم توسط ریشه می‌شود. افزایش تجمع کلسیم در ریشه که با تجمع پتاسیم رابطه معکوس دارد باعث سخت شدن دیواره سلولی و کاهش نفوذپذیری سلول‌های ریشه شده و از این طریق میزان جذب عنصر پتاسیم که در تنظیمات روزنه‌ای و تحمل به خشکی نقش دارد را با مشکل روبرو می‌سازد (Fanaei *et al.*, 2013). رابطه معکوس پتاسیم و سدیم هم‌نشانه آن است که عدم تجمع سدیم در ریشه از سمیت این عنصر کاسته و مانع آسیب رسانی به رشد بخش‌های فعال ریشه می‌شود. متانول با حفظ انرژی حاصل از تلفات تنفس نوری در جذب کلسیم توسط ریشه کمک کرده و افزایش میزان کلسیم با انتقال بهتر پتاسیم از ریشه به بخش‌های روزنه‌ای در کاهش تعرق و حفظ رطوبت بافت کمک می‌کند (Hosseinzadeh

2015).

شرایط اسیدی بیشترین فعالیت را دارد (Yordanov *et al.*, 2003)، بنابراین احتمالاً افزایش پرولین در اثر استفاده از متانول در شرایط تنش کم آبی شدید را می‌توان به افزایش اسیدیته سلول نسبت داد. محتوای پروتئین ریشه در اثر محلول‌پاشی متانول در غلظت‌های ۵، ۱۵ و ۲۵ درصد در مقایسه با سطح شاهد در شرایط بدون تنش و تنش ملایم به‌صورت معنی‌داری افزایش یافت. در تیمار تنش کم آبی شدید، محلول‌پاشی متانول اختلاف معنی‌داری با سطح شاهد نداشت (جدول ۴). پروتئین‌های ویژه‌ای در مسیر سازش گیاه به تنش کم آبی سنتز شده و یا تولید برخی از آنها افزایش می‌یابد (Hosseinzadeh *et al.*, 2016). دهیدرین‌ها، آنزیم‌های سنتز کننده متابولیت‌ها و همچنین پروتئین‌هایی که در پاسخ به آسیب سلولی درگیر می‌شوند (پروتئین‌های شوک حرارتی)، از مهم‌ترین پروتئین‌های محلول در ریشه می‌باشند (Demirevska *et al.*, 2008). در این آزمایش بالاترین میزان پروتئین محلول در تیمار محلول‌پاشی ۱۵ درصد متانول در تیمار بدون تنش آبیاری حاصل شد (جدول ۴). بنابراین تجمع املاح از جمله پرولین و پروتئین‌های محلول منجر به کاهش پتانسیل اسمزی سلول‌های ریشه شده که به نوبه خود در افزایش بیشتر آب به درون سلول و حفظ فشار تورگر در مقابله با تنش کمبود آب نقش ایفا می‌کنند (Najafi *et al.*, 2010). مطالعات نشان داده است که متانول توسط برخی از باکتری‌های همزیست (متیلوتروفیک) استقرار یافته بر برگ و ساقه گیاهان زراعی، مصرف می‌شود (Mirakhori *et al.*, 2010). این باکتری‌ها در صورت دریافت متانول که به‌صورت طبیعی از گیاه در طی فرآیند دمتیلاسیون پکتین‌ها در دیواره سلول خارج

(*et al.*, 2012). افزایش میزان سدیم در ریشه باعث ایجاد سمیت در سلول‌های ریشه شده که گیاه با افزایش میزان غلظت کلسیم از طریق انتقال کمتر کلسیم به بخش هوایی باعث سخت شدن بخش ریشه جهت ممانعت در جذب سدیم می‌شود (Sadatjamali *et al.*, 2015).

بررسی صفات بیوشیمیایی

نتایج مقایسه میانگین داده‌ها در جدول ۴ نشان داد که در شرایط بدون تنش تیمارهای محلول‌پاشی ۵، ۱۵ و ۲۵ درصد متانول از لحاظ میزان پرولین ریشه نسبت به تیمار شاهد در گروه بالاتر آماری قرار گرفتند. در تیمار تنش ملایم، محتوای پرولین ریشه تحت تأثیر محلول‌پاشی متانول قرار نگرفت، همچنین در شرایط تنش شدید، نیز تمامی تیمارهای متانول نسبت به تیمار شاهد در یک گروه آماری قرار گرفتند. یکی از مهم‌ترین پاسخ‌های دفاعی گیاهان در برابر شرایط کمبود آب، شوری، دماهای بالا و شدت‌های بالای نور، افزایش محتوای پرولین به‌منظور تنظیم اسمزی و محافظت از سلول است (Tewfik, 2008). گیاهان متحمل به تنش، از توانایی بیشتر سنتز پرولین و متعاقب آن از پایداری بیشتر غشاء برخوردار هستند که نتیجه آن، هدر رفت کمتر آب از طریق غشاهای سلولی می‌باشد (Bayoumi *et al.*, 2008). در آزمایش‌های متعدد بر گیاهان مختلف دلیل افزایش پرولین در شرایط تنش خشکی و شوری را افزایش فعالیت آنزیم بیوسنتزی پرولین (آنزیم پیروولین ۵- کربوکسیلات سنتتاز) گزارش کردند (Najafi *et al.*, 2010). با توجه به این‌که محلول‌پاشی متانول با کاهش pH (آزاد کردن H^+) در سلول‌های گیاهی همراه است (Armand *et al.*, 2016) و از سوی دیگر گزارش شده که آنزیم پیروولین ۵- کربوکسیلات سنتتاز در

فعالیت این آنزیم را در مقایسه با سطح شاهد کاهش داد، اما این کاهش در مقایسه با سطح ۱۵ درصد متانول معنی‌دار نبود (جدول ۴). گونه‌های واکنش‌گر اکسیژن از مهم‌ترین ترکیبات تولید شده در شرایط تنش کم‌آبی هستند که این ترکیبات در غلظت‌های پایین به عنوان پیک ثانویه در مسیرهای ترانس‌سانی علامت برای پاسخ سلول‌ها به تنش عمل می‌کنند (Bahadoran *et al.*, 2015) اما در غلظت‌های بالا موجب اکسید شدن لیپیدها، تغییر ساختار غشا، تخریب سیستم‌های نوری فتوسنتزی و رنگدانه‌ها، غیر فعال شدن آنزیم‌ها، آسیب به انتقال فعال و غیرفعال به ترتیب در آوند آبکش و چوب می‌شود (Bahadoran *et al.*, 2015). گیاهان برای کنترل گونه‌های واکنش‌گر اکسیژن مجموعه‌ای از آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی را درگیر می‌کند (Armand *et al.*, 2016). آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان از قبیل پراکسیداز، سوپراکسید دیسموتاز و کاتالاز اولین سد دفاعی در برابر این ترکیبات می‌باشند، از طرفی با توجه به گزارش‌های متعدد در ارتباط با افزایش گونه‌های واکنش‌گر اکسیژن در شرایط تنش خشکی (Abrishamchi *et al.*, 2012) بنابراین افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان تحت تنش خشکی منطقی است. سوپراکسید دیسموتاز اولین مرحله دفاعی علیه گونه‌های واکنش‌گر اکسیژن را تشکیل می‌دهد و یکی از مهم‌ترین پالایش‌کننده‌های سوپراکسید است. در نتیجه فعالیت این آنزیم سوپراکسید به پراکسید هیدروژن و اکسیژن تبدیل شده و سپس پراکسید هیدروژن تولید شده به وسیله پراکسیدازها پالایش می‌گردد (Abrishamchi *et al.*, 2012). افزایش فعالیت پراکسیداز و کاتالاز تحت تنش آب نشان دهنده شکل‌گیری بخش زیادی پراکسید هیدروژن

می‌شود، پیش ماده ساخت بعضی از هورمون‌ها نظیر اکسین و سیتوکینین را در اختیار گیاه قرار می‌دهند (Ivanova *et al.*, 2001). با توجه به این که این هورمون‌ها در افزایش پروتئین‌سازی نقش مهمی دارند (Armand *et al.*, 2016)، بنابراین می‌توان گفت که محلول پاشی متانول به صورت غیرمستقیم در افزایش تولید و سنتز پروتئین‌های محلول ریشه نقش دارد. در آزمایشی بر سویا گزارش شد که محلول پاشی متانول منجر به افزایش مقدار پروتئین در گیاه شد (Mirakhori *et al.*, 2010). در بررسی فعالیت آنزیم کاتالاز، تنش کم‌آبی شدید منجر به افزایش معنی‌دار فعالیت این آنزیم در مقایسه با تیمار بدون تنش شد. مقایسه بین سطوح محلول پاشی متانول و سطح شاهد در هر ۳ تیمار تنش کم‌آبی (بدون تنش، ملایم و شدید) تفاوت معنی‌داری را در فعالیت آنزیم کاتالاز نشان نداد (جدول ۴). نتایج مقایسه میانگین داده‌ها در ارتباط با فعالیت آنزیم پراکسیداز ریشه نشان داد که سطوح ۵، ۱۵ و ۲۵ درصد متانول در شرایط بدون تنش منجر به کاهش معنی‌دار فعالیت این آنزیم در مقایسه با سطح شاهد شد. در شرایط تنش کم‌آبی ملایم نیز مشاهده شد که تمامی سطوح متانول در یک ردیف آماری و سطح شاهد در ردیف جداگانه قرار گرفت به طوری که محلول پاشی متانول منجر به کاهش معنی‌دار فعالیت پراکسیداز شد. در شرایط تنش شدید سطوح متانول و سطح شاهد تفاوت معنی‌داری باهم نداشتند (جدول ۴). نتایج جدول ۴ نشان می‌دهد که در شرایط بدون تنش کم‌آبی، کلیه سطوح متانول منجر به کاهش معنی‌دار فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز نسبت به سطح شاهد شد. در شرایط تنش ملایم و شدید، سطح ۲۵ درصد متانول به صورت معنی‌داری

نقش مؤثری در افزایش رطوبت و محتوای آب نسبی برگ‌ها دارد که دلیل آن را محققان دو برابر شدن کربوهیدرات تولید شده در برگ‌ها با کاربرد متانول بیان کردند (Armand *et al.*, 2015; Wei *et al.*, 2015). بنابراین، محلول‌پاشی متانول از یک طرف با افزایش رطوبت برگ‌گی در باز نگاه داشتن روزنه‌ها و انجام عمل تعرق اهمیت دارد و از طرف دیگر با افزایش CO_2 درون برگ‌گی و فتوسنتز موجب کاهش تولید گونه‌های واکنش‌گر اکسیژن می‌شود. کاهش معنی‌دار فعالیت آنزیم پراکسیداز و کاتالاز با محلول‌پاشی متانول را می‌توان به افزایش قدرت جذب آب از طریق افزایش تعرق و کاهش تولید گونه‌های واکنش‌گر اکسیژن در برگ‌ها از طریق افزایش فتوسنتز نسبت داد.

نتیجه‌گیری کلی

در شرایط بدون تنش خشکی بالاترین میزان طول ریشه (۳۵/۵ سانتی متر) به تیمار ۱۵ درصد محلول‌پاشی متانول تعلق داشت. بالاترین میزان طول ریشه (۲۹/۱۷ سانتی متر) در تیمار تنش کم آبی شدید از محلول‌پاشی ۱۵ درصد متانول حاصل شد که نسبت به تیمار ۵ درصد در یک گروه آماری قرار گرفتند. در شرایط بدون تنش بهترین تیمار افزایش سطح ریشه (۱۱/۴۳ میلی متر مربع) از محلول‌پاشی ۵ درصد متانول حاصل شد. محلول‌پاشی ۵ درصد متانول باعث افزایش 0.623 میلی‌متر قطر ریشه شد. تیمار ۵ درصد متانول موجب افزایش $1/3$ گرم ماده خشک ریشه شد. میزان افزایش وزن خشک ریشه در شرایط تنش شدید خشکی به میزان 0.7 گرم بود. تیمار ۵ درصد متانول در شرایط بدون تنش باعث افزایش محتوای پرولین به میزان 200 میکرو مول بر گرم وزن تر ریشه شد. همچنین، تیمار ۵ درصد متانول در شرایط بدون تنش موجب کاهش فعالیت آنزیم

در طول تنش آبی است (Helal and Samir, 2008). بستن روزنه‌ها اولین پاسخ عملکردی گیاهان به شرایط کمبود آب است تا آب کمتری از طریق تعرق از گیاه خارج شود اما از طرفی با کاهش تعرق، نیروی مکش حاصل از این فرآیند که در انتقال آب در آوند چوب از ریشه به اندام هوایی مؤثر است، نیز کاهش می‌یابد، در نتیجه قدرت جذب آب از خاک توسط ریشه‌ها کاهش یافته و اثرات منفی تنش بیشتر نمایان می‌شود (Hosseinzadeh *et al.*, 2016). باید توجه داشت که با بسته شدن روزنه‌ها، ورود CO_2 به داخل سلول‌های برگ‌گی نیز کاهش یافته و فعالیت کربوکسیلاسیون آنزیم روبیسکو برای تولید کربوهیدرات مورد نیاز گیاه با تأخیر مواجه می‌شود (Rahbarian *et al.*, 2011). در این حالت مولکول‌های پر انرژی NADPH و ATP که در جریان مرحله نوری فتوسنتز تولید شده، مصرف نشده و اکسیژن به‌عنوان پذیرنده الکترون‌ها عمل کرده و منجر به تشکیل رادیکال‌های سوپراکسید می‌شود (Yordanov *et al.*, 2003). در نهایت رادیکال‌های تولید شده از طریق آوند آبکش به بخش‌های پایین‌تر گیاه منتقل شده و علاوه بر آسیب رساندن به انتقال فعال منجر به افزایش گونه‌های واکنش‌گر اکسیژن در ریشه‌ها می‌شود (Armand *et al.*, 2015). متانول با تبدیل به CO_2 سبب افزایش غلظت CO_2 درون سلول‌های برگ‌گی شده و با انجام عمل فتوسنتز و ماده‌سازی بیشتر منجر به مصرف NADPH و ATP تولید شده در زنجیره انتقال الکترون می‌گردد و بدین طریق از تجمع آن در کلروپلاست سلول‌های برگ‌گی و تشکیل سوپراکسید جلوگیری می‌شود (Hosseinzadeh *et al.*, 2016). از طرف دیگر، مطالعات نشان داده است که محلول‌پاشی متانول

پراکسیداز و سوپر دیسموتاز ریشه شد. تنش خشکی موجب افزایش میزان غلظت سدیم ریشه شد. در شرایط تنش خشکی ۷۵ درصد ظرفیت زراعی غلظت پتاسیم ریشه در تیمار متانول ۲۵ درصد کمتر از میزان متانول ۱۵ درصد بود. غلظت کلسیم ریشه در تیمارهای متانول ۵، ۱۵ و ۲۵ درصد بیش از تیمار شاهد بود.

جدول ۱- نتایج تجزیه واریانس صفات مورفولوژیکی و غلظت عناصر ریشه گیاه عدس در سطوح مختلف محلول‌پاشی متانول و تنش کم‌آبی

Table 1- Analysis of variance results in morphological traits and element density of root lentil in different levels of methanol foliar application and drought stress

منابع تغییر S.O.V.	درجه آزادی df	طول ریشه Tap root length	سطح ریشه Root area	حجم ریشه Root volume	قطر ریشه Root diameter	وزن خشک ریشه Root dry weight	غلظت پتاسیم K Concentrati on	غلظت سدیم Na Concentration
متانول Methanol (a)	4	35.357**	11.265**	0.0004**	0.025**	1.023**	0.008 ^{ns}	0.012**
تنش خشکی Drought stress (b)	2	92.374**	46.620**	0.002**	0.345**	2.088**	0.232**	1.233**
متانول × تنش a×b	8	3.722 *	1.565**	0.0001**	0.007 *	0.028*	0.002*	0.003*
خطای آزمایش Error	30	1.255	0.334	0.0001	0.002	0.031	0.008	0.003
ضریب تغییرات CV (%)		3.85	7.48	8.24	11.62	5.12	3.37	2.75

^{ns}, *, **: به ترتیب غیرمعنی‌دار و معنی‌دار در سطح احتمال ۵ و ۱ درصد
^{ns}, *, **: non-significant and significant at 5 and 1% probability levels, respectively

جدول ۲- نتایج تجزیه واریانس صفات بیوشیمیایی ریشه گیاه عدس در سطوح مختلف محلول‌پاشی متانول و تنش خشکی
Table 2- Analysis of variance of root biochemical traits of lentil in different levels of methanol foliar application and drought stress

منابع تغییر S.O.V	درجه آزادی df	غلظت کلسیم Ca Concentration	پروترین Proline	پروتئین Protein	کاتالاز CAT enzyme	پراکسیداز POX enzyme	سوپراکسید دیسموتاز SOD enzyme
متانول Methanol (a)	4	0.093**	0.020**	128.337**	0.0002 _{ns}	0.001*	0.001*
تنش خشکی Drought stress (b)	2	2.596**	0.215**	1251.760**	0.003**	2.236**	0.749**
متانول × تنش a×b	8	0.034**	0.008**	23.171**	0.0001 _{ns}	0.0002*	0.0001*
خطای آزمایش Error	30	0.005	0.002	6.597	0.0001	0.012	0.001
ضریب تغییرات CV (%)		2.90	3.34	2.85	1.32	6.84	7.95

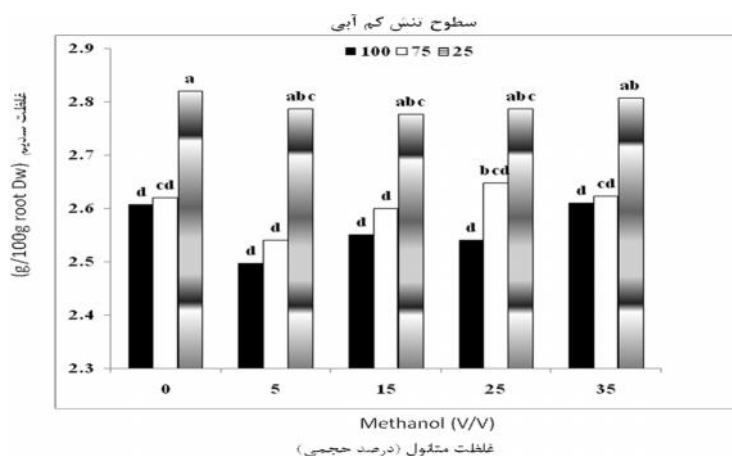
^{ns}, *, **: به ترتیب غیرمعنی‌دار و معنی‌دار در سطح احتمال ۵ و ۱ درصد
^{ns}, *, **: non-significant and significant at 5 and 1% probability levels, respectively

جدول ۳- مقایسه میانگین صفات مورفولوژیکی عدس تحت تأثیر سطوح محلول پاشی متانول و تنش کمبود آب
Table 3- Comparison of morphological traits of lentil under different levels of methanol application and water deficit stress

تیمارها/ متانول /Treatments Methanol	طول ریشه Tap root length (cm)	سطح ریشه Root area (mm ²)	حجم ریشه Root volume (cm ³)	قطر ریشه Root diameter (mm ²)	وزن خشک ریشه Root dry weight (g/plant)
Non-stress (100% field of capacity)			بدون تنش کم‌آبی (۱۰۰ درصد ظرفیت زراعی)		
شاهد	28.17 ^{cde}	7.307 ^{de}	0.035 ^{bc}	0.456 ^b	3.367 ^{efgh}
5%	32.83 ^b	11.170 ^a	0.046 ^{ab}	0.623 ^a	4.003 ^{ab}
15%	35.50 ^a	11.430 ^a	0.056 ^a	0.620 ^a	4.247 ^a
25%	33 ^b	9.423 ^b	0.053 ^a	0.646 ^a	3.960 ^{abc}
35%	29.27 ^{cd}	8.807 ^{bc}	0.034 ^{bc}	0.420 ^{bc}	3.547 ^{def}
Moderate water stress (75% field of capacity)			تنش کم‌آبی ملایم (۷۵ درصد ظرفیت زراعی)		
شاهد	26.50 ^{efg}	6.077 ^{fg}	0.024 ^c	0.376 ^{bcd}	3.077 ^h
5%	30.27 ^c	8.383 ^{bc}	0.032 ^{bc}	0.430 ^{bc}	3.673 ^{cde}
15%	30.17 ^c	8.710 ^{bc}	0.035 ^{bc}	0.423 ^{bc}	3.713 ^{bcd}
25%	28.83 ^{cd}	7.857 ^{cd}	0.032 ^{bc}	0.416 ^{bc}	3.340 ^{fgh}
35%	27.50 ^{def}	6.020 ^{fg}	0.025 ^c	0.356 ^{cde}	3.147 ^{gh}
Severe water stress (25% field of capacity)			تنش کم‌آبی شدید (۲۵ درصد ظرفیت زراعی)		
شاهد	25 ^g	5.860 ^{fg}	0.020 ^c	0.266 ^f	2.683 ⁱ
5%	27.57 ^{def}	6.360 ^{efg}	0.023 ^c	0.310 ^{def}	3.333 ^{fgh}
15%	29.17 ^{cd}	6.803 ^{ef}	0.024 ^c	0.310 ^{def}	3.447 ^{defg}
25%	25.83 ^{fg}	6.150 ^{fg}	0.021 ^c	0.326 ^{def}	3.290 ^{fgh}
35%	26.67 ^{efg}	5.550 ^g	0.018 ^c	0.283 ^{ef}	2.657 ⁱ

* در هر ستون میانگین‌هایی که حداقل دارای یک حرف مشترک می‌باشند مطابق آزمون دانکن $(p \leq 0.05)$ اختلاف معنی‌داری ندارند.

* The means with one same letter in each column are not significantly differences at $p \leq 0.05$ according to duncan's test.

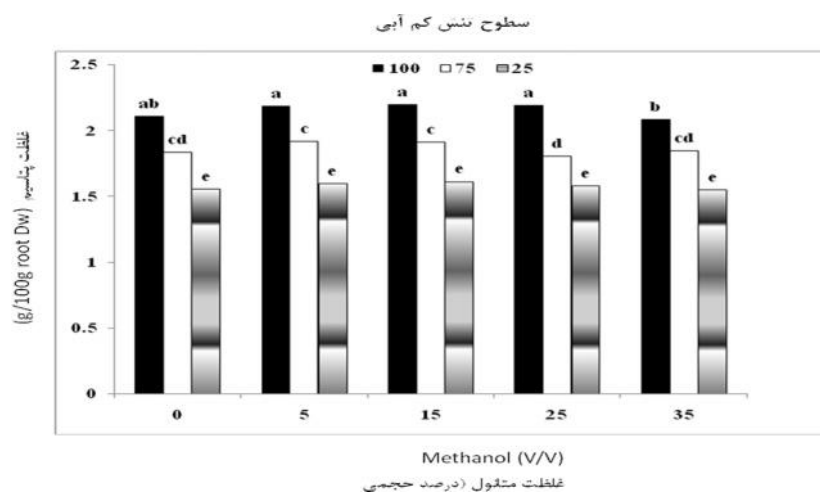


شکل ۱- اثر متقابل محلول پاشی متانول و تنش کم‌آبی بر غلظت سدیم ریشه

Figure 1- Methanol and drought stress interaction on sodium root density.

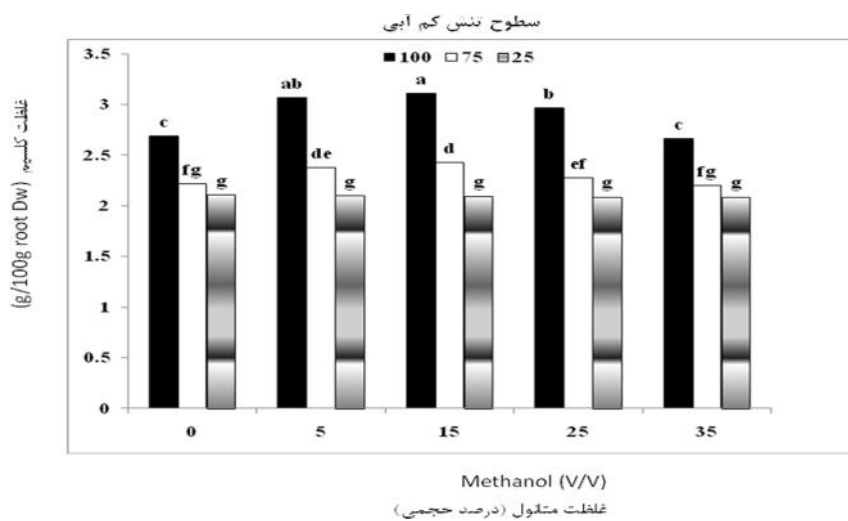
حروف یکسان بیان‌گر عدم وجود اختلاف معنی‌دار در سطح $p \leq 0.05$ است.

The same letters indicate insignificant difference at $p \leq 0.05$ level.



شکل ۲- اثر متقابل متانول و تنش کم‌آبی بر غلظت پتاسیم ریشه

Figure 2- Methanol and drought stress interaction on potassium root density



شکل ۳- اثر متقابل محلول پاشی متانول و تنش کم‌آبی بر کلسیم ریشه.

Figure 3- Methanol and drought stress interaction on calcium root density

حروف یکسان بیان‌گر عدم وجود اختلاف معنی‌دار در سطح $p \leq 0.05$ است.

The same letters indicate insignificant difference at $p \leq 0.05$ level.

جدول ۴- مقایسه میانگین صفات بیوشیمیایی ریشه گیاه عدس تحت تأثیر سطوح محلول پاشی متانول و تنش کمبود آب
Table 4- Comparison of root biochemical characteristics of lentil under different levels of methanol foliar application and water deficit stress

تیماها / متانول /Treatments Methanol	محتوای پرولین ریشه Root proline content ($\mu\text{mol g}^{-1}\text{FW}$)	محتوای پروتئین ریشه Root protein content ($\text{mg g}^{-1}\text{DW}$)	فعالیت آنزیم کاتالاز ریشه CAT enzyme activity (Unit μg^{-1} Protein)	فعالیت آنزیم پراکسیداز ریشه POX enzyme activity (Unit μg^{-1} Protein)	فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز ریشه SOD enzyme activity (Unit μg^{-1} Protein)
Non-stress (100% field of capacity) بدون تنش کم آبی (۱۰۰ درصد ظرفیت زراعی)					
شاهد/control	1.180 ^b	93.15 ^c	0.321 ^c	1.473 ^b	0.459 ^b
5%	1.380 ^a	103.4 ^b	0.314 ^c	1.257 ^c	0.235 ^c
15%	1.393 ^a	108.1 ^a	0.315 ^c	1.247 ^c	0.240 ^c
25%	1.350 ^a	101.4 ^b	0.314 ^c	1.261 ^c	0.239 ^c
35%	1.190 ^b	94.14 ^c	0.320 ^c	1.290 ^{bc}	0.247 ^c
Moderate water stress (75% field of capacity) تنش کم آبی ملایم (۷۵ درصد ظرفیت زراعی)					
شاهد/control	1.143 ^{bc}	85.22 ^d	0.329 ^{abc}	1.977 ^a	0.499 ^b
5%	1.193 ^b	90.83 ^c	0.329 ^{abc}	1.447 ^{bc}	0.484 ^b
15%	1.220 ^b	94.01 ^c	0.328 ^{abc}	1.460 ^{bc}	0.365 ^{bc}
25%	1.190 ^b	89.56 ^c	0.325 ^{abc}	1.460 ^{bc}	0.284 ^c
35%	1.157 ^{bc}	83.81 ^d	0.328 ^{abc}	1.480 ^b	0.494 ^b
Severe water stress (25% field of capacity) تنش کم آبی شدید (۲۵ درصد ظرفیت زراعی)					
شاهد/control	1.050 ^d	81.06 ^d	0.344 ^{ab}	2.040 ^a	0.691 ^a
5%	1.083 ^{cd}	82.28 ^d	0.343 ^{ab}	2.010 ^a	0.678 ^a
15%	1.063 ^d	82.87 ^d	0.342 ^{ab}	2.020 ^a	0.484 ^b
25%	1.047 ^d	82.71 ^d	0.345 ^{ab}	2.020 ^a	0.488 ^b
35%	1.053 ^d	80.90 ^d	0.342 ^{ab}	2.030 ^a	0.693 ^a

* در هر ستون میانگین‌هایی که حداقل دارای یک حرف مشترک می‌باشند مطابق آزمون دانکن $p \leq 0.05$ اختلاف معنی‌داری ندارند.

The means with one same letter in each column are not significantly differences at $p \leq 0.05$ according to duncan's test.

References

منابع مورد استفاده

- Abrishamchi, P., A. Ganjeali, and H. Sakeni. 2012. Evaluation of morphological traits, proline content and antioxidant enzymes activity in chickpea genotypes (*Cicer arietinum* L.) under drought stress. *Iranian Journal of Pulses Research*. 3(2): 17-30 (In Persian).
- Ahmadpour, R., N. Armand, and S.R. Hosseinzadeh. 2016. Effect of vermicompost extract on germination characteristics of chickpea (*Cicer arietinum* L.) under salinity stress. *Journal of Seed Research*. 2(2): 123-135. (In Persian).
- Ahmadpour, R., S.R. Hosseinzadeh, N. Armand, and E. Fani. 2015. Effect of methanol on germination characteristics of lentil (*Lens culinaris* Medik.) under drought stress. *Iranian Journal of Seed Research*. 2: 83-96 (In Persian).
- Armand, N., H. Amiri, and A. Ismaili. 2015. Effects of foliar application of methanol on yield and yield components of bean (*Phaseolus vulgaris* L.) under water deficit stress conditions. *Journal of Crop Ecophysiology*. 9(2): 231-242. (In Persian).
- Armand, N., H. Amiri, and A. Ismaili. 2016. Interaction of methanol spray and water-deficit stress on photosynthesis and biochemical characteristics of *Phaseolus vulgaris* L. cv. Sadry. *Photochemistry and Photobiology*. 92(1):102-110.
- Arndt, S.K.K., S.C. Clifford, W. Wanek, H.G. Jones, and M. Popp. 2001. Physiological and morphological adaptations of the fruit tree *Ziziphus rotundifolia* in response to progressive drought stress. *Tree Physiology*. 21: 705-715.
- Aziz, A., J. Martin-Tanguy, and F. Larher. 1999. Salt stress-induced proline accumulation and changes in tyramine and polyamine levels are linked to ionic adjustment in tomato leaf discs. *Plant Science*. 145: 83-91.
- Bahadoran, M., P. Abrishamchi, H. Ejtehadi, and F. Ghassemzadeh. 2015. Study on some physiological characteristics of *Salsola richteri* in drought condition in the two desert regions of the South Khorasan province. *Iranian Journal of Plant Biology*. 7(24): 1-14.
- Bayoumi, T.Y., M. Eid, and E.M. Metwali. 2008. Application of physiological and biochemical indices as a screening technique for drought tolerance in wheat genotypes. *African Journal of Biotechnology*. 7: 2341-2352.
- Beauchamp, C., and I. Fridovich. 1971. Superoxide dismutase: improved assays and applicable to acryl amide gels. *Annual Reviw Biochemistry*. 44: 276-287.
- Beyk Khurmizi, A., A. Ganjeali, P. Abrishamchi, and M. Parsa. 2013. Interactions of vermicompost and salinity on some morphological, physiological and biochemical traits of bean (*Phaseolus vulgaris* L.) seedlings. *Iranian Journal of Pulses Research*. 4(1): 81-98 (In Persain).
- Cakmak, I. 2005. The role of potassium in alleviating detrimental effects of abiotic stresses in plants. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*. 168: 521-530.
- Chandlee, J.M., and J.G. Scandalios. 1984. Analysis of variants affecting the catalase development program in Maize scutellum. *Journal of Apply Genetic*. 69: 71-77.
- Chapman, H.D., and P.F. Pratt. 1982. Method of analysis for soil, plants and water. Chapman Publisher: Riverside, CA.
- Demirevska, K., L. Simova-Stoilova, V. Vassileva, I. Vaseva, B. Grigorova, and U. Feller. 2008. Drought-induced leaf protein alteration in sensitive and tolerant wheat varieties. *General and Applied Plant Physiology*. 34(1-2): 79-102.

- Fanaei, H.R., M. Galavi, M. Kafi, and A.H. Shirani-rad. 2013. Interaction of water deficit stress and potassium application on potassium, calcium, magnesium concentration and oil of two species of canola (*Brassica napus*) and Mustard (*Brassica juncea*). *Journal of Water and Soil Science*. 23 (3): 261-275.
- Ganjeali, A., and A. Bagheri. 2011. Evaluation of morphological characteristics of root chickpea (*Cicer arietinum* L.) in response to drought stress. *Iranian Journal of Pulses Research*. 1(2): 101-110 (In Persian).
- Helal, R.M., and M. Samir. 2008. Comparative response of drought tolerant and drought sensitive maize genotypes to water stress. *Australian Journal of Crops Science*. 1: 31-36.
- Hosseinzadeh, S.R., A. Salimi, A. Ganjeali, and R. Ahmadpour. 2012. Effects of foliar application of methanol on growth and root characteristics of chickpea (*Cicer arietinum* L.) under drought stress. *European Journal of Experimental Biology*. 2(5):1697-1702.
- Hosseinzadeh, S.R., H. Amiri, and A. Ismaili. 2016. Effect of vermicompost fertilizer on photosynthetic characteristics of chickpea (*Cicer arietinum* L.) under drought stress. *Photosynthetica*. 54(1): 87-92.
- Hu, Y.C., and U. Schmidhalter. 2005. Drought and salinity: a comparison of their effects on mineral nutrition of plants. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*. 168: 541-549.
- Ivanova, E.G., N.V. Dornina, and Y.A. Trotsenko. 2001. Aerobic methylobacteria are capable of synthesizing auxins. *Microbiology*. 70: 392-397.
- Khalilvand Behrouzfar, E., M. Yarnia., E. Farajzadeh, and M. Herischi. 2014. Effects of foliar rates of methanol applications on some of traits yield of sunflower (*helianthus annuus* l.) under related to seed water deficit stress. *Journal of Crop Ecophysiology*. 8(2): 193-202. (In Persian).
- Kirazov, L.P., L.G. Venkov, and E.P. Kirazov 1993. Comparison of the Lowry and the Bradford protein assays as applied for protein stimulation of membrane-containing fractions. *Analytical Biochemistry*. 208: 44-48.
- Liu, Z., D.G. Patterson, and M.L. Lee. 1995. Geometric Approach to factor analysis for the estimation of orthogonality and practical peak capacity in comprehensive two-dimensional separations. *Analytical Chemistry*. 67(21):3840-3845.
- Mirakhori, M., F. Paknejad, F. Moradi, P. Nazeri, and M. Nasri. 2010. Effects of foliar application of methanol on *Glycine max* L. *Journal of Agroecology*. 2: 236-244 (In Persian).
- Nadali, I., M. Yarnia., F. Paknejad, and F. Farahvash. 2016. Study of some qualitative and quantitative traits of sugar beet in response to foliar application of methanol and drought stress. *Environmental Stresses in Crop Science*. 8(2): 169-178.
- Naeimi, N., M. Yarnia, and E. Khalilvand Behrouzfar. 2012. The effects foliar application of methanol at different growth stages on kernel related traits in chickpea var. ILC 482. *Journal of Crop Ecophysiology*. 7(2): 147-158.
- Najafi, A., N. Niari khamssi, A. Mostafaie, and H. Mirzaee. 2010. Effect of progressive water deficit stress on praline accumulation and protein profiles of leaves in chickpea. *African Journal of Biotechnology*. 9: 7033-7036.

- Nudrat Aisha, A., M. Shahbaz, and A.S. Ashraf. 2008. Nutrient acquisition in differentially adapted populations of *Cynodon dactylon* (L.) Pers. and *Cenchrus ciliaris* L. under drought stress. *Pakistan Journal of Botany*. 40(4): 1433-1440.
- Pardo, J.M., M.P. Reddy, S. Yang, A. Maggio, G.H. Huh, T. Mutasumoto, M.A. Coca, H. Koiwa, D.J. Yun, A.A. Watad, R.A. Bressan, and P.M. Hasegawa. 1998. Stress signaling through Ca^{2+} calmodulin-dependent protein phosphatase calcineurin mediates salt adaptation in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 95: 9681-9686.
- Parsa, M., and A. Bagheri. 2008. Legumes. Mashhad University Jahad Press (In Persian).
- Rahbarian, R., R. Khavari-nejad, A. Ganjeali, A.R. Bagheri, and F. Najafi. 2011. Drought stress effects on photosynthesis, chlorophyll fluorescence and water relations in tolerant and susceptible chickpea (*Cicer arietinum* L.) genotypes. *Acta Biologica Cracoviensia*. 53: 47-56.
- Ramirez, I., F. Dorta, V. Espinozo, E. Jimenez, A. Mercad, and H. Pen acortes. 2006. Effects of foliar and root applications of methanol on the growth of arabidopsis, tobacco and tomato plants. *Journal of Plant Growth and Regulation*. 25: 30-44.
- Sadatjamali, S., A. Borzoe, and F. Paknezhad. 2015. Root characteristics, sodium to potassium ratio, and grain yield of seven wheat genotypes under salt stress conditions. *Science and Technology Publications. Greenhouse Cultivation*. 20: 1-11.
- Tester, M., and R. Davenport. 2003. Na^+ tolerance and Na^+ transport in higher plants. *Annals of Botany*. 91: 503-527.
- Tewfik, K.M. 2008. Effect of water stress in addition to potassium application on mungbean. *Australian Journal Basic Apply Science*. 2: 42-52.
- Wei, P., D. Chen, and R. Jing. 2015. Ameliorative effects of foliar methanol spraying on salt injury to soybean seedlings differing in salt tolerance. *Plant Growth Regulation*. 75: 133-141.
- Yordanov, I., V. Velikova, and T. Tsonev. 2003. Plant responses to drought and stress tolerance. *Bulgharic Journal of Plant Physiology*. 2: 187-206.

Responses of Lentil (*Lens culinaris* Medikus.) Root to Foliar Application of Methanol under Water Deficit Stress

Saeed Reza Hosseinzadeh¹, Farzad Paknejad^{2*}, Mohammad Nabi-Ielkaei³, and Raheleh Ahmadpour⁴

Received: June 2017, Revised: 6 February 2018, Accepted: 8 February 2018

Abstract

Water shortage in root environment is the main factor limiting crop growth and productivity in dry regions. There are many reports on the role of methanol spraying for increasing drought tolerance in C₃ plants. For this reason, a factorial experiment was conducted using completely randomized block design with 3 replications at Khatam Alanbia University of Behbahan. Methanol applied with five levels; (control, 5, 15, 25 and 35% v/v) and water deficit stress with three levels: irrigation at 100% of field capacity, moderate water stress, irrigation at 75% of field capacity and severe water stress, irrigation at 25% of field capacity. Foliar application of methanol was applied 3 times during the growing season (at seedling, flowering and podding stages) with 10-days intervals. Results showed that the interactions of methanol × drought on the root dry weight, root diameter, root length ($p < 0.05$) and root area ($p < 0.01$) were significant. In normal irrigation conditions, methanol spraying 5, 15 and 25% increased significantly root dry weight as compared to control. Also, the interactions of methanol × drought on protein and proline were significant ($p < 0.01$). Methanol spraying increased significantly root proline and protein contents. Interactions of methanol and drought on sodium and potassium concentration, ($p < 0.05$) and calcium ($p < 0.01$) was significant. Interactions of methanol × drought on root activities of superoxide dismutase and peroxidase were significant ($p < 0.05$). Also, the effect of drought stress on catalase enzyme activity was significant ($p < 0.01$). Methanol spraying decreased root activities of superoxide dismutase and peroxidase, significantly.

Key words: Antioxidant activity, Drought stress, Lentil, Morphological, Root.

1- Department of Biology, Faculty of Sciences, Lorestan University, Khoramabad, Iran.

2- Associate Prof., Karaj Branch, Islamic Azad University, Karaj, Iran.

3- Assistant Prof., Karaj Branch, Islamic Azad University, Karaj, Iran.

4- Department of Biology, Faculty of Sciences, Behbahan Khatam Alanbia University of Technology, Behbahan, Iran.

* Corresponding Author: Farzadpaknejad@yahoo.com

