



## اثر سالیسیلیک اسید بر برخی واکنش‌های فیزیولوژیک گیاه شنبليله (*Trigonella foenum-graecum*) تحت تنش شوری

امین پسندی پور<sup>۱</sup>، حسن فرح‌بخش<sup>۲\*</sup>، مه‌ری صفاری<sup>۲</sup> و بتول کرامت<sup>۳</sup>

### چکیده

این تحقیق به منظور بررسی اثرات غلظت‌های سالیسیلیک اسید (۰، ۵، ۱۰، ۱۵ و ۲۰ میکرومولار) بر برخی واکنش‌های فیزیولوژیکی گیاه شنبليله تحت تنش‌های متفاوت شوری (۰، ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ میلی‌مولار نمک NaCl) در شرایط کشت هیدروپونیک انجام گرفت. آزمایش به صورت فاکتوریل و در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار در آزمایشگاه دانشکده کشاورزی دانشگاه باهنر کرمان اجرا گردید. نتایج نشان داد که در گیاهان تیمار شده با شوری، محتوای کلروفیل a، b و کارتنوئید در مقایسه با گیاهان شاهد کاهش یافت. این در حالی بود که شوری منجر به افزایش میزان مالون دآلدید، سایر آلدیدها، فعالیت کاتالاز و پراکسیداز گردید. بر طبق نتایج به‌دست آمده، کاربرد سالیسیلیک اسید به‌ویژه با غلظت‌های ۱۰ و ۱۵ میکرومولار در شرایط تنش شوری، توانست با افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدان‌های کاتالاز و پراکسیداز در گیاه شنبليله؛ منجر به کاهش پراکسیداسیون لیپیدهای غشاء و افزایش مقدار رنگیزه‌های فتوسنتزی نسبت به گیاهان شاهد (غلظت صفر سالیسیلیک اسید) شود. همچنین، کاربرد غلظت ۵ میکرومولار سالیسیلیک اسید تاثیر معنی‌داری در بهبود شرایط تنش ناشی از شوری در مقایسه با گیاهان شاهد نداشت و غلظت ۲۰ میکرومولار این ماده با تشدید شرایط تنش، خود منجر به کاهش پارامترهای ذکر شده گردید.

**واژگان کلیدی:** آنتی‌اکسیدان، پراکسیداسیون لیپیدها، تنش شوری، سالیسیلیک اسید، شنبليله.

۱- دانشجوی دکتری زراعت و عضو انجمن پژوهشگران جوان دانشگاه شهید باهنر کرمان

۲- دانشیار گروه زراعت و اصلاح نباتات دانشگاه شهید باهنر کرمان

۳- استادیار گروه زیست‌شناسی دانشگاه شهید باهنر کرمان

\* (نگارنده‌ی مسئول)

تاریخ دریافت: ۹۲/۴/۸

تاریخ پذیرش: ۹۲/۸/۸

hfarahbakhsh@yahoo.com

## مقدمه

شنبليله با نام علمی *Trigonella foenum-graecum* متعلق به تیره نخود (Fabaceae) می‌باشد. تجمع بیش از حد کاتیون‌ها و آنیون‌ها در محلول خاک موجب بروز تنش شوری می‌شود. غشای سلولی یکی از هدف‌های اولیه بسیاری از تنش‌های محیطی محسوب می‌شود و حفظ یکپارچگی و ثبات غشا تحت تنش‌های نظیر شوری و خشکی یکی از نشانه‌های تحمل به خشکی یا شوری می‌باشد (Bajji *et al.*, 2001). تنش شوری موجب افزایش نشت پذیری غشا می‌گردد. علاوه بر آسیب اکسیداتیو وارد شده توسط گونه‌های فعال اکسیژن، یکی از دلایل افزایش نشت پذیری غشا، جایگزینی  $Na^+$  به جای  $Ca^{2+}$  در غشا می‌باشد که با این جایگزینی نفوذپذیری غشا نیز تحت تاثیر قرار می‌گیرد (Gupta, 2005).

لیپیدها موثرترین منابع ذخیره انرژی هستند و به عنوان یک عایق و ضربه‌گیر اندام‌های داخلی و پیش‌ساز برخی از هورمون‌ها می‌باشند. نقش ساختمانی آنها بیشتر در غشاهای سلولی می‌باشد. لیپیدها برای مقاومت در برابر تنش‌ها نیز دارای نقش اساسی می‌باشند (Parida and Das, 2005). اندازه‌گیری محصولات نهایی پراکسیداسیون لیپیدها یکی از راه‌های تشخیص تنش اکسیداتیو می‌باشد. در نتیجه پراکسیداسیون اسیدهای چرب غیراشباع، مالون دآلدید (MDA) و سایر آلدیدهای غیراشباع تولید می‌گردند که این ترکیبات ثانویه آلدیدی، حاصل از پراکسیداسیون لیپیدها، به‌طور معمول شاخص تنش اکسیداتیو محسوب می‌شوند. گزارش‌های متعدد نشان می‌دهد که با افزایش سطح تنش، میزان پراکسیداسیون لیپیدها در گیاهان حساس بیشتر از گیاهان مقاوم می‌باشد (Demiral

and Turkan, 2005). بررسی‌های انجام شده در گیاه عدس (Bandeoglu *et al.*, 2004)، اسفناج (Eraslan *et al.*, 2008) و برنج (Demiral and Turkan, 2005) همگی حاکی از این مطلب است که تنش شوری موجب افزایش پراکسیداسیون لیپید و افزایش تولید مالون دآلدید و نشت یونی می‌گردد.

در شرایط طبیعی بین میزان تولید گونه‌های فعال اکسیژن و فعالیت ساز و کارهای از بین برنده آن تعادل وجود دارد. اما در تنش‌های محیطی این تعادل به هم می‌خورد و موجب تنش اکسیداتیو در گیاهان می‌گردد (Abdul Jaleel *et al.*, 2009). گیاهان برای مقاومت در برابر تنش اکسیداتیو ایجاد شده توسط تنش‌های محیطی نظیر خشکی یا شوری باید از سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی آنزیمی یا غیرآنزیمی استفاده نمایند. گزارش‌های بسیاری وجود دارد که بیان‌کننده افزایش تنش اکسیداتیو در هنگام تنش شوری و به تبع آن افزایش سیستم دفاع آنتی‌اکسیدان می‌باشد (Ben Hamed *et al.*, 2007; Masood *et al.*, 2005; Parida and Das, 2006).

مطالعات روی گیاه اسفناج (Eraslan *et al.*, 2008) و گیاه *Cassia angustifolia* (Agarwal and Pandey, 2004) نیز نشان داد شوری موجب افزایش تنش اکسیداتیو و مقدار  $H_2O_2$  و افزایش فعالیت آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز، آسکوربات پراکسیداز و کاتالاز گردید.

سالیسیلیک اسید تاثیر خود را بر فتوسنتز از طریق تاثیر بر فاکتورهای روزنه‌ای، رنگیزه‌ها و ساختار کلروپلاست و آنزیم‌های دخیل در مراحل فتوسنتز اعمال می‌کند. کاربرد سالیسیلیک اسید روی برگ‌های گیاه کلزا، محتوای کلروفیل آن را افزایش داد (Ghai *et al.*, 2002). در گندم نیز سالیسیلیک اسید در غلظت  $10^{-5}$  مولار مقدار رنگیزه‌های فتوسنتزی را افزایش داد، اما غلظت‌های بالاتر

سپس به محیط هیدروپونیک محتوی محلول غذایی هوگلند انتقال داده شدند. این گیاهان مجدداً (با بستر کشت جدید) به داخل اتاقک رشد انتقال و به منظور اطمینان از انتقال سالم تمام گیاهان، قبل از اعمال تیمار به مدت ۵ روز در این موقعیت نگهداری شدند. بعد از حصول اطمینان از سالم بودن تمام گیاهان، اولین تیمار آزمایش یعنی سالیسیلیک اسید در پنج غلظت (۰، ۵، ۱۰، ۱۵ و ۲۰ میکرومولار) تهیه و هر غلظت به هر کدام از محیط‌های کشت هیدروپونیک تزریق گردید. به گیاهان فرصت داده شد تا به مدت ۴۸ ساعت در محلول غذایی حاوی سالیسیلیک اسید قرار گیرند، بعد از این مدت گیاهان به محلول غذایی تازه ساخته شده عاری از سالیسیلیک اسید انتقال داده شدند. بعد از گذشت ۲۴ ساعت، تیمار شوری در پنج غلظت (۰، ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ میلی‌مولار) به مدت ۴۸ ساعت اعمال و در پایان به منظور تثبیت فعالیت آنزیمی گیاهان تیمار شده، اندام‌هوایی و ریشه تمام گیاهان که از لحاظ فنولوژیکی در مرحله قبل از گلدهی قرار داشتند به صورت جداگانه برداشت، در فویل آلومینیوم پیچیده و توسط نیتروژن مایع منجمد گردیدند.

برای سنجش مقدار کلروفیل از روش لیچنتالر (Lichtenthaler, 1987) استفاده شد. به این صورت که ۰/۱ گرم از برگ‌های تازه گیاه در هاون چینی حاوی ۱۵ میلی‌لیتر استون ۸۰ درصد ساییده شد و پس از صاف کردن، جذب آن با دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج‌های ۶۴۶/۸ و ۶۶۳/۲ نانومتر خوانده شد.

اندازه‌گیری غلظت مالون‌دآلدید، به روش هیت و پاکر (Heath and Packer, 1969) انجام شد. طبق این روش ۰/۲ گرم از بافت تازه اندام‌هوایی در هاون

سالیسیلیک اسید میزان رنگیزه‌ها را کاهش داد (Hayat and Ahmad, 2007).

در مورد تنش شوری و اسمزی اثر سالیسیلیک اسید ناشناخته است. در گیاه آرابیدوپسیس (*Arabidopsis thaliana*)، در اثر تنش شوری و اسمزی، سالیسیلیک اسید منجر به افزایش گونه‌های فعال اکسیژن در بافت‌های فتوسنتزی شده و علائم تنش (نظیر سوختگی برگ‌ها) را توسعه بخشید (Borsani et al., 2001). اما هنگامی که سالیسیلیک اسید به صورت برون‌زا روی گیاهان جو استفاده گردید موجب افزایش مقاومت به تنش شوری در این گیاهان گردید (El-Tayeb, 2005).

بررسی اثرات سالیسیلیک اسید بر فعالیت آن‌تی‌اکسیدان‌های کاتالاز و پراکسیداز در شرایط تنش شوری هدف اصلی این تحقیق بود. میزان کلروفیل به عنوان رنگیزه موثر در سنتز مواد قندی و شاخص پراکسیداسیون لیپیدهای غشاء در شرایط مذکور نیز مورد بررسی قرار گرفت.

### مواد و روش‌ها

این آزمایش به صورت فاکتوریل و در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار در محل آزمایشگاه دانشکده کشاورزی دانشگاه شهید باهنر کرمان انجام شد. بذره‌های ضد عفونی شده‌ی شنبلیله در گلدان‌های کاغذی محتوی شن شسته شده کشت و در داخل اتاقک رشد قرار داده شدند. مشخصات شرایط مصنوعی ایجاد شده توسط دستگاه برای یک ۲۴ ساعت مطابق با فصل رشد طبیعی گیاه (دمای ۲۵ و ۲۲ درجه سلسیوس به ترتیب برای روز و شب، رطوبت نسبی ۶۰ درصد، طول دوره روشنایی ۱۴ ساعت) بود. رطوبت خاک گلدان‌ها با استفاده از روش وزنی به صورت یک روز در میان کنترل و به حد ظرفیت مزرعه رسانده شد. گلدان‌ها تا مرحله تولید پنجمین برگ سه برگچه‌ای در این وضعیت نگهداری شدند و

واکنش خوانده شد. جهت تنظیم دستگاه از مخلوط بافر Tris-HCl، پیرو گالل و آب اکسیژنه به عنوان شاهد استفاده گردید (Kar and Mishra, 1976). تجزیه و تحلیل آماری داده با استفاده از نرم افزار SAS انجام شد، همچنین مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون LSD و در سطح احتمال ۵ درصد صورت گرفت.

### نتایج و بحث

نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که تمامی صفات مورد بررسی در سطح احتمال یک درصد تحت تاثیر تیمارهای سالیسیلیک اسید و شوری قرار گرفتند (جدول ۱). بر طبق این نتایج، اثر متقابل شوری و سالیسیلیک اسید برای تمام صفات به جز محتوای کلروفیل a و b از لحاظ آماری معنی‌دار گردید (جدول ۱). نتایج حاصل از تأثیر سالیسیلیک اسید بر مقدار کلروفیل a در شکل ۱ آورده شده است. داده‌ها نشان می‌دهد، تأثیر غلظت ۵ میکرو مولار این ماده بر محتوای کلروفیل a، مشابه سطح صفر (شاهد) بوده است. تیمار گیاهان با سطح ۱۰ و ۱۵ میکرومولار سالیسیلیک اسید موجب افزایش معنی‌دار کلروفیل a (به ترتیب ۱۰/۹۲ و ۸/۷۸ درصد) نسبت به تیمار شاهد گردید. افزایش غلظت سالیسیلیک اسید به ۲۰ میکرومولار، موجب کاهش (۱۰/۳ درصد) محتوای کلروفیل a نسبت به شاهد شد.

مقایسه میانگین سطوح شوری نشان داد (شکل ۲) که بین غلظت‌های مختلف شوری اختلاف معنی‌داری از لحاظ آماری وجود دارد به گونه‌ای که با افزایش میزان شوری، از محتوای کلروفیل a به شدت کاسته شد. کمترین میزان کلروفیل a مربوط به سطح شوری ۲۰۰ میلی‌مولار با ۶۲/۷۳ درصد کاهش نسبت به تیمار شاهد بود.

مقایسه میانگین کلروفیل b در سطوح مختلف سالیسیلیک اسید (شکل ۳) نشان داد که بالاترین

چینی حاوی ۵ میلی لیتر TCA (تری کلرواستیک اسید) ۰/۲ درصد ساییده شد. عصاره حاصل به مدت ۵ دقیقه در ۱۰۰۰۰ دور سانتریفیوژ شد. به یک میلی‌لیتر از محلول رویی حاصل از سانتریفیوژ، ۵ میلی‌لیتر محلول TCA ۲۰ درصد که حاوی ۰/۵ درصد TBA (تیو باری توریک اسید) بود، اضافه شد. مخلوط حاصل به مدت ۲۵ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سلسیوس گراد حمام آب گرم حرارت داده شد. سپس به مدت ۱ دقیقه سانتریفیوژ گردید. شدت جذب این محلول در طول موج ۵۳۲ نانومتر خوانده شد. برای سنجش سایر آلدییدها از طول موج ۴۵۵ نانومتر و ضریب خاموشی  $0.457 \times 10^5 \text{ mM}^{-1} \text{ Cm}^{-1}$  استفاده شد (Meir *et al.*, 1992)، در نهایت نتایج بر حسب میکرومول بر گرم وزن تر گیاه محاسبه و گزارش گردید.

سنجش فعالیت آنزیم کاتالاز؛ براساس کاهش جذب آب اکسیژنه (کاهش مقدار  $\text{H}_2\text{O}_2$ ) در طول موج ۲۴۰ نانومتر و با روش دهیندسا و همکاران (Dhindsa *et al.*, 1981) صورت گرفت. مخلوط واکنش شامل بافر Tris-HCl ۵۰ میلی مولار با pH=7 و آب اکسیژنه ۱۵ میلی مولار می‌باشد. با اضافه کردن ۱۰۰ میکرولیتر از عصاره آنزیمی به مخلوط ذکر شده، واکنش شروع و تغییرات جذب در طول موج ۲۴۰ نانومتر به مدت ۱ دقیقه و هر ۲۰ ثانیه یک‌بار از زمان شروع واکنش محاسبه شد.

جهت سنجش فعالیت آنزیم پراکسیداز، مخلوطی از بافر Tris-HCl ۱۰۰ میلی مولار با pH=7 را با آب اکسیژنه ۵ میلی‌مولار و پیروگالل ۱۰ میلی‌مولار که همگی آنها در حمام آب یخ نگهداری می‌شدند، تهیه گردید. واکنش با اضافه کردن ۷۵ میکرولیتر از عصاره آنزیمی به مخلوط ذکر شده آغاز گردید. تغییرات جذب در طول موج ۴۲۵ نانومتر به مدت ۳ دقیقه و هر ۳۰ ثانیه یک‌بار از لحظه شروع

بودند، محتوای مالون دآلدیید در اندام هوایی آنها نسبت به گیاهان تیمار شده با غلظت صفر به ترتیب ۱۰/۸ و ۲۵/۴ کاهش یافته است. در سطح شوری ۱۵۰ میلی مولار نیز این دو غلظت سالیسیلیک اسید با کاهش معنی دار محتوای مالون دآلدیید در کاهش اثرات تنش مفید واقع شدند. این در حالی بود که این غلظت‌ها در شرایط بدون تنش (شوری صفر میلی مولار) تاثیر معنی داری بر محتوای مالون دآلدیید اندام هوایی گیاهان نداشتند.

بررسی اثر متقابل نشان می‌دهد که در شرایط بدون تنش اختلاف آماری معنی داری بین غلظت‌های مختلف سالیسیلیک اسید از نظر محتوای سایر آلدییدها نمی‌باشد (شکل ۷). در سطح شوری ۵۰ و ۱۰۰ میلی مولار، غلظت ۱۵ میکرومولار سالیسیلیک اسید منجر به کاهش معنی دار تولید این شاخص در گیاهان شد و در سطح ۱۵۰ و ۲۰۰ میلی مولار علاوه بر غلظت ۱۵ میکرومولار، غلظت ۱۰ میکرومولار نیز در مقایسه با سایر غلظت‌های سالیسیلیک اسید تولید این ماده را در گیاه کاهش داد ولی بیشترین کاهش مربوط به غلظت ۱۵ میکرومولار بود. در سطوح شوری ۱۵۰ و ۲۰۰ میلی مولار بیشترین مقدار تولید این ماده از گیاهانی به دست آمده که با غلظت ۲۰ میکرومولار سالیسیلیک اسید تیمار شده بودند که حتی از گیاهانی که با سالیسیلیک اسید تیمار نشده بودند بیشتر بود که نشان از تنش‌زا بودن این سطح از سالیسیلیک اسید برای این گیاه دارد.

در غلظت شوری برابر صفر (بدون تنش) میزان آنزیم کاتالاز تحت تاثیر تغییر غلظت سالیسیلیک اسید قرار نگرفت (شکل ۸). در اولین سطح شوری (۵۰ میلی مولار) ملاحظه می‌شود که غلظت‌های ۱۰، ۱۵ و ۲۰ میکرومولار سالیسیلیک اسید باعث افزایش معنی دار فعالیت این آنزیم در مقایسه با غلظت‌های ۵ میکرومولار شدند. در سطح شوری ۱۰۰ و ۱۵۰

میزان محتوای کلروفیل b مربوط به غلظت‌های ۵ و ۱۰ میکرومولار سالیسیلیک اسید می‌باشد و این در حالی است که غلظت‌های صفر (شاهد) و ۱۵ میکرومولار با اندکی کاهش در جایگاه دوم قرار گرفتند ولی این اختلاف از لحاظ آماری معنی دار نبود. غلظت ۲۰ میکرومولار با میانگین محتوای کلروفیل b، ۰/۵۷ میلی گرم بر گرم وزن تر، کمترین مقدار این شاخص را داشت.

افزایش غلظت نمک از صفر به ۵۰ میلی مولار نتوانست کاهش معنی داری بر میزان محتوای کلروفیل b گیاهان شنبلیله داشته باشد ولی افزایش غلظت نمک از ۵۰ به ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ میلی مولار به ترتیب منجر به کاهش ۳۱/۱، ۶۶/۲ و ۷۶/۵ درصدی این شاخص شد (شکل ۴).

بررسی نتایج حاصل از مقایسه میانگین اثر متقابل شوری و سالیسیلیک اسید بر محتوای کارتنوئید (شکل ۵) نشان می‌دهد که در سطح شوری ۱۰۰ میلی مولار، گیاهانی که با غلظت ۱۰ میکرومولار سالیسیلیک اسید تیمار شده بودند، بیشترین محتوای کارتنوئید را داشتند. ولی در سطح شوری ۱۵۰ میلی مولار، گیاهان تیمار شده با غلظت ۱۵ میکرومولار سالیسیلیک اسید توانستند اثرات تنش شوری را به نحو بهتری در مقایسه با سایر سطوح سالیسیلیک اسید بهبود بخشند. در شرایط بدون تنش نیز افزایش غلظت سالیسیلیک اسید منجر به افزایش محتوای کارتنوئید گردید که این افزایش در سطوح ۵ و ۱۰ میکرو مولار نسبت به سطح صفر (شاهد) از لحاظ آماری معنی دار بود.

بررسی اثر متقابل تنش شوری  $\times$  سالیسیلیک اسید در مورد محتوای مالون دآلدیید (شکل ۶) نشان می‌دهد که در بالاترین سطح تنش اعمال شده (شوری ۲۰۰ میلی مولار)، گیاهانی که با غلظت‌های ۱۰ و ۱۵ میکرومولار سالیسیلیک اسید تیمار شده

اختلال ایجاد می‌کند که در سنتز کلروفیل ضروری می‌باشند.

در این مطالعه، پیش تیمار سالیسیلیک اسید موجب افزایش مقدار کلروفیل (به عنوان یکی از اجزای اصلی فتوسنتزی و تأثیرگذار بر وزن خشک) و محتوای کاروتنوئیدها در گیاهان تحت تنش گردید (شکل ۱، ۲ و ۵) که نشان‌دهنده توانایی این ماده در تخفیف اثرات تنش می‌باشد.

گزارش‌های متناقضی در مورد تأثیر سالیسیلیک اسید بر مقدار رنگیزه‌های فتوسنتزی وجود دارد. استفاده از اسید استیل سالیسیلیک در گیاهان ذرت و سویا هیچ تغییری در مقدار کلروفیل آن‌ها ایجاد نکرد (Khan *et al.*, 2003).

پانچوا و همکاران (Pancheva *et al.*, 1996) گزارش کردند استفاده از سالیسیلیک اسید در گیاه جو موجب کاهش مقدار کلروفیل شد. کاربرد سالیسیلیک اسید در گیاهان ذرت (Khodary, 2004)، جو (El-Tayeb, 2005) و گندم (Agarawal *et al.*, 2004) موجب افزایش مقدار کلروفیل گردید.

در این تحقیق به نظر می‌رسد که پیش تیمار سالیسیلیک اسید به عنوان یک پروسه مقاوم‌سازی عمل نموده است و با افزایش توان آنتی‌اکسیدانی سلول موجب کاهش مقدار پراکسیداسیون لیپیدها شده و موجب حفاظت بیشتر از غشاهای سلولی و فتوسنتزی و رنگیزه‌های فتوسنتزی و مانع از کاتابولیسم کلروفیل شده است.

یکی از اثرات تنش‌های محیطی نظیر شوری و خشکی افزایش تولید گونه‌های فعال اکسیژن و القای تنش اکسیداتیو می‌باشد (Sudhakar *et al.*, 2001). گونه‌های فعال اکسیژن منجر به پراکسیداسیون لیپیدهای غشا و تغییر در نفوذپذیری غشا و خسارت به سلول می‌گردند. بنابراین، اندازه‌گیری آلدیدهای تولید شده در طی پراکسیداسیون لیپیدها و

میلی‌مولار نیز این روند ادامه داشت. در بالاترین سطح شوری (۲۰۰ میلی‌مولار) غلظت‌های ۱۰ و ۱۵ میکرومولار سالیسیلیک اسید در مقایسه با سایر غلظت‌ها منجر به افزایش فعالیت بیشتر این آنزیم شدند.

بررسی اثر متقابل سالیسیلیک اسید × شوری برای فعالیت آنزیم پراکسیداز (شکل ۹) نشان داد که در شرایط نرمال (بدون تنش شوری) هیچ کدام از غلظت‌های سالیسیلیک اسید نتوانستند تأثیر معنی‌داری بر فعالیت پراکسیداز در مقایسه با شاهد (غلظت صفر سالیسیلیک اسید) داشته باشند. به گونه‌ای که شکل ۹ نشان می‌دهد در شرایط تنش نتایج متفاوتی حاصل شد، در مقایسه گیاهان تحت تنش ۵۰ میلی‌مولار شوری، گیاهانی که با سالیسیلیک اسید تیمار شده بودند فعالیت آنزیم پراکسیداز در آنها به‌طور معنی‌داری نسبت به گیاهان تیمار نشده افزایش یافت، در این بین بیشترین فعالیت مربوط به گیاهان تیمار شده با غلظت ۱۵ میکرومولار بود و بعد از آن بیشترین فعالیت به ترتیب متعلق به غلظت‌های ۲۰، ۱۰ و ۵ میکرومولار بود. این روند تغییرات بین سطوح مختلف سالیسیلیک اسید برای سایر سطوح تنش شوری نیز ادامه داشت.

کاهش مقدار رنگیزه‌های فتوسنتزی در شرایط تنش شوری و خشکی می‌تواند عمدتاً به دلیل تخریب ساختمان کلروپلاست و دستگاہ فتوسنتزی، فتواکسیداسیون کلروفیل‌ها، واکنش آنها با اکسیژن یکتایی، تخریب پیش ماده‌های سنتز کلروفیل و ممانعت از بیوسنتز کلروفیل‌های جدید و فعال شدن آنزیم‌های تجزیه کننده کلروفیل، از جمله کلروفیلاز باشد (El-Tayeb, 2005; Neocleous and Nasilakakis, 2007). علاوه بر این، تنش شوری بر جذب برخی عناصر ضروری نظیر آهن و منیزیم

در این مطالعه تنش شوری موجب افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در گیاه مورد مطالعه گردید (شکل ۸ و ۹). مشابه نتایج این بررسی، افزایش آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در گیاهان ذرت (Azevedo Neto et al., 2006)، جو (Xu et al., 2008)، کنجد (Koca et al., 2007) و برنج (Fadzilla et al., 1997) در شرایط تنش شوری افزایش یافت.

در این مطالعه پیش تیمار سالیسیلیک اسید، موجب افزایش فعالیت آنزیم‌های کاتالاز و پراکسیداز گردید (شکل ۸ و ۹). افزایش فعالیت این آنزیم‌ها، همراه با کاهش مقدار پراکسیداسیون لیپید،  $H_2O_2$  و نشأت یونی می‌باشد. بنابراین کاربرد سالیسیلیک اسید با فعال کردن سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی آنزیمی موجب افزایش مقاومت گیاهان به تنش اکسیداتیو ناشی از تنش‌های شوری و اسمزی شده است.

افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان تحت تاثیر تیمار سالیسیلیک اسید در گیاهان گندم (Multu et al., 2009) جو (Xu et al., 2008) و گوجه‌فرنگی (He and Zhu, 2008) در تنش‌های مختلف محیطی گزارش شده است.

گزارش‌هایی نیز مبنی بر عدم تاثیر سالیسیلیک اسید بر آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان یا کاهش فعالیت این آنزیم‌ها وجود دارد (Palma et al., 2009; Eraslan et al., 2008).

### نتیجه‌گیری کلی

بررسی نتایج حاصل از آزمایش نشان می‌دهد که شنبليله گیاهی نسبتاً حساس به شوری بوده؛ به گونه‌ای که کلیه صفات مورد بررسی در آزمایش تحت تاثیر اولین سطح شوری اعمال شده قرار گرفتند. کاربرد سالیسیلیک اسید منجر به بهبود پارامترهای بیوشیمیایی و افزایش مقاومت گیاهان در برابر تنش شوری گردید اما در شرایط بدون تنش، تاثیری بر پارامترهای ذکر شده نداشت. سالیسیلیک اسید با

اندازه‌گیری میزان نشأت یونی شاخص‌های خوبی برای اندازه‌گیری میزان آسیب اکسیداتیو وارد شده به غشا می‌باشند (Bandeoglu et al., 2004).

در این تحقیق در اثر تنش شوری مقدار مالون دآلدید و سایر آلدیدها، افزایش یافت (شکل ۶ و ۷). در شرایط تنش شوری مقدار پراکسیداسیون لیپیدها در گیاهان حساس به تنش بیشتر از گیاهان مقاوم گزارش شده است (Demiral and Turkan, 2005).

نتایج این تحقیق نشان داد که در گیاهان تیمار شده با سالیسیلیک اسید، مقدار پراکسیداسیون لیپیدهای غشا کاهش یافت. حفظ یکپارچگی غشاهای سلولی در شرایط تنش یکی از اجزای مقاومت در برابر تنش‌هایی نظیر شوری و خشکی است (Masood et al., 2006). تیمار سالیسیلیک اسید موجب کاهش پراکسیداسیون لیپید در جو (El-Tayeb, 2005) و گندم (Afzali et al., 2006) در تنش شوری شده است که با نتایج این تحقیق مطابقت دارد.

در شرایط غیرتنش، بین میزان تولید گونه‌های فعال اکسیژن و ظرفیت جاروب کردن این ترکیبات توسط سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی (آنزیمی و غیرآنزیمی) تعادل وجود دارد. اما در شرایط تنش، میزان تولید گونه‌های فعال اکسیژن از ظرفیت جاروب کردن آنها، توسط سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی بیشتر شده و در نتیجه تنش اکسیداتیو رخ می‌دهد. بنابراین، برای مقابله با تنش اکسیداتیو، تغییر ظرفیت سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی ضروری می‌باشد.

آنزیم‌هایی مانند کاتالاز و پراکسیداز از آنزیم‌های مهم سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی در گیاهان می‌باشند. اگرچه سوپراکسیددیسموتاز در خط مقدم دفاع علیه گونه‌های فعال اکسیژن عمل می‌نماید، اما برخی آنزیم‌ها نظیر کاتالاز و پراکسیداز در حذف محصول آن یعنی  $H_2O_2$  که همچنان برای سلول سمی است، نقش مهمی دارند.

۱۰ و ۱۵ میکرومولار بیشترین تاثیر مثبت را در کاهش اثرات ناشی از تنش شوری بر گیاهان داشتند اما غلظت ۲۰ میکرومولار؛ اکثراً منجر به تشدید اثرات تنش شد.

افزایش ظرفیت دفاع آنتی‌اکسیدانی گیاه موجب افزایش رنگیزه‌های فتوسنتزی و کاهش پراکسیداسیون لیپیدهای غشا شد. از بررسی کلیه صفات چنین می‌توان نتیجه‌گیری کرد که در بین غلظت‌های سالیسیلیک اسید به کار رفته؛ غلظت‌های

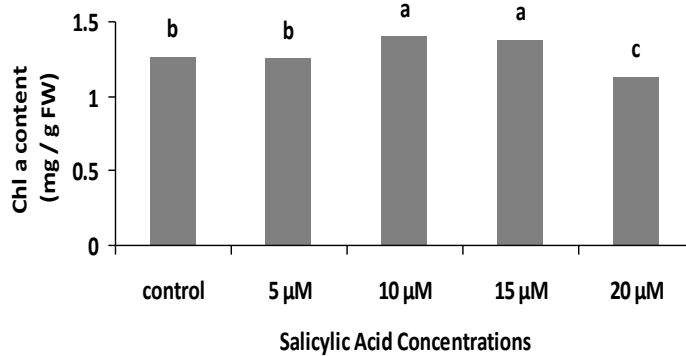
جدول ۱- تجزیه واریانس صفات مورد بررسی  
Table 1- Variance analysis of measured traits

منابع تغییرات S.O.V	درجه آزادی df	کلروفیل a Chl a	کلروفیل b Chl b	کاروتنوئید Carotenoid	مالون دآلدید اندام هوایی Shoot MDA	سایر آلدیدها در اندام هوایی shoot other aldehyde	فعالیت کاتالاز CAT activity	فعالیت پراکسیداز PO activity
تکرار Replication	2	0.148	1.096	0.119	0.000028	0.0809	2.167	0.000056
سالیسیلیک اسید Salicylic acid	4	17.33**	1.76**	1.885**	0.01142**	0.1735**	0.628**	0.01451**
شوری Salinity	4	293.37**	181.5**	29.8**	0.2818**	4.54**	2.978**	0.00493**
اثر متقابل Interaction	16	0.813 <sup>ns</sup>	0.74 <sup>ns</sup>	0.409**	0.00121**	0.0159**	0.0704**	0.00126**
خطا Error	48	0.591	0.9348	0.179	0.00033	0.0065	0.01006	0.0000195
ضریب تغییرات CV %		1.98	2.28	1.3	1.86	1.95	2.32	2.57

ns و \*\* به ترتیب غیرمعنی‌دار و معنی‌دار در سطح احتمال ۱٪.

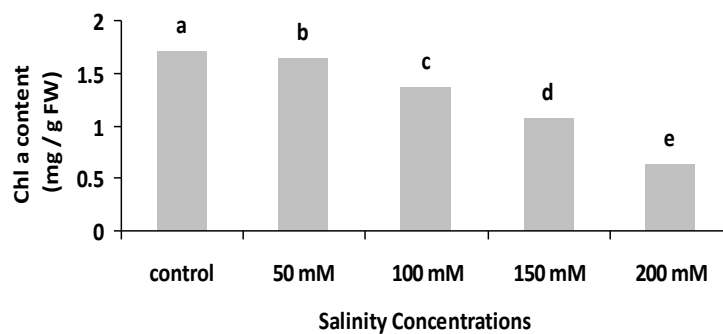
ns and \*\*: non significant and significant at the 1% probability levels, respectively.





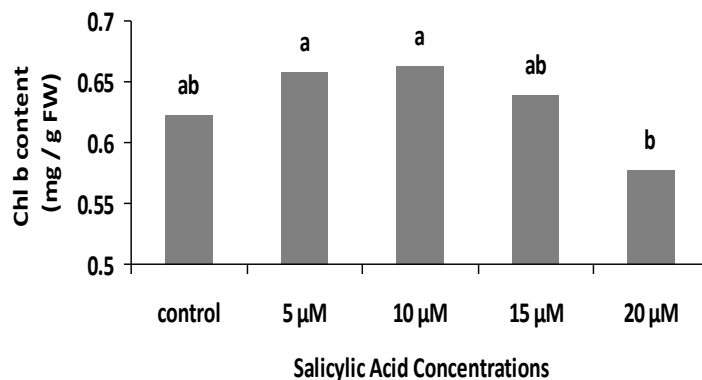
شکل ۱- اثر غلظت‌های مختلف سالیسیلیک اسید بر محتوای کلروفیل a

**Figure 1-** Effect of different concentration of salicylic acid on chlorophyll a content



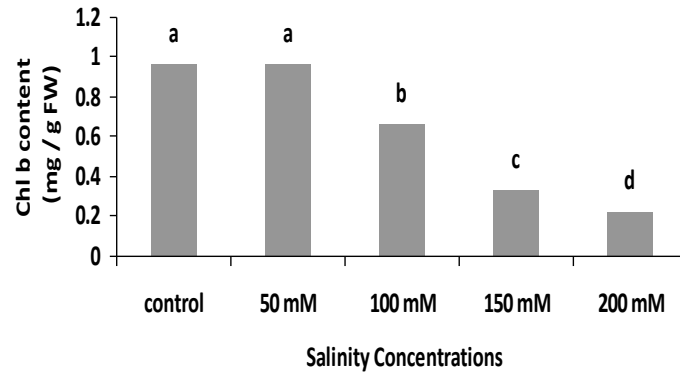
شکل ۲- اثر غلظت‌های مختلف شوری بر محتوای کلروفیل

**Figure 2-** Effect of different concentration of salinity on chlorophyll a content



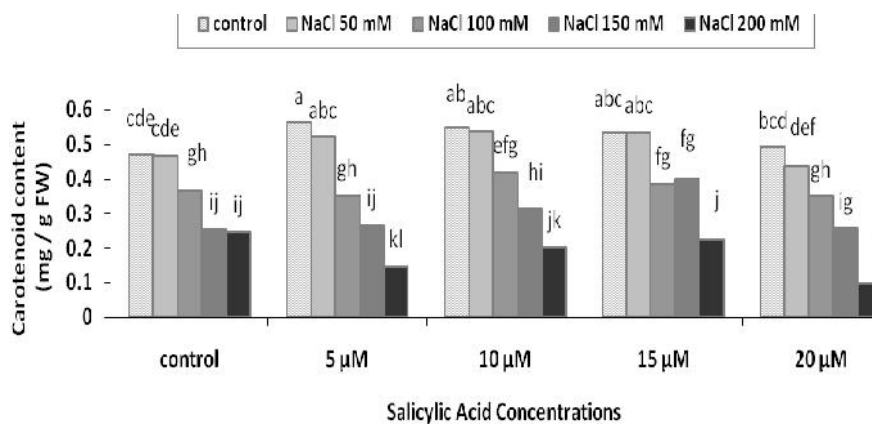
شکل ۳- اثر غلظت‌های مختلف سالیسیلیک اسید بر محتوای کلروفیل b

**Figure 3-** Effect of different concentration of salicylic acid on chlorophyll b content.



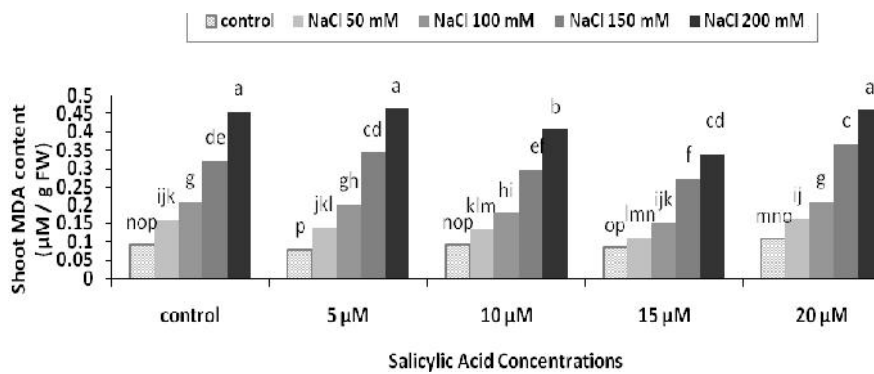
شکل ۴- اثر غلظت‌های مختلف شوری بر محتوای کلروفیل b

Figure 4- Effect of different concentration of salinity on chlorophyll b content



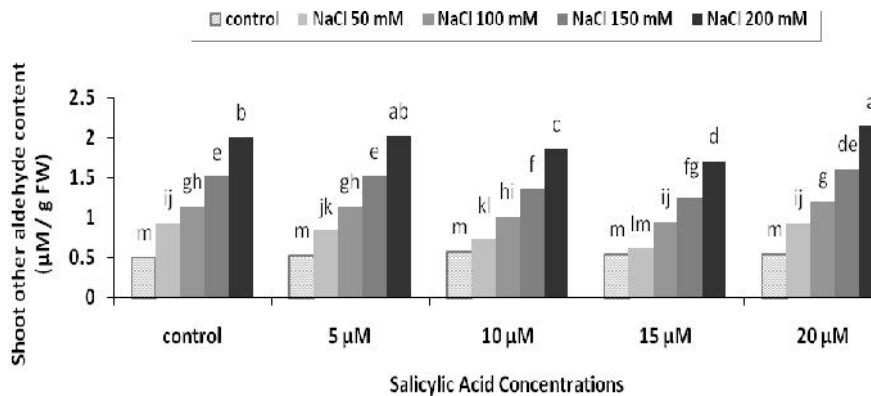
شکل ۵- اثر متقابل ساليسيليك اسيد و شوري بر محتوای کارتنوئید

Figure 5- Interaction of salicylic acid and salinity on carotenoid content



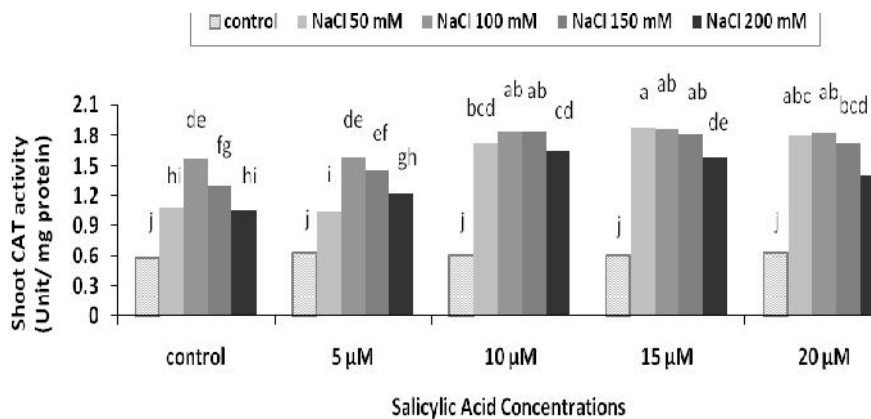
شکل ۶- اثر متقابل ساليسيليك اسيد و شوري بر محتوای مالون دی آلدیید اندام هوایی

Figure 6- Interaction of salicylic acid and salinity on shoot MDA content



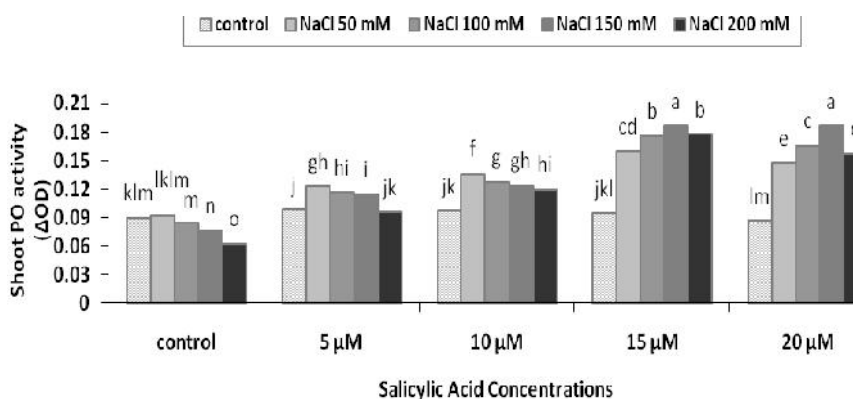
شکل ۷- اثر متقابل سالیسیلیک اسید و شوری بر محتوای سایر آلدییدهای اندام هوایی

Figure 7- Interaction of salicylic acid and salinity on shoot other aldehyde content



شکل ۸- اثر متقابل سالیسیلیک اسید و شوری بر فعالیت کاتالاز در اندام هوایی

Figure 8- Interaction of salicylic acid and salinity on shoot CAT activity



شکل ۹- اثر متقابل سالیسیلیک اسید و شوری بر فعالیت پراکسیداز در اندام هوایی

Figure 9- Interaction of salicylic acid and salinity on shoot PO activity

در تمامی شکل‌ها حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی دار در سطح  $P < 0.05$  است.

In all figures, the same letters indicate no significant difference at  $P < 0.05$

## References

## منابع مورد استفاده

- Abdul Jaleel, C., K. Riadh, R. Gopi, P. Manivannan, J. Ines, H.J. Al-Juburi, Z. Chang-Xing, S. Hong-Bo, and R. Panneerselvam. 2009. Antioxidant defense responses: Physiological plasticity in higher plants under abiotic constrains. *Acta Physiologiae Plantarum*. 31: 427-436.
- Afzali, I., S.M.A. Basra, M. Farooq, and A. Nawaz. 2006. Alleviation of salinity stress in spring wheat by hormonal priming with ABA, salicylic acid and ascorbic acid. *International Journal of Agriculture and Biology*. 1: 23-28.
- Agarwal, S., and V. Pandey. 2004. Antioxidant enzyme responses to NaCl stress in *Cassia angustifolia*. *Biologia Plantarum*. 48: 555-560.
- Agarawal, S., R.K. Sairam, G.C. Srivasta, and R.C. Meena. 2005. Changes in antioxidant enzymes activity and oxidative stress by abscisic acid and salicylic acid in wheat genotypes. *Biologia Plantarum*. 49: 541-550.
- Azevedo Neto, A.D., J.T. Prisco, J. Eneas-Filho, C.E.B. De Abreu, and E. Gomes-Filho. 2006. Effect of salt stress on antioxidative enzymes and lipid peroxidation in leaves and roots of salt tolerant and salt sensitive maize genotypes. *Environmental and Experimental Botany*. 56: 87-94.
- Bajji, M., J.M. Kinet, and S. Lutts. 2001. The use of the electrolyte leakage method for assessing cell membrane stability as a water stress tolerance test in durum wheat. *Plant Growth Regulation*. 1-10.
- Bandeoglu, E., F. Egidogan, M. Yucel, and H. Avni Oktem. 2004. Antioxidant responses of shoots and roots of lentil to NaCl-salinity Stress. *Plant Growth Regulation*. 42: 69-77.
- Ben Hamed, K., A. Castagna, E. Salem, A. Ranieri, and C. Abdelly. 2007. Sea fennel (*Cirrhium Maritimum* L.) under salinity conditions: A comparison of leaf and root antioxidant responses. *Plant Growth Regulation*. 53: 185-194.
- Borsani, O., V. Valpues, and M.A. Botella. 2001. Evidence for a role of salicylic acid in the oxidative damage generated by Nacl and osmotic stress in arabidopsis seedlings. *Plant Physiology*. 126: 1024-1030.
- Demiral, T., and I. Turkan. 2005. Comparative lipid peroxidation, antioxidant defense system and proline content in roots of two rice cultivars differing in salt tolerance. *Environmental and Experimental Botany*. 53: 247-257.
- Dhindsa, R.S., P. Plump-Dhindsa, and T.A. Thrope. 1981. Leaf senescence: correlated with increased levels of membrane permeability and lipid peroxidation, and decreased levels of superoxide dismutase and catalase. *Journal of Experimental Botany*. 32: 93-101.
- El-Tayeb, M.A. 2005. Response of barley grain to the interactive effect of salinity and salicylic acid. *Plant Growth Regulation*. 42: 215-224.

- Eraslan, F., A. Inal, D.J. Pilbeam, and A. Gunes. 2008. Interactive effects of salicylic acid and silicon on oxidative damage and antioxidant activity in spinach (*Spinacia oleracea* L. CV. Matador) grown under boron toxicity and salinity. *Plant Growth Regulation*. 55: 207-219.
- Fadzilla, N.M., R.P. Finch, and R.H. Burdon. 1997. Salinity, oxidative stress and antioxidant responses shoot cultures of rice. *Journal of Experimental Botany*. 48: 325-321.
- Ghai, N., R.C. Setia, and N. Setia. 2002. Effect of paclobutrazol and salicylic acid on chlorophyll content, hill activity and yield components in *Brassica napus* L. (cv. GSL-1). *Phytomorphology*. 52: 83-87.
- Gupta, U.S. 2005. Physiology of stressed crops; (Vol. ) Nutrient relations. Science Publishers, Inc. 253 pp.
- Hayat, S., and A. Ahmad. 2007. Salicylic acid: A plant hormone. Springer. 401 pp.
- He, Y., and Z.Y. Zhu. 2008. Exogenous salicylic acid alleviates NaCl toxicity and increases antioxidative enzyme activity in *Lycopersicon esculentum*. *Biologia Plantarum*. 52: 792-795.
- Heath, R.L., and L. Packer. 1969. Photoperoxidation in isolated chloroplast. . Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 125: 189-198.
- Kar, M., and D. Mishra. 1976. Catalase, peroxidase, polyphenol oxidase activities during rice senescence. *Plant Physiology*. 57: 315-319.
- Khan, W., B. Prithviraj, and D.I. Smith. 2003. Photosynthetic response of corn and soybean to foliar application of salicylates. *Journal of Plant Physiology*. 160: 485-492.
- Khodary, S.E.A. 2004. Effect of salicylic acid on the growth, photosynthesis and carbohydrate metabolism in salt-stressed maize plants. *International Journal of Agriculture and Biology*. 6: 5-8.
- Koca, H., M. Bor, F. Ozdemir, and I. Turkan. 2007. The effect of salt stress on lipid peroxidation, antioxidative enzymes and proline content of sesame cultivars. *Environmental and Experimental Botany*. 60: 344-351.
- Lichtenthaler, H.K. 1987. Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. *Methods in Enzymology*. 148: 350-382.
- Masood, A., N.A. Shab, M. Zeeshan, and G. Abraham. 2006. Differential response of antioxidant enzymes to salinity stress in two varieties of *Azolla* (*Azolla pinnata* and *Azolla filiculcides*). *Environmental and Experimental Botany*. 58: 216-222.
- Meir, S., S. Philosophhadas, and N. Aharoni. 1992. Ethylene increased accumulation of fluorescent lipid peroxidation products detected during senescence of parsley by a newly developed method. *Journal of the American Society for Horticultural Science*. 117: 128-132.

- Multu, S., O. Alici, and B. Nalbantoglu. 2009. Effects of salicylic acid and salinity on apoplasmic antioxidant enzymes in two wheat cultivars differing in salt tolerance. *Biologia Plantarum*. 53: 344-338.
- Neocleous, D., and M. Nasilakakis. 2007. Effects of NaCl stress on red raspberry (*Rubus idaeus* L. "Autumn Bliss"). *Scientia Horticulturae*. 112: 282-289.
- Palma, F., C. Liuch, C. Iribarne, J.M. Garcia-Garrido, and N.A.T. Garcia. 2009. Combined effect of salicylic acid and salinity on some antioxidant activities, oxidative stress and metabolite accumulation in *Phaseolus vulgaris*. *Plant Growth Regulation*. 58: 307-316.
- Pancheva, T.V., L.P. Popva, and A.M. Uzonova. 1996. Effect of salicylic acid on growth and photosynthesis in barley plants. *Journal of Plant Physiology*. 149: 57-63.
- Parida, A.K., and A.B. Das. 2005. Salt Tolerance and salinity effects on plants: a review. *Ecotoxicology Environmental Safety*. 60: 324-349.
- Sudhakar, C., A. Lakshmi, and S. Giridarakumar. 2001. Changes in the antioxidant enzyme efficacy in two high yielding genotypes of mulberry (*Morus alba* L.) under NaCl salinity. *Plant Science*. 141: 613-619.
- Xu, Q., X. Xu, Y. Zhao, K. Jiao, S.J. Herbert, and L. Hao. 2008. Salicylic acid, hydrogen peroxide and calcium induced saline tolerance associated with endogenous hydrogen peroxide homeostasis in naked oat seedlings. *Plant Growth Regulation*. 54: 249-259.

## The Effect of Salicylic Acid on Some Physiological Reactions of Fenugreek (*Trigonella foenum-graecum*) Under Salinity Stress

Pasandi Pour, A.<sup>1</sup>, H. Farahbakhsh<sup>2\*</sup>, M. Saffari<sup>2</sup>, and B. Karamat<sup>3</sup>

Received: June 2013, Accepted: 30 October 2013

### Abstract

This study performed to investigate the effects different concentrations of salicylic acid (0, 5, 10, 15 and 20  $\mu$ M) on membrane lipid peroxidation of fenugreek under levels of salinity stress (0, 50, 100, 150 and 200 mM) in hydroponic condition. The experiment conducted as factorial, in completely randomized design with three replications. Results showed that in plants treated with salinity, chlorophyll a, chlorophyll b and carotenoid contents were reduced in comparison with control plants. However, the salinity increased MDA, other aldehydes, catalase and peroxidase activity in shoots. Results also indicted that applying salicylic acid, especially with concentration of 10 and 15  $\mu$ M, increased the membrane lipid peroxidation and decreased the membrane stability index as compared to the control plants. Results also showed that using 5  $\mu$ M salicylic acid did not significantly improve the salt stress effects compared to the control plants. However, concentration of 20  $\mu$ M salicylic acid increased stress, and decreased the above mentioned parameters.

**Key words:** Antioxidant, Fenugreek, Lipid Peroxidation, Salicylic Acid, Salinity Stress.

---

1- Ph.D. Student of Agronomy and ,University of Shahid Bahonar Kerman, Kerman, Iran

2- Associate Professor, Department of Agronomy and Plant Breeding, University of Shahid Bahonar Kerman, Kerman, Iran.

3- Assistant Professor, Department Biology, University of Shahid Bahonar Kerman, Kerman, Iran.

\*Corresponding Author: hfarahbakhsh@yahoo.com