https://ijpb.ui.ac.ir/?lang=en
IRANIAN JOURNAL OF PLANT BIOLOGY
E-ISSN: 2322-2204
Vol. 13, Issue , No. 3, Autumn 2021
Document Type: Research Paper
Received: 15/05/2021 Accepted: 27/11/2021

Pretreatment of psyllium (*Plantago ovata*) seeds with salicylic acid and physiological and biochemical responses of seedlings to salinity stress

Ehsan Hatami[1], Alireza Einali[1*], Abdulshakoor Raissi[2], Hossain Piri[2]
[1] Department of Biology, faculty of science, University of Sistan and Baluchestan, Zahedan, Iran
[2] Department of Horticulture, Faculty of Agriculture, Velayat University, Iranshahr, Iran

Abstract
Salicylic acid (SA) is known as an influential signal molecule in plant responses to environmental stresses. In this study, the effects of SA as a pre-treatment of psyllium (*Plantago ovata*) seeds on seedling growth, photosynthetic pigments, proteins and amino acids, and accumulation of soluble sugars and starch in response to salinity stress were investigated. Psyllium seeds were soaked with 0 and 500 µM SA for 24 h and sown in the research greenhouse of Iranshahr University in 2019, and the seedlings were exposed as a factorial design to 0, 25, 50, 100, 150 and 300 mM NaCl at 3-day intervals for 20 days. The results showed the seedling growth rate, photosynthetic pigments including chlorophylls and carotenoids, protein concentration as well as accumulation of soluble sugars and starch were severely reduced due to salinity stress. However, the accumulation of free amino acids and proline increased in response to salt stress. SA treatment improved the length of the shoot, increased the amount of pigments, decreased the amount of amino acids, and caused the accumulation of proteins and proline. In addition, an increase in the amount of non-reducing sugars and starch, which was associated with no change or decrease in the concentration of reducing sugars at high salinity levels, occurred in response to SA. These results show that priming the seeds with SA before sowing can increase the plant tolerance to salinity stress through the accumulation of non-reducing sugars and proline and thus maintain the turgor pressure of cells.

Keywords: Chlorophyll, Osmotic modulation, Proline, Protein, Soluble sugars

*Corresponding author: alireza.einali@gmail.com

2322- 2204/ © 2021 University of Isfahan
This is an open access article under the CC-BY-NC-ND 4.0 License (https://creativecommons.org/licenses BY-NC-ND 4.0)

DOI. 10.22108/IJPB.2021.128482.1252.

زیست‌شناسی گیاهی ایران، سال سیزدهم، شمارهٔ چهل و نهم، پاییز ۱۴۰۰، صفحهٔ ۴۲-۲۱
تاریخ دریافت مقاله: ۱۴۰۰/۰۲/۲۵
تاریخ بررسی مجدد: ۱۴۰۰/۰۶/۱۵
تاریخ پذیرش نهایی: ۱۴۰۰/۰۹/۰۶
مقاله پژوهشی

اثر پیش‌تیمار بذر گیاه اسفرزه (*Plantago ovata*) با سالیسیلیک اسید بر پاسخ‌های فیزیولوژیک و بیوشیمیایی گیاهچه‌ها به تنش شوری

احسان حاتمی[۱]، علیرضا عینعلی[۱*]، عبدالشکور رئیسی[۲]، حسین پیری[۲]
[۱] گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه سیستان و بلوچستان، زاهدان، ایران
[۲] گروه باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ولایت، ایرانشهر، ایران

چکیده

سالیسیلیک اسید به‌عنوان یک مولکول سیگنال تأثیرگذار در پاسخ‌های گیاهان به تنش‌های محیطی شناخته شده است. در این پژوهش، اثرات به‌کار بردن سالیسیلیک اسید به‌صورت پیش‌تیمار بذرهای گیاه اسفرزه بر میزان رشد گیاهچه‌ها، میزان رنگیزه‌های فتوسنتزی، میزان پروتئین‌ها و اسیدهای آمینه و تجمع قندهای محلول و نشاسته در پاسخ به تنش شوری بررسی شد. بذرهای گیاه اسفرزه پس از پیش‌تیمار با غلظت‌های صفر و ۵۰۰ میکرومولار سالیسیلیک اسید برای مدت ۲۴ ساعت، در گلخانه تحقیقاتی دانشگاه ولایت ایرانشهر در سال ۱۳۹۸ کاشته شد و گیاهچه‌های حاصل در فواصل زمانی سه روزه و به‌مدت ۲۰ روز، در قالب طرح فاکتوریل در معرض غلظت‌های صفر، ۲۵، ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰ و ۳۰۰ میلی‌مولار نمک سدیم کلرید قرار گرفتند. میزان رشد گیاهچه‌ها، میزان رنگیزه‌های فتوسنتزی شامل کلروفیل‌ها و کاروتنوئید، غلظت پروتئین‌ها و همچنین میزان تجمع قندهای محلول و نشاسته در طول تنش شوری به‌شدت کاهش پیدا کردند. بااین‌حال، میزان تجمع آمینواسیدهای آزاد و پرولین در پاسخ به نمک افزایش یافت. تیمار سالیسیلیک اسید سبب بهبود طول بخش هوایی، افزایش میزان رنگیزه‌ها، کاهش میزان آمینواسیدها و افزایش تجمع پروتئین‌ها و پرولین شد. علاوه‌براین، افزایش میزان قندهای غیر احیایی و نشاسته که با عدم تغییر و یا کاهش غلظت قندهای احیایی در سطوح بالای شوری همراه است، در پاسخ به سالیسیلیک اسید روی داد. این نتایج نشان می‌دهد که پرایمینگ بذرها با سالیسیلیک اسید پیش از کشت می‌تواند تحمل گیاه را در برابر تنش شوری از طریق تجمع قندهای غیر احیایی و پرولین و در نتیجه حفظ فشار تورگور سلول‌ها افزایش دهد.

واژه‌های کلیدی: پرولین، پروتئین، تعدیل اسمزی، قندهای محلول، کلروفیل

*Corresponding author: alireza.einali@gmail.com

2322- 2204/ © 2021 University of Isfahan
This is an open access article under the CC-BY-NC-ND 4.0 License (https://creativecommons.org/licenses BY-NC-ND 4.0)

DOI. 10.22108/IJPB.2021.128482.1252.

مقدمه

تنش شوری یکی از عوامل اصلی محیطی است که تولیدات کشاورزی را محدود می‌کند (Egamberdieva *et al*., 2019). تخمین زده می‌شود که در حال حاضر ۲۰ درصد از زمین‌ها تحت تأثیر شوری قرار دارند و بیش از ۲۵ درصد از زمین های زیر کشت در ۲۵ سال آینده در سراسر جهان تحت تأثیر نمک قرار گرفته و تخریب می‌شوند (Cheng *et al*., 2016). تنش شوری اثرات نامطلوبی بر رشد و نمو گیاه در هر دو سطح فیزیولوژیک و بیوشیمیایی دارد که مستقیماً بر عملکرد و کیفیت محصولات تأثیر می‌گذارد. در تنش شوری علاوه بر بروز ناهنجاری‌هایی همچون تنش اسمزی و سمیّت یونی، تنش اکسیداتیو که باعث تولید گونه‌های واکنش‌پذیر اکسیژن (ROS) می‌شود، نیز ظاهر می‌گردد و همه این عوامل در اثرات مخرب ناشی از این تنش سهیم هستند (Nounjan *et al*., 2012; Ahmad *et al*., 2019). تحت تنش شوری، افزایش بیوسنتز اسمولیت‌هایی مانند قندهای محلول، پرولین و سوربیتول سلول‌ها را در برابر تنش اسمزی محافظت می‌کند (Nounjan *et al*., 2012). این اسمولیت‌ها در متعادل کردن غلظت نمک خارج سلولی و خنثی نمودن یون‌های سدیم و کلر در واکوئول‌ها نقش بسیار مهمی را ایفا می‌کنند (Turkan and Demiral, 2009). توسعه روش‌های مختلف به‌منظور القای تحمل تنش شوری در گیاهان امری ضروری بوده و توجه زیادی را به خود جلب نموده است. رویکردهای مطالعه‌شده برای توسعه گیاهان مقاوم به شوری شامل بهبودهای ژنتیکی و محیطی است (Gunes *et al*., 2007). دراین‌میان، نقش برخی فیتوهورمون‌ها و مولکول‌های سیگنال در پاسخ گیاهان به محرک‌های محیطی مشخص شده است (Gunes *et al*., 2007; Rivas-San Vicente and Plasencia, 2011).

استفاده از اسید سالیسیلیک راهی آسان و مهم برای بهبود رشد و افزایش بهره‌وری گیاه تحت شرایط تنش شوری است (Farhadi and Ghassemi-Golezani, 2020). اسید سالیسیلیک نقش مهمی در تنظیم پاسخ‌های فیزیولوژیک و بیوشیمیایی گیاهان به شرایط استرس دارد که مقاومت گیاه را در برابر شرایط نامساعد محیطی بهبود می‌بخشد (Ma *et al*., 2017). این ماده یک ترکیب فنولی طبیعی است که در رشد گیاه و فرآیندهای فیزیولوژیک مانند جوانه‌زنی بذر، بسته شدن روزنه، جذب یون، فتوسنتز، تعرق، متابولیسم کربوهیدرات و کاهش پراکسیداسیون لیپید نقش دارد (Antonic *et al*., 2016). به‌کار بردن سالیسیلیک اسید پاسخ دفاعی گیاه و مقاومت اکتسابی سیستماتیک (SAR) را فعال می‌کند و از این طریق باعث مقاومت گیاه در برابر تنش‌های غیرزنده مانند تنش شوری، دمای پایین و خشکی می‌شود (Dong *et al*., 2011; Jayakannan *et al*., 2015). به احتمال زیاد اثر سالیسیلیک اسید به عوامل مختلفی از جمله دوز، گونه گیاهی، مرحله رشد و نحوه کاربرد بستگی دارد (Horvath *et al*., 2015; Poor *et al*., 2019). نشان داده شده است که استفاده از سالیسیلیک اسید در شرایط تنش شوری می‌تواند به‌طور مؤثری باعث کاهش آسیب رنگیزه‌ها در گیاهان آرابیدوپسیس (Borsani *et*

(*al*., 2001)، جوز هندی (Li *et al*., 2014) و میخک (Ma *et al*., 2017) شود.

پرایمینگ بذر (seed priming) سبب افزایش قدرت بذر در همگام‌سازی جوانه‌زنی و همچنین بهبود رشد محصول تحت شرایط تنش می‌شود (Roychoudhury *et al*., 2016). پرایمینگ معمولاً به تقویت بذر خشک منجر شده و باعث شروع فرایندهای متابولیکی در طول جذب آب توسط بذر می‌شود (Hanson, 1973). در عملیات کشاورزی، پیش‌تیمار بذر به‌عنوان یک تکنیک ساده و ارزان به حساب می‌آید که قادر به مقابله با انواع تنش‌های محیطی است. مشخص شده است که پیش‌تیمار با سالیسیلیک اسید سبب بهبود رشد و ایجاد مقاومت بیشتر در برابر شوری شده و شاخص قدرت بذر و درصد جوانه‌زنی را افزایش می‌دهد (Zhang *et al*., 1999). پیش‌تیمار بذرها با این هورمون موجب افزایش تحمل به شوری و کاهش اثرات مضر ناشی از آن در گیاهان گوجه‌فرنگی (Szepesi *et al*., 2008)، گندم (Zhang *et al*., 1999) و زیتون (Methenni *et al*., 2018) شده است. از آنجایی که سالیسیلیک اسید سبب تحریک برخی شاخص‌های اساسی رشد می‌شود، به‌عنوان یک تنظیم‌کننده مؤثر برای پرایمینگ بذر استفاده می‌شود (Roychoudhury *et al*., 2016).

اسفرزه *Plantago ovata* گیاهی علفی از خانواده بارهنگ (Plantaginaceae) است. برگ‌های این گیاه خواص دارویی فراوانی داشته و بذرهای آن سرشار از موسیلاژ است و خاصیت تورم و ژله‌ای شدن دارد (Patel *et al*., 2018). مطالعات انجام شده روی پیش‌تیمار بذر گیاه اسفرزه با نمک پتاسیم نیترات نشان‌دهنده تأثیر مثبت آن بر افزایش سرعت جوانه‌زنی، تولید بیوماس، بهبود عملکرد دانه و افزایش تولید موسیلاژ تحت تنش شوری است (Ghassemi-Golezani *et al*., 2011). همچنین، پیش‌تیمار بذرهای این گیاه با سالیسیلیک اسید موجب افزایش مشخصه‌های جوانه‌زنی طی تنش شوری شده است (Farahbakhsh and Pasandi Pour, 2012)، اما پاسخ گیاهچه‌های حاصل به تنش، ناشناخته باقی مانده است. تاکنون مطالعه‌ای درباره پرایمینگ بذرهای گیاه اسفرزه با این هورمون و تأثیر آن بر پاسخ‌های فیزیولوژیک و بیوشیمیایی گیاهچه‌ها به تنش شوری انجام نگرفته است. تجمع مواد حل‌شونده سازگار در گیاهان طی تنش شوری بر اساس برخی واکنش‌های متابولیسمی صورت گرفته است که می‌تواند موجب تعدیل اسمزی و پایداری ساختارهای سلولی در برابر تنش شود (Nounjan *et al*., 2012)؛ بنابراین، می‌توان چنین فرض کرد که پیش‌تیمار بذرها با سالیسیلیک اسید، احتمالاً از طریق افزایش غلظت اسمولیت‌ها سبب القای مقاومت در برابر تنش شوری در این گیاه شود. در این تحقیق سعی شده است که تأثیر پیش‌تیمار بذرها با سالیسیلیک اسید بر رشد و تجمع اسمولیت‌ها در گیاه اسفرزه تحت تنش شوری ارزیابی شود.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی و تیمار شوری

به‌منظور بررسی اثرات تنش شوری و تیمار سالیسیلیک اسید روی گیاه دارویی اسفرزه

(*Plantago ovata* L.)، آزمایشی در قالب طرح بلوک‌های کاملاً تصادفی به‌صورت فاکتوریل با سه تکرار برای هر تیمار، در گلخانه تحقیقاتی دانشگاه ولایت ایرانشهر در سال ۱۳۹۸ انجام شد. دو فاکتور پیش‌تیمار بذرها با سالیسیلیک اسید و تیمار تنش شوری بررسی شدند. برای پرایمینگ بذرها از غلظت‌های صفر و ۵۰۰ میکرومولار سالیسیلیک اسید و برای ایجاد تنش شوری از سدیم کلرید در شش سطح صفر، ۲۵، ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰و ۳۰۰ میلی‌مولار استفاده شد. بذرهای گیاه اسفرزه (تهیه شده از شرکت پاکان بذر اصفهان) به‌مدت ۲۴ ساعت در محلول‌های حاوی غلظت‌های صفر و یا ۵۰۰ میکرومولار سالیسیلیک اسید خیسانده شدند. هر دو گروه بذرهای تیمارشده یا تیمارنشده با سالیسیلیک اسید در مجاورت هوا خشک شده و در سینی‌های حاوی کوکوپیت به‌صورت خزانه کاشته شدند. پس از جوانه‌زنی، همه گیاهچه‌ها در مرحله دو یا سه برگی همسان‌سازی شد و هر گیاهچه به یک گلدان پلاستیکی با ابعاد ۱۴ × ۱۲ سانتی‌متر دارای مقدار یک کیلوگرم کوکوپیت منتقل و در شرایط دمایی ۱±۲۹ درجه سانتیگراد و شدت نور ۳۰۰-۲۵۰ میکرومول فوتون بر مترمربع بر ثانیه قرار گرفتند. گیاهچه‌ها هر سه روز یک‌بار تا رسیدن به مرحله پنج یا شش برگی با محلول غذایی هوگلند معمولی آبیاری شدند. تیمار شوری از طریق اضافه کردن سدیم کلرید در غلظت‌های فوق به محلول‌های غذایی در فواصل زمانی سه روزه و برای مدت سه هفته به هر یک از گروه‌های گیاهان اعمال شد. گیاهان حاصل از بذرهای پیش‌تیمارنشده با سالیسیلیک اسید که محلول هوگلند معمولی با غلظت صفر سدیم کلرید را دریافت کرده بودند، به‌عنوان شاهد برای آزمایش‌های شوری در نظر گرفته شدند. پس از این مدت، هر دو گروه گیاهان پیش‌تیمارنشده و پیش‌تیمارشده با سالیسیلیک اسید برای بررسی پاسخ‌های فیزیولوژیک (شامل تعیین طول ریشه و اندام هوایی، وزن تر و وزن خشک گیاه) و بیوشیمیایی به سطوح مختلف تنش شوری، جمع‌آوری شد و مورد آزمایش قرار گرفتند. تمامی تحلیل‌های فیزیولوژیک و بیوشیمیایی در سه تکرار انجام شد.

استخراج و اندازه‌گیری رنگیزه‌های فتوسنتزی

استخراج رنگیزه‌های فتوسنتزی شامل کلروفیل‌ها و کاروتنوئید کل از یک گرم بافت برگ با استفاده از استون ۸۰٪ انجام شد. میزان جذب محلول صاف‌شده در طول موج‌های ۶۶۳، ۶۴۵ و ۶۵۲ نانومتر تعیین شد و مقادیر کلروفیل‌های a، b و کل با استفاده از رابطه‌های زیر اندازه‌گیری شد (Arnon, 1949).

رابطه ۱:

$$\text{Chl } a \text{ (mg.ml}^{-1}) = 0.0127\ A_{663} - 0.00269\ A_{645}$$

رابطه ۲:

$$\text{Chl } b \text{ (mg.ml}^{-1}) = 0.0229\ A_{645} - 0.00468\ A_{663}$$

رابطه ۳:

$$\text{Total Chl (mg.ml}^{-1}) = A_{652}/34.5$$

میزان کاروتنوئید کل در طول موج ۴۷۰ نانومتر و با استفاده از رابطه زیر اندازه‌گیری شد (Lichtenthaler and Buschmann, 2001).

رابطه ۴:

$$\text{Total Car } (\mu g\ ml^{-1}) = (1000A_{470} - 1.82\text{Chl } a - 85.02\text{Chl } b)/198$$

بقایای حاصل از استخراج رنگیزه‌ها پس از خشک شدن برای اندازه‌گیری قندهای محلول و پروتئین کل استفاده شد.

استخراج و اندازه‌گیری پروتئین‌های محلول و پروتئین کل

به‌منظور استخراج پروتئین‌های محلول، ۰/۲ گرم از بافت تازه برگ توسط ۵ میلی‌لیتر بافر استخراج ساییده شد و پس از صاف شدن از میان چهار لایه پارچه ململ، به‌مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و دور g ۱۰۰۰۰ سانتریفیوژ شد. ترکیب بافر استخراج عبارت بود از: ۱۰۰ میلی‌مولار بافر فسفات سرد با اسیدیته ۷/۵، ۱۰٪ گلیسرول، ۱۰ میلی‌مولار پتاسیم کلرید، ۱ میلی‌مولار منیزیم سولفات، ۱ میلی‌مولار EDTA، ۱ میلی‌مولار PMSF (فنیل متیل سولفونیل فلورایـد)، ۱٪ PVPP (پلی وینیل پلی ویرولیدون) و ۷۰ میلی‌مولار بتا ۲- مرکاپتواتانول. عصاره‌ها با زغال فعال رنگ‌بری شد و اندازه‌گیری میزان پروتئین‌های محلول به روش Bradford (۱۹۶۷) با استفاده از آلبومین به‌عنوان نمونه استاندارد انجام شد.

استخراج پروتئین کل از مقدار ۰/۰۱ گرم از بقایای برگ حاصل از استخراج رنگیزه‌ها و با استفاده از روش Stone و Gifford (۱۹۹۷) همراه با تغییراتی (Mirshekari *et al*., 2017) انجام شد. اندازه‌گیری به روش Markwell و همکاران (۱۹۸۱) با استفاده از آلبومین به‌عنوان نمونه استاندارد انجام شد.

استخراج و اندازه‌گیری اسیدهای آمینه و پرولین

استخراج اسیدهای آمینه و پرولین از ۰/۲ گرم بافت تازه برگ با استفاده از اتانول ۸۰٪، بر اساس روش Omokolo و همکاران (۱۹۹۶) انجام شد. عصاره الکلی حاصل پس از تغلیظ، با نسبت ۱ به ۵ با کلروفرم مخلوط شد و فاز بالایی برای اندازه‌گیری آمینواسید کل و پرولین استفاده شد.

اندازه‌گیری اسیدهای آمینه کل به‌صورت اسپکتروفتومتری و بر اساس واکنش با ناین هیدرین بود که از طریق روش Yemm و همکاران (۱۹۵۵) و با استفاده از گلایسین به عنوان استاندارد در طول موج ۵۷۰ نانومتر انجام گردید.

اندازه‌گیری پرولین با استفاده از روش Bates و همکاران (۱۹۷۳) انجام گرفت. مخلوط واکنش شامل ۰/۵ میلی‌لیتر عصاره الکلی و ۲ میلی‌لیتر معرف ناین هیدرین ۱٪ (یک گرم ناین هیدرین در مخلوط استیک اسید و آب به نسبت ۶۰ به ۴۰) بود. پس از انجام واکنش در ۱۰۰ درجه سانتیگراد به‌مدت یک ساعت و توقف واکنش در آب سرد، پرولین با استفاده از تولوئن جدا شد و جذب آن در طول موج ۵۲۰ نانومتر خوانده شد. میزان پرولین با استفاده از منحنی استاندارد پرولین اندازه‌گیری شد.

استخراج و اندازه‌گیری قندهای محلول و نشاسته

استخراج قندهای محلول با استفاده از روش Omokolo و همکاران (۱۹۹۶) همانند استخراج آمینواسیدها انجام شد، با این تفاوت که به‌جای بافت تازه برگ از ۲۰ میلی‌گرم بقایای عاری از رنگیزه استفاده گردید. عصاره الکلی به دست آمده پس از تغلیظ، در g۱۰۰۰ به‌مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد و فاز شفاف بالایی برای اندازه‌گیری انواع قندهای محلول شامل قندهای احیایی و غیراحیایی استفاده شد.

قندهای احیایی به روش Miller (۱۹۵۹) و با استفاده از معرف دی نیتروسالیسیلیک اسید در طول موج ۵۷۵ نانومتر اندازه‌گیری شدند. مقدار قندهای احیایی با استفاده از منحنی استاندارد گلوکز محاسبه شد. اندازه‌گیری قندهای غیراحیایی به روش Handel (۱۹۶۸) و با استفاده از منحنی استاندارد ساکارز انجام شد.

استخراج نشاسته از طریق هیدرولیز اسیدی بقایای بافتی حاصل از استخراج قندهای محلول با پرکلریک اسید انجام گرفت. مقادیر گلوکز حاصل بر اساس روش McCready و همکاران (۱۹۵۰) و با استفاده از نمودار استاندارد گلوکز محاسبه و برای تعیین میزان نشاسته در ۰/۹ ضرب گردید.

تجزیه و تحلیل آماری

تمام نتایج به‌صورت میانگین و SE حاصل از سه تکرار مستقل برای هر تیمار بیان شد. وجود اختلاف آماری معنی‌دار بین تیمارها در قالب طرح فاکتوریل با استفاده از تحلیل واریانس دو طرفه (Two-way ANOVA) و آزمون دانکن در سطح ۰/۰۵ ($P<0.05$) تعیین شد. تمامی تحلیل‌های آماری با استفاده از نرم افزار SigmaPlot نسخه ۱۲ انجام گرفت.

نتایج و بحث

اثر شوری و پیش‌تیمار سالیسیلیک اسید بر رشد گیاه

نتایج آنالیز واریانس اثرات شوری و پیش‌تیمار سالیسیلیک اسید بر ویژگی‌های رشد گیاهچه‌های اسفرزه در جدول (۱) آمده است. به کار بردن غلظت‌های مختلف نمک سبب کاهش الگوی رشد در این گیاه شد به‌طوری‌که همگام با افزایش سطح شوری، طول ریشه و بخش هوایی و همچنین وزن تر و خشک گیاه در مقایسه با گیاهان شاهد به‌شدت کاهش پیدا کرد (جدول ۲).

جدول ۱- آنالیز واریانس اثر پیش‌تیمار بذرهای گیاه اسفرزه با هورمون سالیسیلیک اسید بر ویژگی‌های رشد گیاهچه‌ها در پاسخ به سطوح مختلف شوری.

Table 1- Analysis of variance of the effect of psyllium seeds pretreatment with salicylic acid on seedlings growth characteristics in response to different salt levels.

		میانگین مربعات				
		طول گیاه				
منبع متغیر	درجه آزادی	ریشه	بخش هوایی	وزن تر	وزن خشک	نسبت وزن تر به وزن خشک
Block	2	0.48^{ns}	2.13^{ns}	10.46^{ns}	0.885^{*}	2.164^{*}
SA	1	4.48^{**}	12.559^{**}	0.0608^{ns}	2.834^{**}	2.937^{*}
Salinity	5	18.4^{**}	161.651^{**}	629.251^{**}	37.515^{**}	12.687^{**}
SA × Salinity	5	1.293^{**}	3.767^{*}	84.705^{**}	0.804^{*}	3.101^{**}
Residual	22	0.31	1.08	4.299	0.272	0.577
Total	35	3.154	24.76	104.943	5.742	2.735

**، * و ns به ترتیب، معنی‌دار در سطح 0.01، 0.05 و غیر معنی‌دار

**, *, ns: significant at level of 0.01 and 0.05 and not significant respectively.

جدول ۲- ویژگی‌های رشد گیاهچه‌های اسفرزه پیش‌تیمارشده و یا پیش‌تیمارنشده با هورمون سالیسیلیک اسید در پاسخ به سطوح مختلف شوری. مقادیر، میانگین سه تکرار ± SE است. حروف غیریکسان در هر ستون بیانگر اختلاف معنی‌دار بین تیمارهای مختلف در سطح P<0.05 بر اساس آزمون دانکن است.

Table 2- Growth characteristics of seedlings of pretreated or untreated psyllium with salicylic acid in response to different levels of salinity. Values are the mean of three replicates ± SE of three separate measurements. Different letters in each column indicate significant differences between the various treatments at $P < 0.05$ according to the Duncan test.

سطوح شوری (میلی‌مولار)		طول گیاه (سانتی‌متر) ریشه	طول گیاه (سانتی‌متر) بخش هوایی	وزن تر (گرم)	وزن خشک (گرم)	نسبت وزن تر به وزن خشک
0	-SA	7.77±0.41^{a}	19.25±0.57^{b}	36.30±1.77^{a}	8.08±0.44^{a}	4.54±0.40^{c}
	+SA	8.18±0.63^{a}	21.83±0.51^{a}	32.92±0.97^{a}	8.46±0.66^{a}	3.94±0.29^{cd}
25	-SA	7.95±0.35^{a}	18.75±0.59^{b}	34.94±0.99^{a}	7.58±0.28^{a}	4.63±0.24^{c}
	+SA	8.07± 0.31^{a}	19.78±0.54^{b}	24.50±0.86^{b}	7.32±0.49^{ab}	3.39±0.29^{d}
50	-SA	5.55±0.19^{b}	15.87±0.33^{c}	27.76±1.93^{b}	4.43±0.28^{c}	6.28±0.33^{ab}
	+SA	7.46±0.55^{ab}	17.62±1.01^{bc}	35.52±1.17^{a}	6.29±0.42^{b}	5.72±0.47^{b}
100	-SA	4.35±0.13^{c}	12.45±0.86^{d}	24.21±1.89^{bc}	3.61±0.51^{cd}	7.05±0.48^{ab}
	+SA	5.07±0.20^{c}	14.53±0.41^{d}	26.70±1.18^{b}	3.73±0.30^{cd}	7.34±0.32^{a}
150	-SA	3.18±0.27^{d}	9.07±0.25^{f}	14.84±1.85^{d}	2.61±0.22^{d}	5.90±0.58^{ab}
	+SA	4.93±0.22^{c}	11.23±0.38^{e}	22.10±0.90^{c}	3.11±0.35^{d}	7.36±0.42^{a}
300	-SA	3.50±0.16^{d}	8.07±0.43^{g}	9.58±1.03^{e}	2.32±0.17^{d}	4.17±0.49^{c}
	+SA	3.92±0.36^{d}	7.32±1.01^{g}	5.48±0.46^{f}	2.31±0.25^{d}	2.43±0.28^{e}

اثر شوری و پیش‌تیمار سالیسیلیک اسید بر میزان رنگیزه‌های فتوسنتزی برگ‌ها

نتایج آنالیز واریانس اثرات شوری و پیش‌تیمار سالیسیلیک اسید بر میزان رنگیزه‌های فتوسنتزی گیاهچه ها در جدول (۳) آمده است. در این پژوهش، میزان کلروفیل‌های a، b و کل در گیاهچه‌های اسفرزه در سطوح شوری متوسط و بالا در مقایسه با شاهد به‌شدت کاهش پیدا کرد، به‌طوری‌که این کاهش در سطح شوری بالا بسیار شدیدتر از غلظت‌های متوسط آن بود (شکل ۱-A، B و C). کاهش میزان کلروفیل در نتیجه تنش شوری در بسیاری از گیاهان گزارش شده است (Ahmad and Riffat, 2005; Eraslan *et al*., 2007; Gunes *et al*., 2007; Yusuf *et al*., 2008). این کاهش می‌تواند در نتیجه اختلال در سنتز کلروفیل و یا افزایش فعالیت آنزیم تجزیه‌کننده کلروفیل باشد. پیش‌تیمار بذرهای اسفرزه با سالیسیلیک اسید در شرایط غیر تنشی تأثیری بر میزان کلروفیل a و کل نداشت، درحالی‌که سبب کاهش معنی‌دار کلروفیل b شده است. در سطح شوری پایین (۲۵ میلی‌مولار) تأثیر منفی هورمون سالیسیلیک اسید بر میزان کلروفیل‌ها در مقایسه با نمونه‌های تیمارنشده به‌وضوح مشاهده می‌شود. باوجوداین، کاهش در مقدار کلروفیل، میزان وزن خشک این گیاهان در مقایسه با نمونه‌های تیمارنشده بدون تغییر باقی ماند (جدول ۲) که این امر می‌تواند بیانگر تأثیر هورمون در

ایجاد یک نسبت مناسب کلروفیل a/b برای انجام فتوسنتز حتی با وجود کاهش میزان کلروفیل باشد. افزایش نسبت کلروفیل a/b در نمونه‌های تیمارشده با سالیسیلیک اسید که فقط در سطوح صفر و ۲۵ میلی‌مولار شوری روی داده است (شکل ۱-D)، می‌تواند این موضوع را تأیید کند. این در حالی است که پیش‌تیمار هورمون سالیسیلیک اسید موجب افزایش معنی‌دار میزان کلروفیل‌ها در غلظت ۵۰ میلی‌مولار نمک شده است. میزان کلروفیل‌های گیاهان پیش‌تیمارشده با سالیسیلیک اسید در سایر سطوح متوسط شوری (۱۰۰ و ۱۵۰ میلی‌مولار) در مقایسه با نمونه‌های تیمارنشده تغییر پیدا نکرد و یا به‌صورت غیر معنی‌دار افزایش جزئی نشان داد. بااین‌وجود، افزایش سطح کلروفیل‌ها در پاسخ به سالیسیلیک اسید در سطح شوری بالا کاملاً مشهود بود. نسبت کلروفیل a/b در تمام سطوح شوری به جز ۳۰۰ میلی‌مولار نسبت به شاهد تغییر معنی‌داری پیدا نکرد که بیانگر کاهش یکنواخت کلروفیل a در برابر کلروفیل b است (شکل ۱-D). کاهش این نسبت در سطح شوری بالا در مقایسه با شاهد می‌تواند بیانگر کاهش بیشتر کلروفیل a نسبت به کلروفیل b در این سطح شوری باشد. تأثیر مثبت هورمون سالیسیلیک اسید در افزایش نسبت کلروفیل a/b تنها در نمونه‌های رشد یافته در سطوح صفر و ۲۵ میلی‌مولار نمک مشاهده شد که نشان‌دهنده کاهش بیشتر در میزان کلروفیل b است. از آنجایی که سنتز کلروفیل b به‌واسطه اکسیداسیون گروه متیل روی حلقه B کلروفیل a و تبدیل آن به گروه فرمیل اتفاق می‌افتد (Porra *et al*., 1994)، بنابراین افزایش این نسبت بیانگر کاهش سنتز کلروفیل b از کلروفیل a بوده و با وجود کاهش هر دو کلروفیل، سبب اختلال در میزان فتوسنتز نمی‌شود. منطبق بودن مقادیر کلروفیل‌ها با میزان زیست‌توده گیاهی در نمونه‌های تیمارشده نسبت به نمونه‌های تیمارنشده با سالیسیلیک اسید در همه سطوح شوری نشانگر نقش این هورمون در تنظیم میزان کلروفیل گیاه اسفرزه است. نقش سالیسیلیک اسید به‌عنوان هورمون کنترل‌کننده سطح کلروفیل در گیاهان پیش‌تر مشخص شده است (Khan *et al*., 2003; El-Tayeb, 2005; Hussein *et al*., 2007).

کاهش میزان کاروتنوئیدهای کل گیاهچه‌های اسفرزه در سطوح شوری بالاتر از ۵۰ میلی‌مولار مشاهده شد (شکل ۲-A). تیمار سالیسیلیک اسید تنها در سطوح شوری ۵۰ و ۳۰۰ میلی‌مولار سبب افزایش کاروتنوئیدها شد و در سطوح دیگر شوری، تغییر معنی‌داری از لحاظ آماری بین میزان کاروتنوئیدهای گیاهان تیمارشده و تیمارنشده با سالیسیلیک اسید وجود نداشت. این تغییر در میزان کاروتنوئیدها مطابق با تغییرات کلروفیل کل است که نشانگر رابطه بسیار بالا بین میزان کاروتنوئید و کلروفیل در گیاهان است. وجود همبستگی بالا بین این دو رنگیزه در یک رقم گندم تیمارشده با سالیسیلیک اسید تحت تنش شوری مشاهده شده است (Arfan *et al*., 2007). بااین‌وجود، افزایش نسبت کلروفیل به کاروتنوئید (شکل ۲-B) در طول تنش شوری بیانگر کاهش کمتر کلروفیل‌ها در برابر کاروتنوئیدها است. تأثیر هورمون سالیسیلیک اسید بر میزان این نسبت در مقایسه با نمونه‌های تیمارنشده، در سطوح مختلف نمک تغییر معنی‌داری ایجاد نکرد که این امر به‌علت تأثیر

یکسان پیش‌تیمار سالیسیلیک اسید بر میزان کلروفیل و کاروتنوئید است (شکل ۱-C و ۲-A).

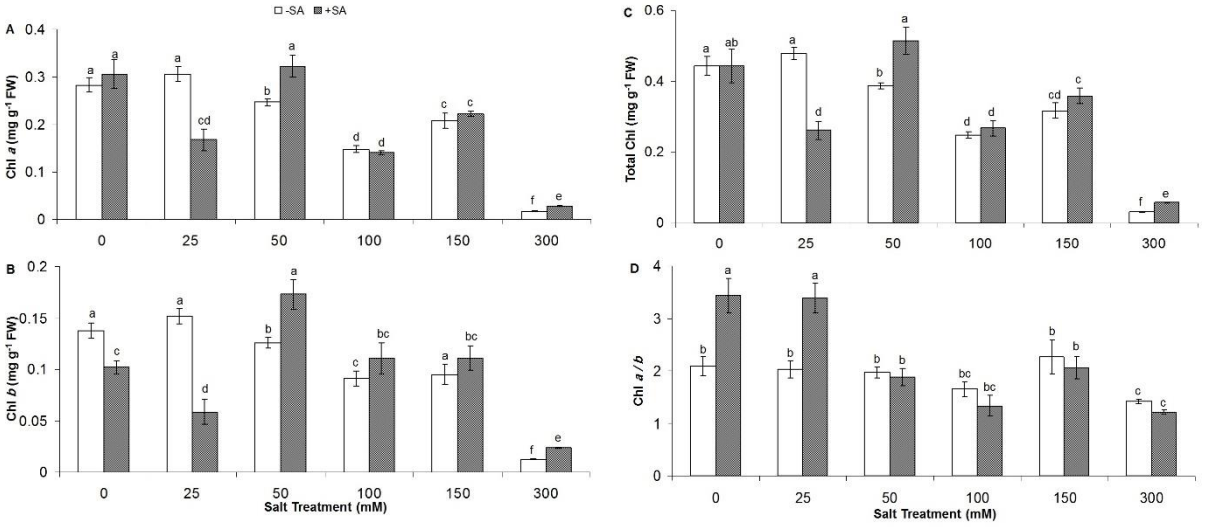
جدول ۳- آنالیز واریانس اثر پیش‌تیمار بذرهای گیاه اسفرزه با هورمون سالیسیلیک اسید بر رنگیزه‌های فتوسنتزی گیاهچه‌ها در پاسخ به سطوح مختلف شوری.

Table 3- Analysis of variance of the effect of psyllium seeds pretreatment with salicylic acid on photosynthetic pigments of seedlings in response to different salt levels.

		میانگین مربعات					
منبع متغیر	درجه آزادی	کلروفیل *a*	کلروفیل *b*	کلروفیل کل	کاروتنوئید	نسبت کلروفیل *a/b*	نسبت کلروفیل به کاروتنوئید
Block	2	0.0045^{**}	0.0019^{**}	0.0132^{**}	0.0000175^{ns}	0.805^{ns}	1.42^{ns}
SA	1	0.000076^{ns}	0.000915^{ns}	0.000454^{ns}	0.000474^{**}	2.04^{*}	2.005^{ns}
Salinity	5	0.0677^{**}	0.0103^{**}	0.138^{**}	0.00271^{**}	3.112^{**}	42.364^{**}
SA × Salinity	5	0.0084^{**}	0.00353^{**}	0.0236^{**}	0.000187^{**}	1.306^{**}	8.719^{*}
Residual	22	0.000753	0.000386	0.00221	2.57E-05	0.473	2.553
Total	35	0.0114	0.00226	0.0247	0.000445	1.014	9.106

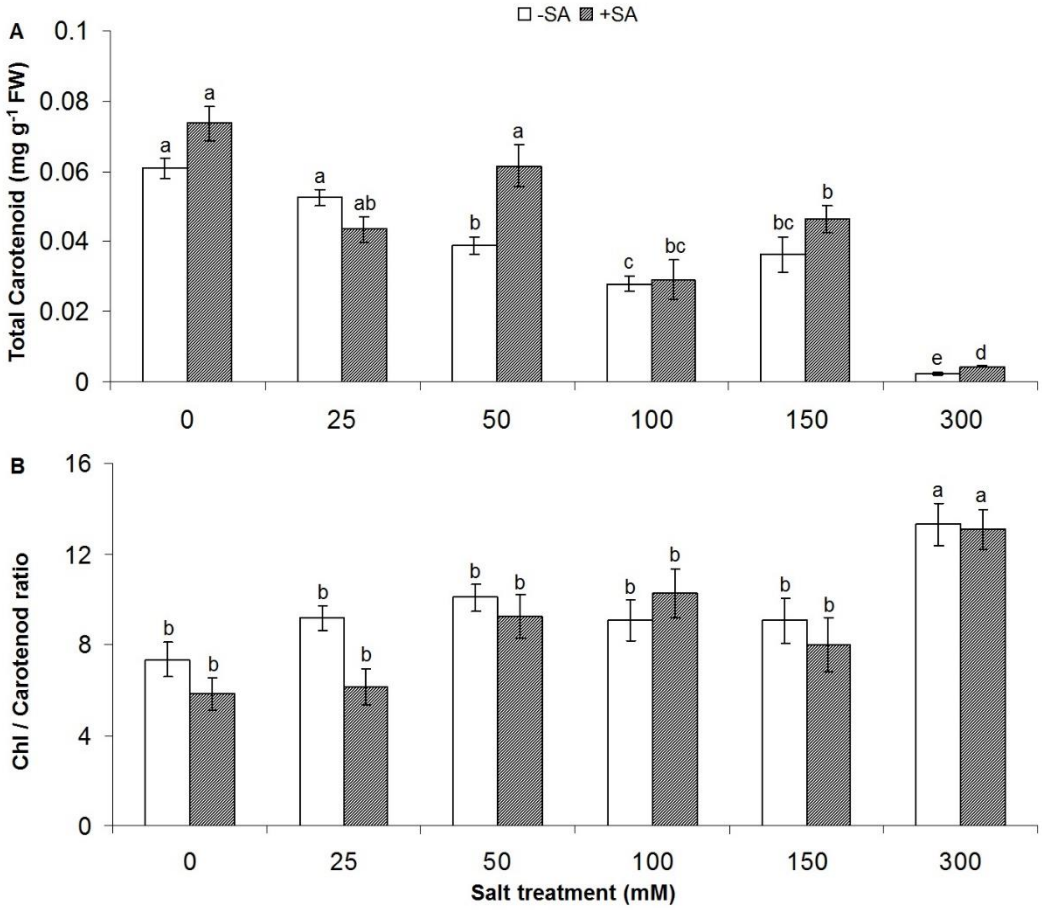
**، * و ns به ترتیب، معنی‌دار در سطح 0.01، 0.05 و غیر معنی‌دار

**, *, ns: significant at level of 0.01 and 0.05 and not significant respectively.



شکل ۱- اثر سطوح شوری مختلف بر میزان کلروفیل a (A)، کلروفیل b (B)، کلروفیل کل (C) و نسبت کلروفیل a/b (D) در گیاهچه‌های پیش‌تیمارشده و یا پیش‌تیمارنشده با هورمون سالیسیلیک اسید. مقادیر، میانگین سه تکرار ± SE است. حروف غیریکسان بیانگر اختلاف معنی‌دار بین تیمارهای مختلف در سطح P<0.05 بر اساس آزمون دانکن است.

Figure 1- Effect of different salinity levels on chlorophyll a (A), chlorophyll b (B), total chlorophyll (C) and chlorophyll a/b ratio (D) in seedlings pretreated or untreated with salicylic acid. Values are the mean of three replicates ± SE of three separate measurements. Different letters indicate significant differences between the various treatments at P<0.05 according to the Duncan test.



شکل ۲- اثر سطوح شوری مختلف بر میزان کاروتنوئید کل (A) و نسبت کلروفیل به کاروتنوئید (B) در گیاهچه‌های پیش‌تیمارشده و یا پیش‌تیمارنشده با هورمون سالیسیلیک اسید. مقادیر، میانگین سه تکرار ± SE است. حروف غیریکسان بیانگر اختلاف معنی‌دار بین تیمارهای مختلف در سطح P<0.05 بر اساس آزمون دانکن است.

Figure 2- Effect of different salinity levels on total carotenoid content (A) and chlorophyll/carotenoid ratio (B) in seedlings pretreated or untreated with salicylic acid. Data are the mean of three replicates ± SE of three separate measurements. Different letters indicate significant differences between the various treatments at P<0.05 according to the Duncan test.

اثر شوری و پیش‌تیمار سالیسیلیک اسید بر میزان پروتئین‌ها، آمینواسید کل و پرولین

جدول (۴) ، نتایج آنالیز واریانس اثرات شوری و پیش‌تیمار سالیسیلیک اسید بر ویژگی‌های بیوشیمیایی گیاهچه‌های اسفرزه را نشان می‌دهد. در پژوهش حاضر، پروتئین‌های محلول شامل پروتئین‌های استخراج‌شده با بافر استخراج بدون SDS و پروتئین کل شامل پروتئین‌های استخراج‌شده با بافر نمونه در حضور SDS است. باوجوداینکه SDS همه پروتئین‌ها را استخراج نمی‌کند، بااین‌حال مقدار پروتئین‌های استخراج‌شده با بافر نمونه بیش از چهار برابر پروتئین‌های به دست آمده با بافر استخراج بود (شکل ۳-A و B). تیمار شوری گیاهچه‌های اسفرزه با غلظت‌های ۱۵۰ و ۳۰۰ میلی‌مولار سبب کاهش معنی‌دار غلظت پروتئین‌های محلول و پروتئین کل در مقایسه با شاهد شد (شکل ۳-A و B). پیش‌تیمار با سالیسیلیک اسید سبب افزایش میزان پروتئین محلول در همه سطوح شوری به جز ۵۰ و ۳۰۰ میلی‌مولار

گشت (شکل ۳-A). میزان پروتئین کل نیز در پاسخ به پیش‌تیمار سالیسیلیک اسید در سطوح شوری صفر و ۲۵ میلی‌مولار به‌طور چشمگیری افزایش یافت. به‌هرحال، به جز سطح شوری ۱۵۰ میلی‌مولار، در سایر سطوح شوری متوسط، هیچ تغییر معنی‌داری از نظر آماری در غلظت پروتئین‌های کل برگ گیاهان پیش‌تیمارشده با سالیسیلیک اسید در مقایسه با پیش‌تیمارنشده ایجاد نشد. علاوه‌براین، پیش‌تیمار سالیسیلیک اسید سبب کاهش شدید میزان پروتئین کل در سطح شوری بالا نیز شده است (شکل ۳-B). برخلاف پروتئین‌های محلول و کل، محتوای آمینواسیدهای آزاد در سطوح شوری بالاتر از ۵۰ میلی‌مولار در مقایسه با شاهد به‌شدت افزایش یافت، درحالی‌که در سطح شوری بالا بدون تغییر باقی ماند (شکل ۳-C).

جدول ۴- آنالیز واریانس اثر پیش‌تیمار بذرهای گیاه اسفرزه با هورمون سالیسیلیک اسید بر ویژگی‌های بیوشیمیایی گیاهچه‌ها در پاسخ به سطوح مختلف شوری.

Table 4- Analysis of variance of the effect of psyllium seeds Pretreatment with salicylic acid on biochemical characteristics of seedlings in response to different salt levels.

		میانگین مربعات						
منبع متغیر	درجه آزادی	پروتئین کل	پروتئین محلول	آمینواسید	پرولین	قندهای احیایی	قندهای غیراحیایی	نشاسته
Block	2	1.077^{*}	0.028^{ns}	0.02148^{ns}	0.000309^{ns}	0.1125^{*}	0.000677^{ns}	0.000819^{ns}
SA	1	18.385^{**}	2.309^{**}	4.314^{**}	0.0819^{**}	0.975^{**}	0.000568^{ns}	0.00935^{ns}
Salinity	5	20.724^{**}	1.024^{**}	0.312^{**}	0.0147^{**}	1.865^{**}	0.0745^{**}	1.408^{**}
SA × Salinity	5	6.794^{**}	0.401^{**}	0.514^{**}	0.00187^{**}	0.161^{**}	0.00876^{**}	0.116^{**}
Residual	22	0.366	0.0271	0.0711	0.000177	0.0315	0.00191	0.0244
Total	35	4.707	0.288	0.29	0.00482	0.339	0.0132	0.235

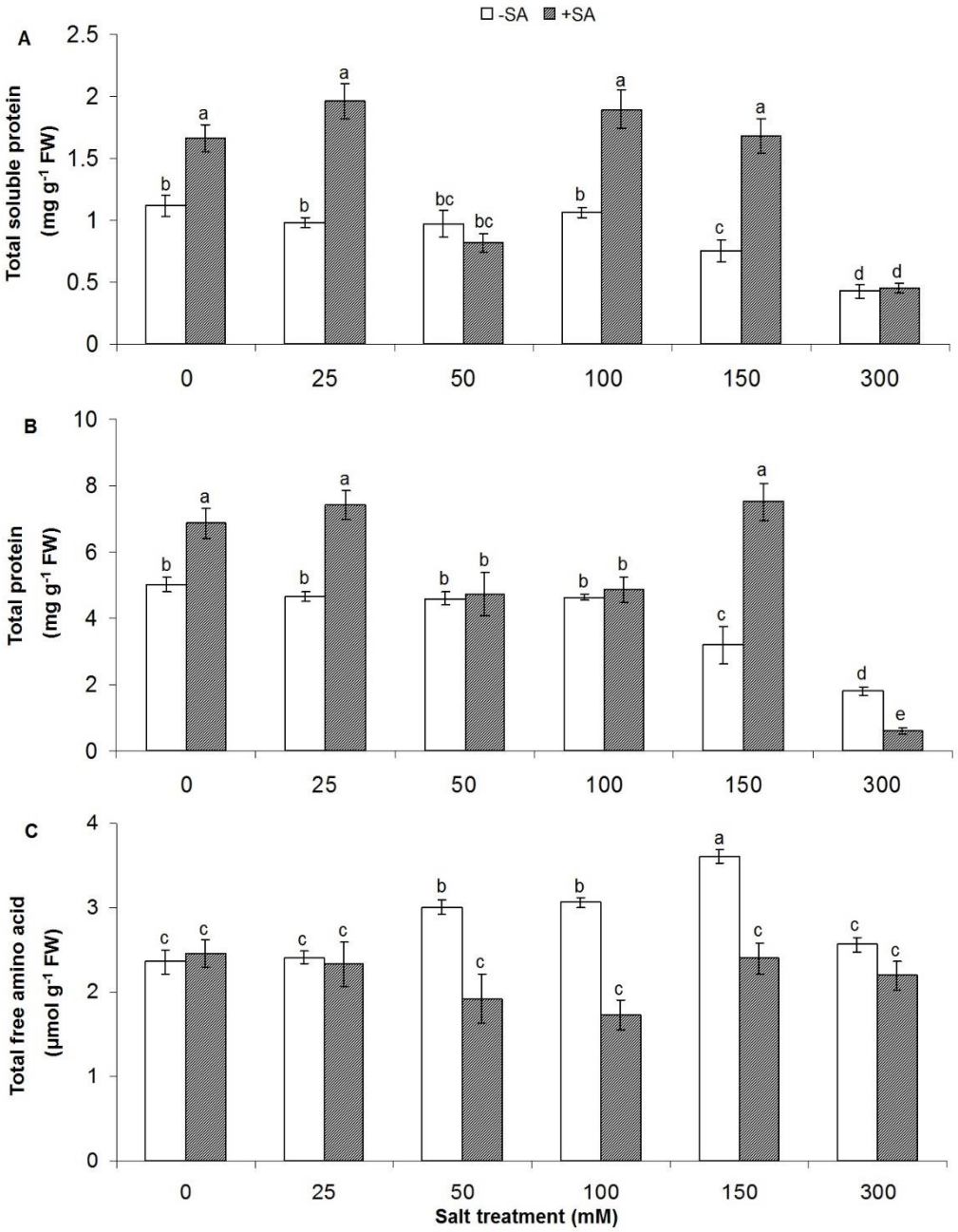
**، * و ^{ns} به ترتیب، معنی‌دار در سطح 0.01، 0.05 و غیر معنی‌دار

**, *, ^{ns}: significant at level of 0.01 and 0.05 and not significant respectively.

به‌طورکلی، تأثیر تنش شوری بر میزان آمینواسید کل بسته به نوع گیاه متفاوت است. به‌عنوان مثال، میزان آمینواسید کل در واریته Gimeza 9 ذرت تحت تنش شوری افزایش یافته است، درحالی‌که در واریته Giza 168 کاهش پیدا کرده است (El-Bassiouny *et al.*, 2005). پیش‌تیمار بذرهای اسفرزه با سالیسیلیک اسید موجب کاهش شدید غلظت آمینواسیدها در سطوح شوری متوسط شد، اما در سایر سطوح تغییری ایجاد نکرد. کاهش میزان پروتئین‌ها در طول فرایند شوری در بسیاری از گیاهان و جلبک‌های سبز مشاهده شده است (Misra and Dwivedi, 1990; Mishra *et al.*, 2008; Misra and Saxena, 2009). بااین‌حال، تغییرات متفاوت ایجادشده بین میزان پروتئین‌ها و آمینواسیدها در طول تنش شوری می‌تواند به افزایش میزان سیکل سنتز و تجزیه پروتئین (protein turnover) نسبت داده شود. این سیکل یکی از فرایندهای کلیدی سلولی است که نقش بسیار مهمی را در ایجاد هموستازی آمینواسیدها،

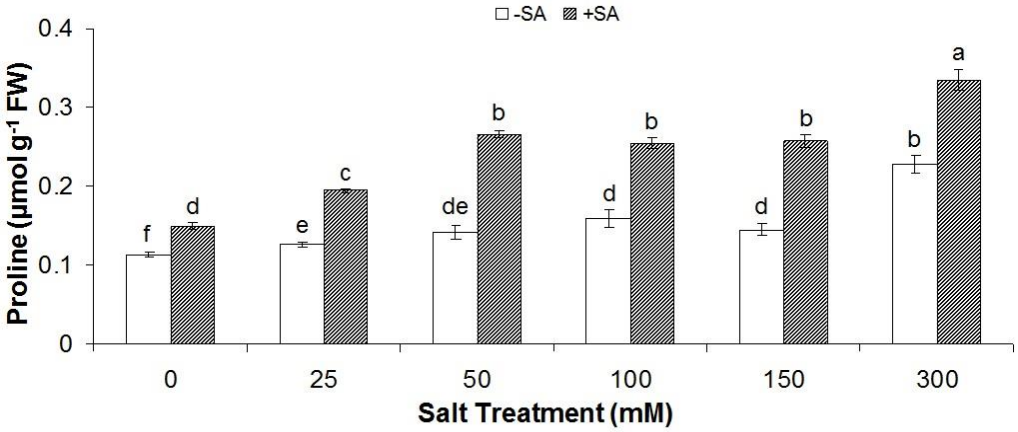
بازآرایی پروتئین‌ها و برقراری تعادل آنزیمی در طول تنش ایفا می‌کند (Hildebrandt, 2018). افزایش فعالیت‌های مرتبط با سنتز و تجزیه پروتئین‌ها تحت شرایط تنش گزارش شده است (Khedr *et al*., 2003; Hildebrandt *et al*., 2015; Huang and Jander, 2017; Hildebrandt, 2018). کاهش میزان پروتئین‌ها در گیاهچه‌های اسفرزه که با تجمع میزان آمینواسیدها همراه بود (شکل ۳)، بیانگر متابولیسم بالای پروتئین‌ها طی تنش شوری است. به‌هرحال، تأثیر سالیسیلیک اسید در افزایش میزان پروتئین‌ها در برخی از سطوح شوری که با کاهش تجمع آمینواسیدها همراه بوده است، نشان‌دهنده سنتز پروتئین‌های جدید و احتمالاً کمک به حفظ تعادل آنزیمی در طول تنش است.

میزان تجمع پرولین در گیاهچه‌های اسفرزه در پاسخ به تنش شوری همگام با سطح نمک افزایش پیدا کرد، به‌طوری‌که در همه سطوح شوری تغییر معنی‌داری از لحاظ آماری با نمونه شاهد مشاهده نشد (شکل ۴). پیش‌تیمار سالیسیلیک اسید سبب افزایش شدید تجمع پرولین در همه سطوح شوری در مقایسه با نمونه‌های پیش‌تیمارنشده گشت. الگوی افزایش پرولین در گیاهان پیش‌تیمارشده با سالیسیلیک اسید یک روند وابسته به سطح شوری را نشان داد، به‌طوری‌که میزان تجمع پرولین در نمونه‌های رشدیافته با سطوح شوری بالا، متوسط، پایین و یا صفر از لحاظ آماری کاملاً متفاوت بود (شکل ۴). در مورد نقش پرولین در تعدیل اسمزی و افزایش تحمل به تنش شوری در گیاهان مطالعات زیادی صورت گرفته است (Perez-Alfocea *et al*., 1993; Misra and Gupta, 2005; Misra and Saxena, 2009; Li *et al*., 2014). میزان تجمع پرولین تحت شرایط شوری با میزان تحمل گیاهان نسبت به شرایط تنش متناسب بوده است (Misra and Gupta, 2005). یکی از علل اصلی افزایش سطح پرولین در طول تنش شوری می‌تواند ناشی از تغییر در فعالیت‌های آنزیم‌های دخیل در بیوسنتز و یا تجزیه پرولین باشد. افزایش فعالیت آنزیم‌های دخیل در بیوسنتز پرولین و کاهش فعالیت آنزیم‌های تجزیه‌کننده آن مثل پرولین اکسیداز سبب تجمع پرولین در گیاهان مختلف از جمله عدس (Misra and Saxena, 2009)، ماش (Misra and Gupta, 2005) و خردل قهوه‌ای (Madan *et al*., 1995) تحت شرایط تنش شوری شده است. در مطالعه حاضر، افزایش چشمگیر میزان پرولین در نمونه‌های پیش‌تیمارشده با سالیسیلیک اسید و رشد یافته در سطوح مختلف شوری می‌تواند بیانگر استراتژی سازگاری این گیاهان برای مقابله با شرایط تنش باشد. چنین روندی در گیاه عدس تیمارشده با سالیسیلیک اسید تحت شرایط شوری مشاهده شده است (Misra and Saxena, 2009). با توجه به نتایج به دست آمده، به نظر می‌رسد که برهمکنش شوری و تیمار سالیسیلیک اسید دارای یک اثر افزایشی در تجمع پرولین بوده است. بنابراین، می‌توان نتیجه گرفت که پیش‌تیمار سالیسیلیک اسید احتمالاً از طریق تأثیر بر آنزیم‌های متابولیزه‌کننده پرولین سبب افزایش میزان پرولین در این گیاه شده و غلظت نمک بر میزان فعالیت این آنزیم‌ها توسط سالیسیلیک اسید مؤثر بوده است.



شکل ۳- اثر سطوح شوری مختلف بر میزان پروتئین محلول (A)، پروتئین کل (B) و آمینواسید آزاد (C) در گیاهچه‌های پیش‌تیمارشده و یا پیش‌تیمارنشده با هورمون سالیسیلیک اسید. مقادیر، میانگین سه تکرار ± SE است. حروف غیر یکسان بیانگر اختلاف معنی‌دار بین تیمارهای مختلف در سطح P<0.05 بر اساس آزمون دانکن است.

Figure 3- Effect of different salinity levels on the amount of soluble protein (A), total protein (B) and free amino acid (C) in seedlings pretreated or untreated with salicylic acid. Values are the mean of three replicates ± SE of three separate measurements. Different letters indicate significant differences between the various treatments at P<0.05 according to the Duncan test.



شکل ۴- اثر سطوح شوری مختلف بر میزان پرولین گیاهچه‌های پیش‌تیمارشده و یا پیش‌تیمارنشده با هورمون سالیسیلیک اسید. مقادیر، میانگین سه تکرار ± SE است. حروف غیریکسان بیانگر اختلاف معنی‌دار بین تیمارهای مختلف در سطح P<0.05 بر اساس آزمون دانکن است.

Figure 4- The effect of different salinity levels on the proline content of seedlings pretreated or untreated with salicylic acid. Data are the mean of three replicates ± SE of three separate measurements. Different letters indicate significant differences between the various treatments at P<0.05 according to the Duncan test.

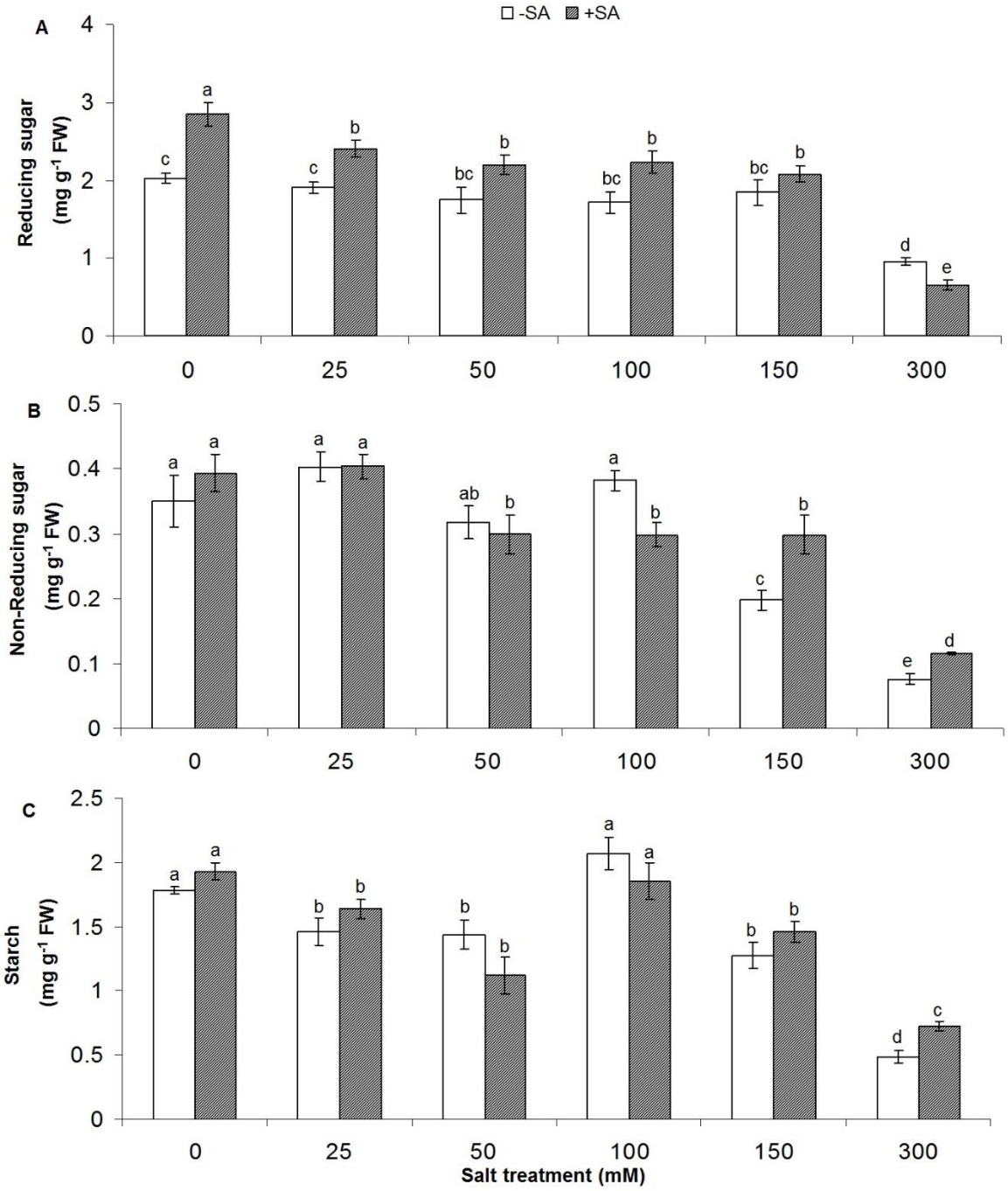
اثر شوری و پیش‌تیمار سالیسیلیک اسید بر میزان قندهای محلول و نشاسته

در گیاهچه‌های اسفرزه، غلظت قندهای احیایی در پاسخ به تیمار شوری در مقایسه با شاهد کاهش تدریجی پیدا کرد ولی این کاهش تا سطح شوری ۱۵۰ میلی‌مولار از نظر آماری معنی‌دار نبود (شکل ۵-A). پیش‌تیمار سالیسیلیک اسید سبب افزایش معنی‌دار تجمع قندهای احیایی در سطوح شوری صفر و ۲۵ میلی‌مولار شد، درحالی‌که تحت تیمارهای شوری متوسط، این افزایش به‌طور غیر معنی‌دار ادامه پیدا کرد. بااین‌حال، کاهش شدید قندهای احیایی در سطح شوری ۳۰۰ میلی‌مولار و در نتیجه‌ی پیش‌تیمار با سالیسیلیک اسید مشاهده شد (شکل ۵-A). میزان قندهای غیراحیایی در پاسخ به تنش شوری تا سطح ۱۰۰ میلی‌مولار در مقایسه با شاهد تغییری پیدا نکرد ولی در سطوح بالاتر نمک به‌شدت کاهش یافت (شکل ۵-B). پیش‌تیمار سالیسیلیک اسید تنها در سطوح شوری ۱۰۰ میلی‌مولار و بالاتر سبب تغییر در غلظت قندهای غیراحیایی شد، به‌طوری‌که در سطح ۱۰۰ میلی‌مولار باعث کاهش و در سطوح بالاتر سبب افزایش آن گشت (شکل ۵-B). تیمار شوری در همه سطوح نمک به جز ۱۰۰ میلی‌مولار موجب کاهش معنی‌دار تجمع نشاسته در مقایسه با شاهد شد (شکل ۵-C). به‌هرحال، پیش‌تیمار سالیسیلیک اسید تنها در شوری ۳۰۰ میلی‌مولار سبب افزایش تجمع نشاسته شد و در سایر سطوح نمک تأثیری بر میزان آن نداشته است. گزارش‌ها درباره تأثیر شوری بر میزان قندهای محلول در گیاهان مختلف متغیر است. به‌هرحال، عمده گزارش‌ها بیانگر افزایش غلظت قندهای محلول به‌ویژه قندهای احیایی در شرایط تنش شوری است (Flowers, 2004; Chaum *et al*., 2008; Yin *et al*., 2010). کاهش مشاهده شده در تجمع قندهای محلول و نشاسته می‌تواند ناشی از تأثیر منفی تنش شوری بر رنگیزه‌های فتوسنتزی و در نتیجه کاهش میزان

فتوسنتز باشد (Jalal *et al*., 2012). همچنین، باتوجه‌به تأثیر تنش شوری بر قطر روزنه‌ها و میزان ورود دی اکسید کربن (Sultana *et al*., 1999; Yusuf *et al*., 2008)، کاهش تجمع قندها و نشاسته که همراه با کاهش تولید زیست‌توده در گیاه است، توجیه‌پذیر می‌باشد. علاوه‌براین، کاهش قندهای محلول و نشاسته می‌تواند به تأمین اسکلت کربنی مورد نیاز برای تولید سایر ترکیبات اسمولیت و یا آنتی‌اکسیدانی مربوط باشد. باتوجه‌به اینکه الگوی تغییر در غلظت نشاسته گیاهچه‌های اسفرزه با قندهای غیراحیایی مرتبط بود (شکل ۵-B و C)، بنابراین انتظار می‌رود که کاهش نشاسته و قندهای غیراحیایی مثل ساکارز موجب افزایش قندهای احیایی شود (Mirshekari *et al*., 2017). به‌این‌ترتیب، علیرغم انطباق الگوی تغییر نشاسته و قندهای غیر احیایی، کاهش قندهای احیایی در طول تنش شوری می‌تواند به‌علت هدایت منابع کربنی برای تولید سایر اسمولیت‌ها از جمله پرولین و یا آنتی‌اکسیدان‌های آنزیمی و یا غیرآنزیمی باشد. شواهد تأییدکننده این پیشنهاد، افزایش تجمع پرولین در این گیاه تحت شرایط شوری است (شکل ۴). بااین‌حال، ارتباط بین الگوی تغییر نشاسته و قندهای غیراحیایی با کاهش تجمع قندهای احیایی در نمونه‌های پیش‌تیمارشده با سالیسیلیک اسید در پاسخ به سطح شوری بالا به‌خوبی مشاهده شد (شکل ۵). تیمار سالیسیلیک اسید احتمالاً با تغییر در نسبت منبع به مخزن از یک‌سو و با افزایش فعالیت آنزیم‌های سنتزکننده نشاسته از سوی دیگر، باعث افزایش میزان نشاسته در برگ و کاهش قندهای احیایی می‌شود. باتوجه‌به عدم تغییر و یا کاهش غلظت قندهای احیایی و برعکس، عدم تغییر و یا افزایش غلظت نشاسته و قندهای غیراحیایی در حضور سالیسیلیک اسید، می‌توان چنین نتیجه گرفت که این هورمون نقش مؤثری در مقاومت به تنش ایفا می‌کند. افزایش قندهای غیراحیایی و نشاسته در نمونه‌های پیش‌تیمارشده با سالیسیلیک اسید تحت شوری ۱۵۰ و ۳۰۰ میلی‌مولار که با عدم تغییر و یا کاهش قندهای احیایی همراه بود (شکل ۵)، می‌تواند تأییدکننده این مطلب باشد.

جمع‌بندی

نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که تنش شوری می‌تواند سبب کاهش شدید رشد، غلظت رنگیزه‌های فتوسنتزی، میزان قندهای محلول و پروتئین‌ها همراه با افزایش تجمع پرولین در گیاه اسفرزه شود. پرایمینگ بذرها با استفاده از سالیسیلیک اسید می‌تواند اثرات مخرب تنش شوری را تا حدودی کاهش داده و تحمل این گیاه را به تنش از طریق افزایش نسبی میزان کاروتنوئیدها و کلروفیل، بهبود بیوسنتز پروتئین‌ها و همچنین، تجمع بالای پرولین القا نماید. بنابراین، استفاده از این هورمون از طریق پیش‌تیمار بذرهای گیاه اسفرزه می‌تواند در کاهش اثرات تنش شوری در این گیاه مؤثر باشد.



شکل ۵- اثر سطوح شوری مختلف بر میزان قندهای احیایی (A)، قندهای غیراحیایی (B) و نشاسته (C) در گیاهچه‌های پیش‌تیمارشده و یا پیش‌تیمارنشده با هورمون سالیسیلیک اسید. مقادیر، میانگین سه تکرار ± SE است. حروف غیریکسان بیانگر اختلاف معنی‌دار بین تیمارهای مختلف در سطح P<0.05 بر اساس آزمون دانکن است.

Figure 5- Effect of different salinity levels on the amount of reducing sugars (A), non-reducing sugars (B) and starch (C) in seedlings pretreated or untreated with salicylic acid. Values are the mean of three replicates ± SE of three separate measurements. Different letters indicate significant differences between the various treatments at P<0.05 according to the Duncan test.

References

Ahmad, P. and Riffat, J. (2005) Effect of salt stress on growth and biochemical parameters of *Pisum sativum* L.. Archives of Agronomy and Soil Science 51: 665-672.

Ahmad, R., Hussain, S., Anjum, M. A., Khalid, M. F., Saqib, M., Zakir, I., Hassan, A., Fahad, S. and Ahmad, S. (2019) Oxidative stress and antioxidant defense mechanisms in plants under salt stress. In: plant abiotic stress tolerance (Eds. Hasanuzzaman, M., Hakeem, K., Nahar, K. and Alharby, H.) 191-205. Springer, Cham.

Alfocea, F. P., Estan, M. T., Caro, M. and Balarin, M. C. (1993) Response of tomato cultivars to salinity. Plant Soil 150: 203-211.

Antonic, D., Milosevic, S., Cingel, A., Lojic, M., Trifunovic-Momcilov, M., Petric, M., Subotic, A. and Simonovic, A. (2016) Effects of exogenous salicylic acid on *Impatiens walleriana* L. grown *in vitro* under polyethylene glycol-imposed drought. South African Journal of Botany 105: 226-233.

Arfan, M., Athar, H. R. and Ashraf, M. (2007) Does exogenous application of salicylic acid through the rooting medium modulate growth and photosynthetic capacity in two differently adapted spring wheat cultivars under salt stress. Journal of Plant Physiology 6: 685-694.

Arnon, D. (1949) Copper enzymes in isolated chloroplasts: polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. Plant Physiology 24: 1-15.

Ashraf, M. (2004) Some important physiological selection criteria for salt-tolerance in plants. Flora 199: 361-376.

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.

Borsani, O., Valpuesta, V. and Botella, M. A. (2001) Evidence for a role of salicylic acid in the oxidative damage generated by NaCl and osmotic stress in *Arabidopsis* seedlings. Plant Physiology 126: 1024-1034.

Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities utilizing the principle of protein dye binding. Analytical Biochemistry 72: 248-254.

Cha-um, S., Charoenpanich, A., Roytrakul, S. and Kirdmanee, C. (2008) Sugar accumulation, photosynthesis and growth of two indica rice varieties in response to salt stress. Acta Physiologiae Plantarum 31: 477-486.

Cheng, X., Deng, G., Su, Y., Liu, J. J., Yang, Y. and Du, G. H. (2016) Protein mechanisms in response to NaCl-stress of salt-tolerant and salt-sensitive industrial hemp based on iTRAQ technology. Industrial Crops and Products 83: 444-452.

Dong, C. J., Wang, X. L. and Shang, Q. M. (2011) Salicylic acid regulates sugar metabolism that confers tolerance to salinity stress in cucumber seedlings. Scientia Horticulturae 129: 629-636.

Egamberdieva, D., Wirth, S., Bellingrath-Kimura, S. D., Mishra, J. and Arora, N. K. (2019) Salt tolerant plant growth promoting rhizobacteria for enhancing crop productivity of saline soils. Frontiers in Microbiology 10: 2791.

El-Bassiouny, H. M. and Bakheta, M. A. (2005) Effect of salt stress on relative water content, lipid peroxidation, polyamines, amino acids and ethylene of two wheat cultivars. International Journal of Agriculture and Biology 7: 363-365.

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

Eraslan, F., Inal, A., Gunes, A. and Alpaslan, M. (2007) Impact of exogenous salicylic acid on the growth, antioxidant activity and physiology of carrot plants subjected to combined salinity and boron toxicity. Scientia Horticulturae 113: 120-128.

Farahbakhsh, H. and Pasandi pout, A. (2012) Alleviation of salinity stress in Isabgol (*Plantago ovata*) by hormonal priming with salicylic acid. International Journal of Agriculture and Crop Sciences 3: 737-744.

Farhadi, N. and Ghassemi-Golezani, K. (2020) Physiological changes of *Mentha pulegium* in response to exogenous salicylic acid under salinity. Scientia Horticulturae 267: 109325.

Flowers, T. J. (2004) Improving crop salt tolerance. Journal of Experimental Botany 55: 307-319.

Ghassemi-Golezani, K., Chadordooz-Jeddi, A. and Zafarani-Moattar, P. (2011) Influence of salt-priming on mucilage yield of isabgol (*Plantago ovata* Forsk) under salinity stress. Journal of Medicinal Plants Research 5: 3236-3241.

Gunes, A., Anal, A., Alpaslan, M., Eraslan, F., Bagci, E. G. and Cick, N. (2007) Salicylic acid induced changes on some physiological parameters symptomatic for oxidative stress and mineral nutration in maize (*Zea mays* L.) grown under salinity. Journal of Plant Physiology 164: 728-736.

Handel, E. V. (1968) Direct microdetermination of sucrose. Analytical Biochemistry 22: 280-283.

Hanson, A. D. (1973) The effects of imbibition drying treatments on wheat seeds. New Phytologist 72: 1063-1073.

Hildebrandt, T. M. (2018) Synthesis versus degradation: directions of amino acid metabolism during *Arabidopsis* abiotic stress response. Plant Molecular Biology 98: 121-135.

Hildebrandt, T. M., Nunes Nesi, A., Araujo, W. L. and Braun, H. (2015) Amino acid catabolism in plants. Molecular Plant 8: 1563-1579.

Horvath, E., Csiszár, J., Gallé, A., Poór, P., Szepesi, A. and Tari, I. (2015) Hardening with salicylic acid induces concentration-dependent changes in abscisic acid biosynthesis of tomato under salt stress. Journal of Plant Physiology 183: 54-63.

Huang, T. and Jander, G. (2017) Abscisic acid-regulated protein degradation causes osmotic stress-induced accumulation of branchedchain amino acids in *Arabidopsis thaliana*. Planta 246: 737-747.

Hussein, M. M., Balbaa, L. K. and Gaballah, M. S. (2007) Salicylic acid and salinity effects on growth of maize plants. Research Journal of Agriculture and Biological Sciences 3: 321-328.

Jalal, R. S., Moftah, A. E. and Bafeel, S. O. (2012) Effect of salicylic acid on soluble sugars, proline and protein patterns of shara (*Plectranthus tenuiflorus*) plants grown under water stress conditions. International Research Journal of Agricultural Science and Soil Science 2: 400-407.

Jayakannan, M., Bose, J., Babourina, O., Rengel, Z. and Shabala, S. (2015) Salicylic acid in plant salinity stress signaling and tolerance. Plant Growth Regulation 76: 25-40.

Khan, W., Prithviraj, B. and Smith, A. (2003) Photosynthetic responses of corn and soybean to foliar application of salicylates. Journal of Plant Physiology 160: 485-492.

Khedr, A. H. A., Abbas, M. A., Wahid, A. A. A., Quick, W. P. and Abogadallah, G. M. (2003) Proline induces the expression of salt-stress-responsive proteins and may improve the adaptation of *Pancratium maritimum* L. to salt-stress. Journal of Experimental Botany 54: 2553-2562.

Li, T., Hu, Y. Y., Du, X. H., Tang, H., Shen, C. H. and Wu, J. S. (2014) Salicylic acid alleviates the adverse effects of salt stress in *Torreya grandis* cv. *merrillii* seedlings by activating photosynthesis and enhancing antioxidant systems. PLoS One 9, e109492.

Lichtenthaler, H. K. and Buschmann, C. (2001) Chlorophylls and carotenoids: measurement and characterization by UV-VIS spectroscopy. Current Protocols in Food Analytical Chemistry F4.3.1– F4.3.8.

Ma, X., Zheng, J., Zhang, X., Hu, Q. and Qian, R. (2017) Salicylic acid alleviates the adverse effects of salt stress on *Dianthus superbus* (Caryophyllaceae) by activating photosynthesis, protecting morphological structure, and enhancing the antioxidant system. Frontiers in Plant Science 8: 600.

Madan, S., Nainawatte, H. S., Jain, R. K. and Choudhury, J. B. (1995) Proline and proline metabolizing enzymes *in vitro* selected NaCl tolerant *Brassica juncea* under salt stress, Annals of Botany 76: 51-57.

Markwell, M. A. K., Hass, S. M., Tolbert N. E. and Bieber, L. L. (1981) Protein determination in membrane and lipoprotein samples: manual and automated procedures. Methods in Enzymology 72: 296-303.

McCready, R. M., Guggolz, J., Silviera, V. and Owens, H. S. (1950) Determination of starch and amylose in vegetables. Analytical Chemistry 22: 1156-1158.

Methenni, K., Mariem, B. A., Issam, N., Abderrazek, S., Wided, B. A., Mokhtar, Z. and Nabil, B. Y. (2018) Salicylic acid and calcium pretreatments alleviate the toxic effect of salinity in the Oueslati olive variety. Scientia Horticulturae 233: 349-358.

Miller, G. L. (1959) Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars. Analytical Chemistry 31: 426-428.

Mirshekari, M., Einali, A. and Valizadeh, J. (2017) Physiological and biochemical responses of *Hibiscus sabdariffa* to drought stress in the presence of salicylic acid. Iranian Journal of Plant Biology 9: 21-38 (in Persian).

Mishra, A., Mandoli, A. and Jha, B. (2008) Physiological characterization and stress-induced metabolic responses of *Dunaliella salina* isolated from salt pan. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology 35: 1093-1101.

Misra, N. and Dwivedi, U. N. (1990) Nitrogen assimilation in germinating *Phaseolus aureus* seeds under saline stress. Journal of Plant Physiology 135: 719-724.

Misra, N. and Gupta, A. K. (2005) Effect of salt stress on proline metabolism in two high yielding genotypes of green gram. Plant Science 169: 331-339.

Misra, N. and Saxena, P. (2009) Effect of salicylic acid on proline metabolism in lentil grown under salinity stress. Plant Science 177: 181-189.

Misra, N., Gupta, A. K. and Dwivedi, U. N. (2006) Changes in free amino acids and stress protein synthesis in two genotypes of green gram under salt stress. Journal of Plant Sciences 1: 56-66.

Mutlu, S., Karadagoglu, O., Atici, O., Tasgin, E. and Nalbantoglu, B. (2013) Time-dependent effect of salicylic acid on alleviating cold damage in two barley cultivars differing in cold tolerance. Turkish Journal of Botany 37: 343-349.

Nounjan, N., Nghia, P. T. and Theerakulpisut, P. (2012) Exogenous proline and trehalose promote recovery of rice seedlings from salt-stress and differentially modulate antioxidant enzymes and expression of related genes. Journal of Plant Physiology 169: 596-604.

Omokolo, N. D., Tsala, N. G. and Djocgoue, P. F. (1996) Changes in carbohydrate, amino acid and phenol content in cocoa pods from three clones after infection with *Phytophthora megakarya* Bra. *et* Grif. Annals of Botany 77: 153-158.

Patel, M. K., Bhakti, T., Avinash, M. and Jha, B. (2018) Physicochemical characterization, antioxidant and anti-proliferative activities of a polysaccharide extracted from psyllium (*P. ovata*) leaves. International Journal of Biological Macromolecules 118: 976-987.

Pérez-Alfocea, F., Estañ, M. T., Santa Cruz, A. and Bolarín, M. C. (1993) Effects of salinity on nitrate, total nitrogen, soluble protein and free amino acid levels in tomato plants. Journal of Horticultural Science 68: 1021-1027.

Poor, P., Borbely, P., Bodi, N., Bagyanszki, M. and Tari, I. (2019) Effects of salicylic acid on photosynthetic activity and chloroplast morphology under light and prolonged darkness. Photosynthetica 57: 367-376.

Porra, R. J., Schafer, W., Cmiel, E., Katheder, I. and Scheer, H. (1994) The derivation of the formyl-group oxygen of chlorophyll b in higher plants from molecular oxygen. Achievement of high enrichment of the 7-formyl-group oxygen from $18O_2$ in greening maize leaves. European Journal of Biochemistry 219: 671-679.

Rivas-San Vicente, M. and Plasencia, J. (2011) Salicylic acid beyond defence: its role in plant growth and development. Journal of Experimental Botany 62: 3321-3338.

Roychoudhury, A., Ghosh, S., Paul, S., Mazumdar, S., Das, G. and Das, S. (2016) Pre-treatment of seeds with salicylic acid attenuates cadmium chloride-induced oxidative damages in the seedlings of mungbean (*Vigna radiata* L. Wilczek). Acta Physiologiae Plantarum 38(11): 1-18.

Sakhabutdinova, A. R., Fatkhutdinova, D. R., Bezrukova, M. V. and Shakiova, F. M. (2003) Salicylic acid prevents the damaging action of stress factors on wheat plants. Bulgarian Journal of Plant Physiology 29: 314-319.

Stone, S. L. and Gifford, D. J. (1997) Structural and biochemical changes in loblolly pine (*Pinus taeda* L.) seeds during germination and early seedling growth: I. Storage protein reserves. International Journal of Plant Science 158: 727-737.

Sultana, N., Ikeda, T. and Itoh, R. (1999) Effect of NaCl salinity on photosynthesis and dry matter accumulation in developing rice grains. Environmental and Experimental Botany 42: 211-220.

Szepesi, A., Poor, P., Gemes, K., Horvath, E. and Tari, I. (2008) Influence of exogenous salicylic acid on antioxidant enzyme activities in the roots of salt stressed tomato plants. Acta Biologica Szegediensis 52: 199-200.

Turkan, I. and Demiral, T. (2009) Recent developments in understanding salinity tolerance. Environmental and Experimental Botany 67: 2-9.

Yemm, E. W., Cocking, E. C. and Ricketts, R. E. (1955) The determination of amino-acids with ninhydrin. Analyst 80: 209-214.

Yin, Y. G., Kobayashi, Y., Sanuki, A., Kondo, S., Fukuda, N., Ezura, H., Sugaya. S. and Matsukura, C. (2010) Salinity induces carbohydrate accumulation and sugar - regulated starch biosynthetic genes in tomato (*Solanum lycopersicum* L. cv. 'Micro - Tom') fruits in an ABA - and osmotic stress - independent manner. Journal of Experimental Botany 61: 563-574.

Yusuf, M., Hasan, S. A., Ali, B., Hayat, S., Fariduddin, Q. and Ahmad, A. (2008) Effect of salicylic acid on salinity-induced changes in *Brassica juncea*. Journal of Integrative Plant Biology 50: 1096-1102.

Zhang, S., Gao, J., Song, J., Zhang, S. G., Gao, J. Y. and Song, J. Z. (1999) Effects of salicylic acid and aspirin on wheat seed germination under salt stress. Plant Physiology 35: 29-32.