

## مطالعه تغییرات فیزیولوژیکی پرتقال تامسون ناول در پاسخ به محلول پاشی برگی جاسمونیک اسید تحت شرایط تنش خشکی

کتایون دلفانی<sup>۱</sup>، محمود اسدی<sup>۱\*</sup>، بهروز گلچین<sup>۲</sup>، بابک باباخانی<sup>۱</sup> و رقیه رازقی جدید<sup>۱</sup>

<sup>۱</sup> گروه تخصصی علوم گیاهی، دانشکده علوم زیستی، واحد تنکابن، دانشگاه آزاد اسلامی، تنکابن، ایران

<sup>۲</sup> پژوهشکده مرکبات و میوه‌های نیمه گرمسیری، مؤسسه تحقیقات علوم باغبانی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، رامسر

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۰۸/۱۱، تاریخ پذیرش نهایی: ۱۳۹۹/۰۹/۲۲)

### چکیده

به منظور ارزیابی تأثیر غلظت‌های مختلف جاسمونیک اسید بر تغییرات فیزیولوژیکی پرتقال تامسون ناول تحت تنش خشکی آزمایشی به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار انجام شد. تیمارهای آزمایش شامل سه سطح تنش خشکی شامل ۱۰۰ درصد ظرفیت زراعی (به عنوان شاهد)، ۷۵ درصد ظرفیت زراعی (تنش خشکی ملایم) و ۵۰ درصد ظرفیت زراعی (تنش خشکی شدید) و نیز سه سطح محلول پاشی صفر، ۱۰۰ و ۲۰۰ میکرومولار جاسمونیک اسید بودند. نتایج نشان داد که تنش خشکی به طور معنی داری محتوای نسبی آب، پتانسیل آب گیاه، شاخص سطح برگ، هدایت روزنه‌ای و کلروفیل کل برگ پرتقال تامسون ناول را کاهش داد، در حالی که میزان نشت یونی، مالون دی آلدئید، قندهای محلول، پرولین و فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانی در شرایط تنش خشکی افزایش یافتند. همچنین مشخص شد که محلول پاشی برگی جاسمونیک اسید توانست با حفظ بهتر وضعیت آبی برگ (محتوای نسبی آب برگ و پتانسیل آب گیاه)، افزایش شاخص سطح برگ، هدایت روزنه‌ای، حفظ بهتر پایداری غشاء سلولی (با کاهش نشت یونی و مالون دی آلدئید)، حفظ کلروفیل کل در حد مطلوب، افزایش میزان محلول‌های سازگار (قندهای محلول و پرولین) و همچنین افزایش فعالیت آنزیم‌های کاتالاز، سوپراکسید دیسموتاز، آسکوربات پراکسیداز و پراکسیداز، اثرات منفی تنش خشکی را کاهش دهد. در نهایت، کاربرد محلول پاشی برگی جاسمونیک اسید به ویژه در غلظت ۱۰۰ میکرومولار برای کاهش اثرات منفی تنش خشکی در پرتقال تامسون ناول پیشنهاد می‌گردد.

واژه‌های کلیدی: پایداری غشاء، پتانسیل آب، محلول‌های سازگار، کاتالاز، هدایت روزنه‌ای

### مقدمه

و از نظر عملکرد (۲۲۲۶۹۷ کیلوگرم در هکتار) در رده پنجم جهانی قرار دارد (FAO, 2020). در مجموع، مرکبات از جمله میوه‌هایی هستند که برای رشد و تولید اقتصادی نیاز به آب کافی دارند. در اثر کمبود آب، درختان مرکبات دچار تنش کم آبی می‌شوند که با کاهش رشد و تولید میوه همراه است. کمبود منابع آبی فقط مربوط به مناطق خشک و مستعد

بر اساس جدیدترین آمارنامه وزارت جهاد کشاورزی، در سال ۱۳۹۷ بیشترین میزان تولید از بین محصولات باغبانی مربوط به میوه پرتقال با تولید حدود ۳/۱ میلیون تن و سهم ۱۵/۱ درصد از کل میزان تولید محصولات باغبانی است (بی‌نام، ۱۳۹۷). کشورمان از نظر میزان تولید (۶۱۶۸۶۴ تن) دارای رتبه چهارم

خشکسالی نیست بلکه در مناطق پرباران نیز وجود دارد. بالابودن بارش سالانه در شمال کشور چنین وانمود می‌کند که باغ‌های مرکبات آن نیاز به آبیاری ندارند ولی پراکنش زمانی بارش به گونه‌ای است که تنها حداکثر ۳۵ درصد آن در فصل تشکیل و رشد میوه رخ می‌دهد. این میزان بارش به استناد سند ملی آب کشور برای تأمین نیاز آبی درختان مرکبات کافی نیست و باغ‌ها برای داشتن عملکرد اقتصادی نیاز به آبیاری دارند، زیرا مرکبات در برخی از دوره رشد، به‌ویژه مراحل گلدهی و تشکیل میوه، به کم‌آبی حساس‌اند. همچنین به دلیل توزیع نامناسب مکانی منابع آب، ذخیره، تأمین و انتقال آب برای بسیاری از باغداران منطقه مذکور پرهزینه و غیرقابل اجرا است (عبادی و همکاران، ۱۳۹۴).

به‌طورکلی، تنش خشکی شایع‌ترین تنش محیطی و یکی از مهم‌ترین عوامل محدودکننده تولید محصولات کشاورزی در سرتاسر جهان است. تنش خشکی باعث کاهش محتویات آب، تضعیف پتانسیل آب برگ و نزول فشار آماس، انسداد روزنه و کاهش بزرگ‌شدن سلول و رشد آن می‌شود. همچنین تنش شدید آب می‌تواند توقف فتوسنتز (به دلیل کاهش سطح برگ و تخریب کلروفیل)، اختلال در فرآیندهای طبیعی متابولیسم سلولی و سرانجام مرگ گیاه را به دنبال داشته باشد. غشاء سلولی از نخستین اندام‌هایی است که تحت شرایط تنش، آسیب می‌بیند و تراوایی آن افزایش یافته و نشت یونی از سلول باعث مرگ آن می‌گردد. پایداری غشاء سلولی می‌تواند به‌عنوان معیاری از تحمل به تنش خشکی در نظر گرفته شود (Hasanuzzaman and Tanveer, 2020; Gupta et al., 2020).

تنش خشکی باعث ایجاد اختلال در فرآیندهای فیزیولوژیکی مانند انتقال آب و مواد غذایی، حرکت روزنه‌ای، تنفس و انتقال اسمولیت‌ها در گیاهان می‌شود. علاوه بر این، در اثر تنش کم‌آبی مقدار زیادی گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) در کلروپلاست و میتوکندری تجمع می‌یابند که موجب ایجاد تنش اکسیداتیو می‌شوند. این مولکول‌ها عموماً شامل رادیکال‌های آنیونی سوپراکسید، رادیکال‌های هیدروکسیل و پراکسید هیدروژن هستند. سلول‌های گیاهی جهت کاهش اثرات منفی

انواع ROS‌های تولیدشده در سلول از سازوکارهای ویژه‌ای از جمله سیستم‌های آنتی‌اکسیدانی برخوردار هستند. سیستم آنتی‌اکسیدانی شامل عوامل آنزیمی و غیرآنزیمی است، از جمله آنزیم‌ها می‌توان کاتالاز (CAT)، پراکسیداز (POD)، آسکوربات پراکسیداز (APX) و سوپراکسید دیسموتاز (SOD) را نام برد (Kapoor et al., 2020; Gupta et al., 2020). در صورتی که شدت تنش بیش از حد تحمل گیاه باشد بین رادیکال‌های آزاد تولیدی و عوامل آنتی‌اکسیدانی عدم توازن ایجاد می‌شود که منتج به افزایش اکسیداسیون پروتئین‌ها، لیپیدهای غشائی و بالا رفتن تولید مالون دی‌آلدئید (MDA) شده و در نهایت، پتانسیل فتوسنتزی گیاه تحت تأثیر قرار می‌گیرد. در شرایط تنش خشکی، گیاه به‌منظور حفظ تعادل اسمزی خود انواع خاصی از متابولیت‌های سازگار آلی نظیر پرولین و قندهای محلول را تولید کرده و در سیتوپلاسم تجمع می‌دهد. به این عمل تنظیم اسمزی گفته می‌شود که می‌تواند نقش مهمی در مقاومت و پایداری سلول در مقابل تنش خشکی ایفا کند (Kapoor et al., 2020; Hasanuzzaman and Tanveer, 2020).

در بررسی صورت‌گرفته توسط Dos Santos و همکاران (۲۰۱۹) مشخص شد که اعمال تنش خشکی در مرکبات باعث کاهش رنگدانه‌های کلروپلاستی گردید که این امر خود باعث کاهش سرعت فتوسنتز گردید. آن‌ها همچنین نشان دادند که در این شرایط فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی مانند کاتالاز، سوپراکسید دیسموتاز و آسکوربات پراکسیداز افزایش پیدا کرد. در آزمایش دیگری رفیعی‌راد و همکاران (۱۳۹۷) گزارش نمودند که اعمال تنش خشکی باعث نشت یونی و میزان پرولین و همچنین کاهش میزان کلروفیل، محتوای نسبی آب برگ و پتانسیل آب برگ در نارنگی پیچ گردید.

گیاهان پس از درک شرایط تنش، پیام‌هایی را به جریان‌های مختلف متابولیک سلولی می‌فرستند تا ژن‌های دفاعی فعال شوند. مولکول‌های زیادی از جمله جاسمونیک اسید به‌عنوان انتقال‌دهنده پیام در شرایط تنش معرفی شده‌اند. جاسمونیک اسید و متیل استر آن (متیل جاسمونات)، ژن‌های دخیل در عکس‌العمل گیاهان به تنش‌های زیستی و غیرزیستی را القاء

گیاهان مختلف باعث رشد بهینه و عملکرد مناسب گیاهان مختلف گردد.

با توجه به مطالب عنوان شده، درک مکانیسم‌های مقاومت گیاهان نسبت به این تنش در سطوح مختلف فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی می‌تواند راهی در جهت افزایش عملکرد گیاهان در شرایط نامطلوب محیطی باشد. بنابراین در بررسی حاضر سعی شده است تا اثرات محلول‌پاشی برگی جاسمونیک اسید بر تغییرات فیزیولوژیکی شامل تغییرات وضعیت آبی برگ (محتوای نسبی آب و پتانسیل آب)، سطح برگ، هدایت روزنه‌ای، میزان پایداری غشاء سلولی (نشت یونی و مالون دی‌آلدئید)، کلروفیل کل، محلول‌های سازگار (قندهای محلول و پرولین) و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی (کاتالاز، سوپراکسید دیسموتاز، آسکوربات پراکسیداز و پراکسیداز) پرتقال تامسون ناول تحت شرایط تنش خشکی مورد ارزیابی قرار گیرد.

#### مواد و روش‌ها

**محل انجام آزمایش و مواد گیاهی:** پژوهش حاضر در پژوهشکده مرکبات و میوه‌های نیمه‌گرمسیری کشور در شهر رامسر به طول جغرافیایی ۵۰ درجه و ۴۰ دقیقه شرقی و عرض جغرافیایی ۳۶ درجه و ۵۲ دقیقه شمالی با ارتفاع ۵ متر از سطح دریا و حداقل و حداکثر دمای آن به ترتیب ۲ و ۳۰ درجه سانتی‌گراد، در سال ۱۳۹۸ انجام شد. به این منظور ابتدا نهال‌های پنج ساله پرتقال تامسون ناول (*Citrus sinensis* cv. Thomson Navel) روی پایه سیتروملو انتخاب و در داخل گلدان‌های پلی‌اتیلنی پرشده با خاک منطقه قرار داده خواهند شد. نهال‌های انتخاب شده به صورت یکنواخت و یکدست بوده و دارای ارتفاع متوسط  $10 \pm 180$  و قطر متوسط  $2 \pm 0$  سانتی‌متر بودند. در تمام طول دوره آزمایش که مدت آن سه ماه (فروردین، اردیبهشت و خرداد) بود، گلدان‌ها در فضای آزاد و در شرایط طبیعی محیط (با میانگین دمای هوای بین ۲۰ تا ۳۲ درجه سانتی‌گراد و رطوبت نسبی ۸۰ تا ۹۰ درصد) قرار داده شدند.

می‌کنند. آن‌ها از طریق فعال کردن فرآیندهایی شامل بسته شدن روزنه‌ها، تنظیم هدایت آبی و تنظیم فرآیندهای توسعه‌ای مؤثر بر مقاومت به تنش درگیر هستند (Wang et al., 2020; Gomi et al., 2020).

پرهزینه بودن کارهای اصلاحی، وجود ارقام متنوع کم برای هر منطقه و شرایط آب‌وهوایی فرق می‌کند، دخالت ژن‌های متعدد و اثر افزایشی آن‌ها در پاسخ به تنش خشکی باعث می‌شود که اصلاح رقم برای مناطق خشک به کندی انجام شود. بنابراین، استفاده از روش‌های جایگزین مانند کاربرد تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی در شرایط بروز تنش‌های محیطی می‌تواند توجه‌پذیر باشد (وهبی و همکاران، ۱۳۹۶). از طرف دیگر، امروزه استفاده از مواد طبیعی که مخاطرات محیطی کمتری نیز دارند در جهت افزایش مقاومت به انواع مختلف تنش‌های محیطی رو به افزایش است که یکی از این مواد طبیعی جاسمونیک اسید است. جاسمونیک اسید از جمله مواد تنظیم‌کننده رشد گیاهی است که از طریق افزایش ذخیره کلروفیل و در نتیجه افزایش مقدار فتوسنتز خالص، موجب تحمل به تنش خشکی در گیاه می‌شود. تحت شرایط تنش خشکی، جاسمونیک اسید باعث افزایش محتوای نسبی آب برگ و نیز افزایش میزان اسید آبسزیک و اسمولیت‌های داخلی گیاه می‌شود. این ترکیب همچنین در افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی نظیر سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز، پراکسیداز، گلوکاتایون ردوکتاز، گلوکاتایون پراکسیداز و آسکوربات نقش دارد (خادمیان و همکاران، ۱۳۹۸؛ Wasternack et al., 2014; Gomi et al., 2020). در مطالعه صورت گرفته توسط Siddiqi و Husen (۲۰۱۹) نشان داده شده که تیمار جاسمونیک اسید در شرایط بروز تنش‌های محیطی از جمله تنش خشکی می‌تواند با حفظ بهتر پتانسیل آب گیاه (با تولید محلول‌های سازگار و تنظیم اسمزی)، حفظ بازدهی فتوسنتز در سطح بهینه (با جلوگیری از تجزیه رنگدانه‌های فتوسنتزی و تنظیم هدایت روزنه‌ای)، حفظ پایداری غشاء سلولی (با جلوگیری از پراکسیده شدن لیپیدها) و افزایش فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی سلولی (سیستم‌های آنتی‌اکسیدانی آنزیمی و غیرآنزیمی) در

**اعمال تیمارها:** در بررسی حاضر تیمارهای مورد مطالعه شامل جاسمونیک اسید در سه سطح (صفر، ۱۰۰ و ۲۰۰ میکرومولار) و تیمار تنش خشکی در سه سطح آبیاری در حد ۱۰۰ درصد ظرفیت زراعی (Field capacity, FC) (شاهد یا بدون تنش خشکی)، ۷۵ درصد ظرفیت زراعی (تنش خشکی ملایم) و ۵۰ درصد ظرفیت زراعی (تنش خشکی شدید) پس از رشد کافی گیاهان از اواخر خردادماه تا اواخر شهریور اعمال گردید. تعیین میزان رطوبت خاک در حد ظرفیت زراعی (رطوبت ظرفیت زراعی مقدار رطوبتی است که یک خاک اشباع شده پس از خارج شدن آب ثقلی در خود نگه می‌دارد، که تابعی از بافت و ساختمان خاک است) به روش زیر صورت گرفت:

تعدادی از گلدان‌های حاوی بستر مورد آزمایش، اشباع از آب گردید، به نحوی که آب از ته گلدان‌ها خارج شد. جهت جلوگیری از تبخیر، سطح گلدان‌ها با فویل آلومینیومی پوشانده شد و در فواصل زمانی ۲۴ ساعت از خاک گلدان‌ها نمونه‌هایی تهیه شد. ابتدا وزن تر (FW) نمونه‌ها یادداشت شد و سپس برای تعیین وزن خشک (DW)، نمونه‌ها به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۱۰۵ الی ۱۱۰ درجه سانتی‌گراد در آون قرار داده شدند. در نهایت ظرفیت زراعی (FC) با رابطه زیر محاسبه شد:

$$FC = [ (FW - DW) / DW ] \times 100$$

برای محاسبه میزان آب مورد نیاز هر گلدان از روش توزین گلدان‌ها و تعیین میانگین آن به عنوان آب مصرفی تیمارها، استفاده گردید. در طول دوره رشد، هر روزه کلیه گلدان‌ها با توجه به تغییرات دمای هوا، با ترازوی دیجیتالی حساس توزین گردید و هر گلدان در وزن تیمار مربوط ثابت نگه داشته شد.

به منظور اعمال تیمار محلول‌پاشی جاسمونیک اسید، ابتدا جاسمونیک اسید (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) در اتانول ۹۵ درصد حل شده و سپس براساس غلظت‌های مورد نظر در پژوهش، با آب مقطر مخلوط شده و توسط سم‌پاش پستی ۲۰ لیتری، در چهار نوبت هر سه هفته یکبار روی برگ‌ها اسپری گردید. به منظور اینکه ترکیبات

محلول‌پاشی شده به سطح برگ کاملاً بچسبد، در تمامی تیمارها از چند قطره توین ۲۰ (Tween 20) با غلظت ۰/۰۵ درصد به عنوان یک چسباننده آلی استفاده شد. در پایان آزمایش نمونه‌های برگ جمع‌آوری شده و برای اندازه‌گیری صفات مورد ارزیابی قرار گرفتند.

#### اندازه‌گیری صفات، محتوای نسبی آب برگ (Relative

**Water Content, RWC):** برای این منظور همچون روش Wahbi و همکاران (۲۰۰۵) نمونه‌های برگ از جهت‌های مختلف هر نهال جدا و با پوشش پاکت پلاستیکی و استقرار آن در یک محفظه سرد به آزمایشگاه منتقل می‌شد. در آزمایشگاه پس از اندازه‌گیری وزن تر و استقرار آن‌ها به مدت ۲۴ ساعت در یک محفظه تاریک وزن آماس یافته (پلیده) اندازه‌گیری می‌شد. سپس برای رسیدن به وزن خشک، به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد در آون نگهداری و سرانجام محتوای نسبی آب از رابطه زیر تعیین شد:

$$RWC = (FW - DW) / (TW - DW)$$

که در آن FW، TW و DW به ترتیب وزن تر، پلیده و خشک برگ (گرم) است.

#### پتانسیل آب گیاه: برای اندازه‌گیری پتانسیل آب گیاه پس

از انتخاب نمونه‌های برگ بر روی نهال‌ها، مطابق روش Turner (۱۹۸۱) و Ortuno و همکاران (۲۰۰۶)، نمونه‌ها با پاکت پلاستیکی مشکی کوچک با روکش ورق نازک آلومینیومی پوشیده می‌شد. یک تا دو ساعت بعد، برگ‌ها از نهال جدا و در مدت کمتر از ۲۰ ثانیه به محفظه دستگاه اتافک فشار (Scholander pressure bomb, Soil Moisture Equipment Corp., USA) منتقل و پتانسیل آب گیاه اندازه‌گیری شد.

#### شاخص سطح برگ: شاخص سطح برگ طبق رابطه زیر

تعیین گردید (Rasheed et al., 2003):

$$LAI = LA / A$$

در این رابطه LA: مجموع مساحت برگ اندازه‌گیری شده با استفاده از دستگاه سطح‌سنج برگ (مدل Area meter AM300، ADC, BioScientific Ltd.) و A: زمین اختصاص یافته به هر گیاه است.

#### هدایت روزنه‌ای: اندازه‌گیری هدایت روزنه‌ای چهار تا

درون لوله آزمایش درپوش‌دار محتوی ۱۰ میلی‌لیتر آب‌مقطر قرار داده و پس از ۲۴ ساعت شیکر در دمای آزمایشگاه، میزان نشت یونی مرحله اول اندازه‌گیری شد (EL1). در ادامه جهت اندازه‌گیری نشت مرحله دوم (EL2) لوله‌های آزمایش محتوی آب‌مقطر و قطعات برگ‌گی بکار گرفته‌شده برای نشت مرحله اول اتوکلاو گردید (در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ دقیقه). پس از خروج (از اتوکلاو) مجدداً لوله‌های آزمایش محتوی آب‌مقطر و قطعات برگ‌گی به مدت ۱۲ ساعت شیکر و سپس هدایت الکتریکی مرحله دوم ثبت و بر مبنای فرمول ارائه‌شده نشت یونی محاسبه شد (Sullivan and Ross, 1979):

$$\%EL = (EL1 / EL2) \times 100$$

**آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی:** به منظور استخراج و اندازه‌گیری

آنزیم‌ها، برگ‌های فریزشده در هاون چینی ریخته و نیتروژن مایع به آن اضافه شد. سپس برگ‌ها به‌خوبی کوبیده شد تا کاملاً خرد شوند. ۰/۵ گرم از پودر برگ آسیاب‌شده به میکروتیوب‌های ۲ میلی‌لیتری منتقل شدند و یک میلی‌لیتر از بافر استخراج به آن اضافه و به مدت ۳۰ ثانیه ورتکس شدند. سپس به مدت ۱۵ دقیقه با ۱۴۰۰۰ دور در دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد، سانتریفوژ شدند. پس از اتمام سانتریفوژ عصاره‌های رویی با استفاده از سمپلر برداشته شدند و به میکروتیوب‌های ۱/۵ میلی‌لیتری منتقل شدند و دوباره به مدت ۱۰ دقیقه با ۱۴۰۰۰ دور در دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد، سانتریفوژ شدند. پس از اتمام سانتریفوژ، عصاره‌های رویی با استفاده از سمپلر برداشته و به میکروتیوب‌هایی با همان حجم منتقل شدند. میکروتیوب‌های حاوی عصاره‌ها در زمان سایش برگ‌ها و سانتریفوژ نمونه‌های دیگر در داخل ظرف یخ نگهداری شدند و در صورت عدم استفاده به فریزر ۸۰- درجه سانتی‌گراد انتقال داده شدند (Beauchamp and Fridovich, 1971). از این عصاره‌ها برای فعالیت آنزیم‌های کاتالاز، سوپراکسید دیسموتاز، آسکوربات پراکسیداز و پراکسیداز استفاده شد.

**سوپراکسید دیسموتاز (SOD):** برای ارزیابی فعالیت این

آنزیم علاوه بر عصاره واکنش نمونه، به محلول بلانک و کنترل

هشت برگ بالغ از جهت‌های مختلف هر نهال با استفاده از دستگاه پرومتر (Leaf Porometer SC-1, Decagon Devices, Inc., USA) انجام شد.

**کلروفیل کل:** ابتدا نمونه برگ‌گی با استفاده از استون ۸۰

درصد استخراج شده سپس محلول رویی جداسازی گردید. میزان جذب نمونه‌ها با دستگاه اسپکتروفتومتر (NanoDrop® ND-1000 UV-Vis, USA) در طول‌موج‌های ۶۶۳ و ۶۴۵ خوانده و میزان کلروفیل کل طبق فرمول زیر محاسبه شد (Arnon, 1949):

$$\text{Total chl} = [20.2 A_{645} + 8.02 A_{663}] \times V/1000 \times W$$

که در این فرمول V حجم محلول فوقانی حاصل از

سانتریفوژ و W وزن تر نمونه برگ بر حسب گرم است.

**پرولین:** میزان پرولین برگ با استفاده از روش Bates و

همکاران (۱۹۷۳) اندازه‌گیری شد. ابتدا نمونه برگ‌گی استخراج شده با سولفوسالیسیلیک اسید با معرف ناین‌هیدرین و استیک اسید، مخلوط شده و پس از انتقال به حمام آب گرم، با اضافه کردن تولوئن میزان جذب فاز رویی عصاره استخراج شده با اسپکتروفتومتر در طول‌موج ۵۲۰ نانومتر خوانده شد.

**قندهای محلول:** برای تعیین میزان قندهای محلول در آب

از روش فنل سولفوریک استفاده گردید. بعد از رسم منحنی استاندارد و اندازه‌گیری شدت جذب غلظت‌های مختلف گلوکز در طول‌موج ۶۲۵ نانومتر، میزان قندهای محلول بر حسب میلی‌گرم بر گرم وزن تر برگ محاسبه شد (Irigoyen et al., 1992).

**مالون دی‌آلدهید:** برای اندازه‌گیری شاخص پراکسیداسیون

لیپیداها، غلظت مالون دی‌آلدهید (محصول واکنش پراکسیداسیون لیپیداها) مورد ارزیابی قرار گرفت. مالون دی‌آلدهید در واکنش با تیوباریتوریک اسید تشکیل کمپلکس رنگی داد که در طول‌موج ۵۳۲ نانومتر جذب آن ثبت و سپس جذب سایر رنگدانه‌های غیراختصاصی در ۶۰۰ نانومتر تعیین و از جذب ۵۳۲ نانومتر کسر گردید (Campos et al., 2003).

**نشت یونی:** برای بررسی نشت یونی، قطعات یکسان برگ‌گی

به ابعاد یک سانتی‌متر مربع (دو طرف رگبرگ اصلی) تهیه و در

خاموشی این آنزیم معادل  $26/6 \text{ mM cm}^{-1}$  بود که برای محاسبه فعالیت آنزیم بکار گرفته شد. فعالیت آنزیم براساس تغییر جذب کووت کوارتز محلول واکنش بر علیه کووت بلانک در طول مسیر یک سانتی متری بود. فعالیت این آنزیم برحسب یک واحد آنزیمی در گرم وزن تر برگ بیان شد. هر واحد آنزیمی، عبارت است از مقداری از آنزیم که سبب افزایش یک صدم درصد جذب در طول موج  $470$  نانومتر (در هر دقیقه) گردد (Hegar et al., 1996).

**فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز (APX):** فعالیت این آنزیم از طریق اندازه گیری اکسیدشدن آسکوربات توسط اسپکتروفتومتر در طول موج  $290$  نانومتر برای مدت زمان  $1$  دقیقه انجام شد. ابتدا نمونه بلانک (با حجم نیم میلی لیتر) حاوی  $490$  میکرو لیتر از بافر شماره  $2$  و  $10$  میکرو لیتر بافر فسفات، نمونه های عصاره (با حجم نیم میلی لیتر) حاوی  $490$  میکرو لیتر از بافر شماره  $2$  و  $10$  میکرو لیتر از عصاره آنزیمی تهیه شد و پس از بهم زدن (با گذاشتن پارافیلیم بر روی کووت) سرعت واکنش آنزیمی در طول موج  $290$  نانومتر ثبت و فعالیت آنزیمی با ضریب خاموشی  $2/8 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  محاسبه شد (Nakano and Asada, 1981).

آزمایش حاضر به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار اجرا شد. فاکتورهای مورد بررسی شامل تیمار تنش خشکی در سه سطح ( $50$ ،  $75$  و  $100$  درصد ظرفیت زراعی) و تیمار محلول پاشی برگی جاسمونیک اسید در سه سطح (صفر،  $100$  و  $200$  میکرومولار) بودند. آنالیز آماری آزمایش با نرم افزار SAS (Version 9.1 2002–2003, SAS Institute, Cary, NC) و رسم نمودارها با نرم افزار Excel صورت گرفت. مقایسه میانگین داده ها نیز با آزمون حداقل اختلاف معنی داری (LSD) انجام شد. همچنین قبل از آنالیز آماری، داده ها از لحاظ نرمال بودن مورد بررسی قرار گرفتند.

### نتایج و بحث

**صفات روابط آبی، محتوای نسبی آب برگ:** نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده ها نشان داد که اثرات ساده تنش خشکی و

نیز نیاز است که محتوی بلانک و کنترل مشابه عصاره واکنش نمونه بوده، با این تفاوت که محلول بلانک و کنترل فاقد سوپرناتانت آنزیمی بودند. تیوپ های حاوی عصاره واکنش نمونه و کنترل به مدت  $15$  دقیقه در حالی که به آرامی تکان داده می شدند در معرض یک عدد لامپ فلورسانس با نور تولیدی  $400$  لوکس (در دمای اتاق) قرار گرفتند. محلول بلانک نیز به مدت  $15$  دقیقه در شرایط تاریک و دمای اتاق قرار داشت. در ادامه با صفر نمودن دستگاه اسپکتروفتومتر نانودراپ توسط بلانک، جذب نمونه و کنترل در طول موج  $560$  نانومتر ثبت گردید. فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز بر مبنای واحد آنزیمی در میلی گرم وزن تر برگ بیان شد. هر واحد فعالیت سوپراکسید دیسموتاز عبارت است از مقداری از آنزیم که برای  $50$  درصد مهار احیاء فتوشیمیایی نیتروبلو تترازولیوم، تحت شرایط سنجش مورد نیاز است (Sheng Wu et al., 2006).

**فعالیت آنزیم کاتالاز (CAT):** فعالیت آنزیم کاتالاز به دنبال کاهش جذب پراکسید هیدروژن با ضریب خاموشی  $29/4 \text{ mM cm}^{-1}$  در مدت زمان  $2$  دقیقه و در طول موج  $240$  نانومتر ارزیابی شد. محلول واکنش برای تعیین فعالیت آنزیم کاتالاز به حجم یک میلی لیتر متشکل از پراکسید هیدروژن  $15$  میلی مولار، بافر فسفات  $50$  میلی مولار و عصاره آنزیمی با pH برابر با  $7$  بود. برای هر نمونه سه قرائت بدون خطا ثبت گردید و فعالیت این آنزیم برحسب یک واحد آنزیمی در گرم وزن تر برگ بیان شد. هر واحد فعالیت آنزیم کاتالاز، به صورت مقداری از آنزیم که  $1$  میکرومولار پراکسید هیدروژن را در هر دقیقه در شرایط سنجش تجزیه می کند، قابل تعریف است (Cakmak and Horst, 1991).

**فعالیت آنزیم پراکسیداز (POD):** محلول واکنشی به حجم یک میلی لیتر متشکل از  $475$  میکرو لیتر گایاکول  $45$  میلی مولار،  $475$  میکرو لیتر پراکسید هیدروژن  $100$  میلی مولار و عصاره آنزیمی بود. میزان جذب با فاصله زمانی  $10$  ثانیه یکبار در مدت زمان  $2$  دقیقه در شرایط دمای اتاق در طول موج  $470$  نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه گیری و ثبت گردید. برای هر نمونه سه قرائت بدون خطا ثبت شد. ضریب

جدول ۱- نتایج تجزیه واریانس اثر تنش خشکی و محلول پاشی جاسمونیک اسید بر برخی صفات فیزیولوژیکی و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی پرتقال تامسون ناول

منابع تغییر	درجه آزادی	میانگین مربعات					
		محتوای نسبی آب برگ	پتانسیل آب گیاه	شاخص سطح برگ	هدایت روزنه‌ای	کلروفیل کل	قندهای محلول
خشکی	۲	۴۰۴۹/۷۶**	۱/۰۰۲**	۸۴/۰۶**	۰/۰۲۴۷**	۲۸/۰۳**	۷۹۳/۴۴**
جاسمونیک اسید	۲	۲۱۹۲/۴۲**	۰/۰۸۰**	۸/۴۵**	۰/۰۸۶۳**	۶/۸۶**	۳۶۰/۱۱**
خشکی × جاسمونیک اسید	۴	۱۰۰/۶۶**	۰/۰۱۹۹**	۱/۵۸*	۰/۰۰۷۹**	۰/۵۸*	۴۳/۸۹**
خطای آزمایشی	۱۸	۷/۱۴	۰/۰۰۳	۰/۳۸	۰/۰۰۰۱	۰/۱۲	۹/۱۱
ضریب تغییرات	-	۸/۲۳	۱۰/۲۴	۲/۵۲	۲/۸۱	۸/۱۵	۳/۷۳

\*\*، \* و ns به ترتیب معنی داری در سطح احتمال یک درصد، پنج درصد و عدم معنی داری

ادامه جدول ۱-

منابع تغییر	درجه آزادی	میانگین مربعات				
		نشست الکترولیتی	مالون دی‌آلدئید	کاتالاز	سوپراکسید دیسموتاز	آسکوربات پراکسیداز
خشکی	۲	۲۴۹۰/۰۱**	۱/۷۷۲**	۰/۰۳۶۸**	۸۲۷/۰۵**	۱۵/۳۷**
جاسمونیک اسید	۲	۱۳۷/۵۸**	۰/۵۰۷**	۰/۰۳۱۱۲**	۹۲/۵۷**	۲/۴۳**
خشکی × جاسمونیک اسید	۴	۳۵/۸۶**	۰/۰۰۳ <sup>ns</sup>	۰/۰۰۰۷ <sup>ns</sup>	۳/۷۹*	۰/۳۹**
خطای آزمایشی	۱۸	۲/۵۸	۰/۰۰۵	۰/۰۰۰۳	۱/۰۸	۰/۰۳
ضریب تغییرات	-	۳/۹۹	۴/۸۱	۴/۸۹	۲/۲۷	۸/۲۶

\*\*، \* و ns به ترتیب معنی داری در سطح احتمال یک درصد، پنج درصد و عدم معنی داری

داد که تنش خشکی به طور معنی داری باعث کاهش میزان پتانسیل آب گیاه در گیاه گردید (جدول ۲). مشخص شد که گیاهانی که با جاسمونیک اسید محلول پاشی شده بودند در مقایسه با گیاهان محلول پاشی نشده از پتانسیل آب گیاه بالاتری برخوردار بودند که در این میان بین غلظت‌های مختلف جاسمونیک اسید از لحاظ آماری اختلاف معنی داری مشاهده نشد (جدول ۲).

نتایج بررسی حاضر با یافته‌های رفیعی‌راد و همکاران (۱۳۹۷) مطابقت دارد که نشان دادند اعمال تنش خشکی در سطوح ۷۵ و ۵۰ درصد ظرفیت زارعی باعث کاهش محتوای نسبی آب برگ و پتانسیل آب برگ در نارنگی پیچ (*Citrus reticulata* cv. Blanco × *C. paradise*) × *C. reticulata* گردید. محتوای آب نسبی منعکس‌کننده فعالیت متابولیک در

محلول پاشی برگی جاسمونیک اسید و نیز اثرات متقابل آن‌ها بر محتوای نسبی آب برگ در سطح احتمال یک درصد معنی دار بود (جدول ۱). مقایسه میانگین داده‌ها حاکی از آن است که به طور کلی با اعمال تنش خشکی محتوای نسبی آب برگ به طور معنی داری کاهش یافت (جدول ۲). همچنین مشخص شد که محلول پاشی برگی جاسمونیک اسید به طور معنی داری باعث حفظ بیشتر محتوای نسبی آب برگ در تمامی سطح خشکی گردید که در این میان غلظت ۱۰۰ میکرومولار نسبت به غلظت ۲۰۰ میکرومولار مؤثرتر بود (جدول ۲).

**پتانسیل آب گیاه:** براساس جدول ۱ مشخص شد که پتانسیل آب گیاه به طور معنی دار و در سطح احتمال ۱ درصد تحت تأثیر اثرات ساده و اثرات متقابل تنش خشکی و محلول پاشی برگی جاسمونیک اسید قرار گرفت. نتایج نشان

جدول ۲- مقایسه میانگین اثرات متقابل تنش خشکی و محلول پاشی برگی جاسمونیک اسید بر برخی صفات برگ پرتقال تامسون ناول

خشکی	جاسمونیک اسید (میکرومولار)	محتوای نسبی آب (درصد)	پتانسیل آب گیاه (مگا پاسکال)	شاخص سطح برگ	هدایت روزنه‌ای (مول بر مترمربع بر ثانیه)	کلروفیل کل (میلی‌گرم بر گرم وزن تازه)
شاهد (۱۰۰ درصد ظرفیت زراعی)	۰	۳۵/۴۷ <sup>c</sup>	-۰/۳۱۸ <sup>de</sup>	۲۸/۲۴ <sup>a</sup>	۰/۰۹۴ <sup>e</sup>	۵/۴۳ <sup>c</sup>
	۱۰۰	۶۸/۲۹ <sup>a</sup>	-۰/۲۲۲ <sup>e</sup>	۲۸/۴۷ <sup>a</sup>	۰/۱۹۰ <sup>c</sup>	۶/۶۳ <sup>a</sup>
	۲۰۰	۵۶/۱۷ <sup>b</sup>	-۰/۲۶۵ <sup>e</sup>	۲۷/۰۴ <sup>a</sup>	۰/۳۹۴ <sup>a</sup>	۶/۴۱ <sup>ab</sup>
ملایم (۷۵ درصد ظرفیت زراعی)	۰	۱۰/۲۳ <sup>f</sup>	-۰/۵۰۴ <sup>c</sup>	۲۴/۰۴ <sup>bc</sup>	۰/۰۹۱ <sup>e</sup>	۳/۳۶ <sup>de</sup>
	۱۰۰	۴۰/۲۱ <sup>c</sup>	-۰/۴۰۹ <sup>cd</sup>	۲۴/۸۹ <sup>b</sup>	۰/۱۵۷ <sup>d</sup>	۵/۶۷ <sup>bc</sup>
	۲۰۰	۲۱/۲۱ <sup>de</sup>	-۰/۴۳۴ <sup>cd</sup>	۲۴/۴۳ <sup>b</sup>	۰/۲۵۷ <sup>b</sup>	۳/۸۵ <sup>d</sup>
شدید (۵۰ درصد ظرفیت زراعی)	۰	۵/۸۹ <sup>f</sup>	-۱/۱۳۰ <sup>a</sup>	۱۹/۷۹ <sup>d</sup>	۰/۰۸۷ <sup>e</sup>	۱/۶۵ <sup>f</sup>
	۱۰۰	۲۶/۶۷ <sup>d</sup>	-۰/۷۷۶ <sup>b</sup>	۲۲/۹۲ <sup>c</sup>	۰/۰۸۶ <sup>e</sup>	۳/۳۸ <sup>de</sup>
	۲۰۰	۱۸/۱۹ <sup>e</sup>	-۰/۸۳۹ <sup>b</sup>	۲۲/۷۵ <sup>c</sup>	۰/۱۹۱ <sup>c</sup>	۲/۸۵ <sup>e</sup>

\* در هر ستون حروف مشترک نشان‌دهنده عدم معنی‌داری در سطوح متناظر با آزمون LSD است.

نمودند که جاسمونیک اسید باعث افزایش محتوای آب برگ گیاه دارویی گلرنگ (*Carthamus tinctorius* L.) تحت تنش خشکی گردید. به نظر می‌رسد جاسمونیک اسید با بستن روزنه‌ها (به‌عنوان یک مکانسیم مقاومت به تنش) باعث کاهش تعرق و حفظ آب برگ در حد بهینه می‌شود (حقیقی و منصور، ۱۳۹۷).

همچنین، این احتمال وجود دارد که جاسمونیک اسید به‌عنوان یک تنظیم‌کننده می‌تواند تولید مواد تنظیم‌کننده اسمزی به‌ویژه ساخت قندها و پرولین را در جهت‌ی القاء کند که در نهایت موجب حفظ محتوای نسبی آب گیاه شود (Siddiqi and Husen, 2019; Gomi, 2020).

**صفات برگ، شاخص سطح برگ:** تجزیه واریانس داده‌ها (جدول ۱) نشان داد که اثرات ساده و همچنین اثرات متقابل تنش خشکی و محلول پاشی برگی جاسمونیک اسید به‌طور معنی‌داری شاخص سطح برگ را تحت تأثیر قرار داد. مطابق جدول مقایسه میانگین اثرات متقابل (جدول ۲) مشخص شد که با افزایش شدت تنش خشکی شاخص سطح برگ پرتقال تامسون ناول به تدریج کاهش پیدا کرد. در سطوح ۱۰۰ و ۷۵ درصد ظرفیت زراعی بین گیاهان محلول پاشی شده با

بافت‌های گیاه بوده و به‌عنوان شاخصی مناسب به‌منظور شناسایی گیاهان در تحمل پسابیدگی استفاده می‌شود. گیاهان متحمل به خشکی با جذب آب از پروتوپلاست، آب بیشتری را در خود گیاهان عموماً نگهداری می‌کنند، بنابراین دارای مقدار بالاتری محتوای آب نسبی هستند. یکی از مهم‌ترین عوامل حفظ بقاء گیاه در شرایط تنش، توانایی گیاه در حفظ آب سلولی از طریق افزایش مقدار محتوای نسبی آب برگ و حفظ بهتر پتانسیل آب گیاه است. کاهش میزان محتوای نسبی آب گیاه در شرایط تنش خشکی، با کاهش میزان رطوبت خاک مرتبط است. افزایش مقاومت روزنه‌ای و به‌دنبال آن کاهش تعرق به‌دلیل تولید آبسزیک اسید در ریشه‌ها، افزایش جذب و انتقال آب و همچنین افزایش کشسانی دیواره سلول از علل مهم حفظ محتوای نسبی آب و پتانسیل آب در شرایط کم‌آبی است (Elsheery and Cao, 2008; Gupta et al., 2020).

مزارعی و همکاران (۱۳۹۸) در بررسی اثر جاسمونیک اسید روی گیاه مریم‌گلی (*Salvia officinalis* L.) گزارش نمودند که محتوای نسبی آب برگ در پاسخ به تیمار جاسمونیک اسید افزایش یافت که با نتایج بررسی حاضر مطابقت دارد. همچنین خادامیان و همکاران (۱۳۹۸) گزارش



هیدروژن پراکسید از بسته شدن روزنه‌ها توسط هیدروژن پراکسید کاسته و همچنین از آسیب‌های اکسیداتیو ناشی از تجمع ROSها بر آنزیم‌های چرخه کالوین و رنگیزهای فتوسنتزی مانند کلروفیل می‌کاهد. بنابراین به نظر می‌رسد که این ترکیب آنتی‌اکسیدانی با بهبود وضعیت فتوسنتز و کاهش ترکیبات اکسیدکننده می‌تواند در افزایش توسعه سلولی، کاهش تنفس و در نهایت در افزایش سطح برگ نقش مؤثری داشته باشد (Wang et al., 2020; Gomi et al., 2020).

**هدایت روزنه‌ای:** مطابق جدول تجزیه واریانس (جدول ۱) مشخص شد که هدایت روزنه‌ای برگ پرتقال تامسون ناول به‌طور معنی‌دار و در سطح احتمال ۱ درصد تحت تأثیر اثرات ساده و اثرات متقابل تنش خشکی و محلول‌پاشی برگ‌های جاسمونیک اسید قرار گرفت. مقایسه میانگین نشان داد که هدایت روزنه‌ای برگ در پاسخ به تنش خشکی به‌طور معنی‌داری کاهش یافت (جدول ۲). در مجموع گیاهان محلول‌پاشی‌شده با جاسمونیک اسید از هدایت روزنه‌ای بالاتری در مقایسه با گیاهان تیمارنشده برخوردار بودند که در این میان غلظت ۲۰۰ میکرومولار جاسمونیک اسید مؤثرتر از غلظت ۱۰۰ میکرومولار بود (جدول ۲).

همراستا با نتایج بررسی حاضر حسنی‌مقدم و همکاران (۱۳۹۴) نشان دادند که هدایت روزنه‌ای ارقام مختلف انار (*Punica granatum* L.) در پاسخ به تنش خشکی به‌طور معنی‌داری کاهش یافت. تجمع اسید آبسزیک در سلول‌های محافظ روزنه در اثر انتقال پیام از ریشه به برگ و کاهش محتوای نسبی برگ از مهم‌ترین دلایل بسته شدن روزنه در اثر تنش خشکی است. بسته شدن روزنه‌ها از اولین پاسخ‌های گیاه به تنش خشکی است و به نظر می‌رسد که علت اصلی اختلال فتوسنتز ناشی از خشکی است. بسته شدن روزنه‌ها مقدار دی‌اکسید کربن قابل دسترس برای سلول‌های مزوفیل را محدود می‌کند. همچنین، کاهش هدایت روزنه‌ای و افزایش دمای سایه‌انداز گیاهی در اثر کمبود آب نشان‌دهنده بسته شدن نسبی روزنه‌ها و کاهش تعرق که فرآیند خنک‌کننده گیاهان است است. از طرفی بسته شدن روزنه‌ها، ورود دی‌اکسید کربن

جاسمونیک اسید و محلول‌پاشی‌نشده از لحاظ شاخص سطح برگ تفاوت معنی‌داری وجود نداشت اما در شرایط تنش خشکی شدید (۵۰ درصد ظرفیت زراعی)، گیاهان محلول‌پاشی شده دارای شاخص سطح برگ بالاتری بودند (جدول ۲).

مطابق با نتایج بررسی حاضر راد و همکاران (۱۳۹۴) گزارش نمودند که سطح برگ درخت انار (*Punica granatum* L.) در پاسخ به تنش خشکی کاهش معنی‌داری را نشان داد. سطح برگ تعیین‌کننده میزان تشعشع جذب‌شده توسط گیاه و بنابراین تعرق و تولید ماده خشک است. به‌طور کلی، تنش خشکی سبب کاهش تعداد برگ و شاخص سطح برگ می‌گردد. به‌عنوان یک مکانیسم مقاومت به خشکی، تحت شرایط تنش خشکی برگ‌های کوچک و باریک در گیاه، شاخص سطح برگ کمتری را ایجاد کرده و بدین ترتیب میزان تعرق کاهش یافته و آب بیشتری در خاک ذخیره می‌شود. در شرایط بروز تنش خشکی، به محض آن‌که آب برگ کاهش می‌یابد فشار تورژانس بافت برگ‌ها کاهش یافته و برگ‌ها شروع به پژمرده شدن می‌کنند. نبودن تورژانس سلولی کاهش تقسیم سلولی و کاهش هدایت روزنه‌ای یا بسته شدن روزنه‌ها، کاهش فتوسنتز و رشد گیاه را به‌همراه دارد، که این‌ها از عوامل ثانویه کاهش سطح برگ قلمداد می‌شود. همچنین، کاهش سطح در زمان تنش خشکی می‌تواند به‌علت پیری زودرس، عاملی برای کاهش تعرق و رسیدگی زودتر گیاه باشد. از طرف دیگر، کاهش تقسیم سلولی در اثر افزایش میزان اسید آبسزیک، تأمین نشدن آسیمیلات مورد نیاز برای رشد برگ و در نتیجه کاهش فتوسنتز از عوامل دیگر کاهش شاخص سطح برگ بر اثر تنش خشکی ذکر شده‌اند (Hasanuzzaman and Tanveer, 2020; Gupta et al., 2020; Nohong and Nompo, 2015).

وهبی و همکاران (۱۳۹۶) در بررسی خود در مورد اثر تیمار جاسمونیک اسید بر رشد گیاه گندم (*Triticum aestivum* L.) تحت تنش رطوبتی گزارش نمودند که جاسمونیک اسید باعث افزایش سطح برگ گیاه تحت شرایط تنش رطوبتی گردید که با نتایج بررسی حاضر هخوانی دارد. جاسمونیک اسید احتمالاً از طریق خنثی‌سازی ترکیبات اکسیدکننده مانند

کاهش میزان کلروفیل تحت تنش شدید خشکی، به علت افزایش فعالیت آنزیم کلروفیلاز و پراکسیداز، تولید انواع مختلف رادیکال‌های آزاد اکسیژن و در نتیجه پراکسیداسیون و تجزیه کلروفیل و همچنین هیدرولیز پروتئین‌های تیلاکوئیدی باشد (Kapoor et al., 2020; Gupta et al., 2020).

نتایج بررسی حاضر با یافته‌های مزارعی و همکاران (۱۳۹۸) در مورد افزایش میزان کلروفیل برگ گیاه مریم‌گلی در اثر تیمار جاسمونیک اسید مطابقت دارد. جاسمونیک اسید و متیل جاسمونات با تشکیل آمینولولینیک اسید سبب بیان ژن‌های آنزیم‌های کلیدی در بیوستز کلروفیل می‌شوند و از طریق میزان کلروفیل را افزایش می‌دهند (مزارعی و همکاران، ۱۳۹۸).

**محلول‌های سازگار، قندهای محلول:** براساس تجزیه واریانس (جدول ۱) مشخص شد که میزان قندهای محلول برگ به‌طور معنی‌دار و در سطح احتمال ۱ درصد تحت تأثیر اثرات ساده و اثرات متقابل تنش خشکی و محلول‌پاشی برگی جاسمونیک اسید قرار گرفت. نتایج نشان داد که میزان قندهای محلول برگ در پاسخ به تنش خشکی به‌طور معنی‌داری افزایش یافت (جدول ۳). مشخص شد گیاهانی که با جاسمونیک اسید محلول‌پاشی شده بودند در مقایسه با گیاهان محلول‌پاشی نشده از قندهای محلول بیشتری برخوردار بودند که در این میان غلظت ۲۰۰ میکرومولار جاسمونیک اسید مؤثرتر بود (جدول ۳).

**پرولین:** میزان پرولین برگ پرتقال تامسون ناول فقط تحت تأثیرات اثرات ساده تنش خشکی و محلول‌پاشی برگی جاسمونیک اسید قرار گرفت (جدول ۱). همان طوری که در شکل ۱ مشخص است، با اعمال تنش خشکی میزان پرولین برگ به‌طور معنی‌داری افزایش یافت که این افزایش در تنش خشکی شدید (۵۰ درصد ظرفیت زراعی) کاملاً مشهود بود. هر دو تیمار ۱۰۰ و ۲۰۰ میکرومولار جاسمونیک اسید باعث افزایش میزان پرولین برگ گردیدند که البته بیشترین میزان پرولین برگ در تیمار ۱۰۰ میکرومولار مشاهده شد (شکل ۱). مطابق با نتایج بررسی حاضر فیفائی و همکاران (۱۳۹۵) در

به برگ را مختل کرده و این امر باعث کاهش غلظت دی‌اکسید کربن در جایگاه آنزیم رابیسکو شده که نتیجه آن کاهش فتوسنتز و افزایش تنفس نوری و در نهایت کاهش ماده خشک تولیدی و متعاقب آن کاهش عملکرد خواهد بود (Hasanuzzaman and Tanveer, 2020; Gupta et al., 2020; ) (Kapoor et al., 2020).

اخیراً محتشمی و تدین (۱۳۹۹) با مطالعه ژنوتیپ‌های گلرنگ (*Carthamus tinctorius* L.) تحت تیمارهای کم آبیاری نشان دادند که جاسمونیک اسید بر هدایت روزنه‌ای دارای اثر معنی‌داری است. اسید جاسمونیک و متیل استر آن (متیل جاسمونات) می‌توانند ژن‌های دخیل در عکس‌العمل گیاهان به انواع مختلف تنش‌های زیستی و غیرزیستی را القاء کنند. آن‌ها از طریق فعال‌کردن فرآیندهایی شامل بسته‌شدن روزنه‌ها می‌توانند بر هدایت روزنه‌ای اثر مستقیمی داشته باشند (Siddiqi and Husen, 2019; Gomi et al., 2020).

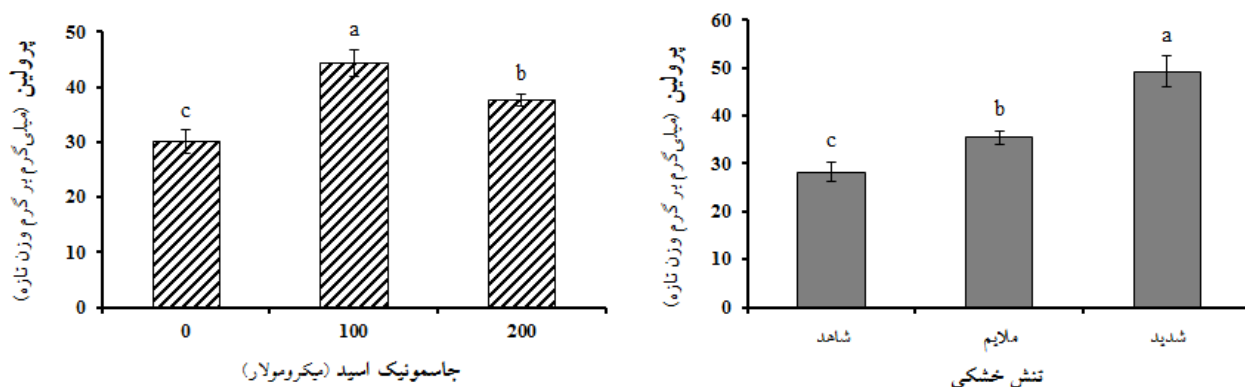
**کلروفیل کل:** نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که اثرات ساده تنش خشکی و محلول‌پاشی برگی جاسمونیک اسید و نیز اثرات متقابل آن‌ها بر میزان کلروفیل کل برگ پرتقال تامسون ناول معنی‌دار بود (جدول ۱). به‌طورکلی با اعمال تنش خشکی میزان کلروفیل کل برگ به‌طور معنی‌داری کاهش یافت که این کاهش در شرایط تنش خشکی شدید کاملاً مشهود بود (جدول ۲). همچنین مشخص شد که محلول‌پاشی برگی جاسمونیک اسید به‌طور معنی‌داری باعث حفظ بیشتر میزان کلروفیل کل برگ در تمامی سطح خشکی گردید (جدول ۲).

کاهش میزان کلروفیل در پاسخ به تنش خشکی قبلاً هم توسط فیفائی و همکاران (۱۳۹۴) در پایه‌های تجاری مرکبات، فیفائی و همکاران (۱۳۹۵) در دانه‌های مرکبات، رفیعی‌راد و همکاران (۱۳۹۷) در نارنگی پیچ و فیفائی و همکاران (۱۳۹۸) در ژنوتیپ‌های طبیعی مرکبات گزارش شده است. میزان کلروفیل در گیاهان زنده یکی از فاکتورهای مهم حفظ ظرفیت فتوسنتزی است و حفظ غلظت کلروفیل تحت تنش خشکی به ثبات فتوسنتز در این شرایط کمک می‌کند. به‌نظر می‌رسد

جدول ۲- مقایسه میانگین اثرات متقابل تنش خشکی و محلول پاشی برگ جاسمونیک اسید بر برخی صفات برگ پرتقال تامسون ناول

خشکی	جاسمونیک اسید (میکرومولار)	قندهای محلول (میلی گرم بر گرم وزن تازه)	نشست الکترولیتی (درصد)	سوپراکسید دیسموتاز (واحد بر میلی گرم وزن تازه)	آسکوربات پراکسیداز (واحد بر گرم وزن تازه)
شاهد (۱۰۰ درصد ظرفیت زراعی)	۰	۶۷/۱۳ <sup>f</sup>	۲۷/۴۵ <sup>e</sup>	۵۷/۱۵ <sup>a</sup>	۴/۴۵ <sup>a</sup>
	۱۰۰	۷۲/۰۰ <sup>ef</sup>	۱۶/۲۳ <sup>f</sup>	۵۳/۷۳ <sup>b</sup>	۳/۷۴ <sup>b</sup>
	۲۰۰	۷۵/۳۳ <sup>de</sup>	۲۲/۶۳ <sup>e</sup>	۵۱/۹۲ <sup>b</sup>	۲/۶۸ <sup>c</sup>
ملایم (۷۵ درصد ظرفیت زراعی)	۰	۷۵/۰۰ <sup>de</sup>	۴۹/۵۷ <sup>b</sup>	۵۱/۳۸ <sup>bc</sup>	۲/۴۷ <sup>c</sup>
	۱۰۰	۷۹/۳۳ <sup>cd</sup>	۳۶/۹۵ <sup>d</sup>	۴۹/۴۴ <sup>c</sup>	۱/۹۳ <sup>d</sup>
	۲۰۰	۸۸/۶۷ <sup>b</sup>	۴۴/۷۸ <sup>c</sup>	۴۳/۴۱ <sup>d</sup>	۱/۴۶ <sup>e</sup>
شدید (۵۰ درصد ظرفیت زراعی)	۰	۸۲/۶۶ <sup>bc</sup>	۶۰/۰۷ <sup>a</sup>	۳۸/۵۶ <sup>e</sup>	۱/۲۲ <sup>ef</sup>
	۱۰۰	۸۷/۶۷ <sup>b</sup>	۵۲/۷۰ <sup>b</sup>	۳۵/۲۷ <sup>f</sup>	۱/۰۵ <sup>ef</sup>
	۲۰۰	۱۰۰/۳۳ <sup>a</sup>	۵۶/۴۹ <sup>a</sup>	۳۲/۵۶ <sup>g</sup>	۰/۸۷ <sup>f</sup>

\* در هر ستون حروف مشترک نشان دهنده عدم معنی داری در سطوح متناظر با آزمون LSD است.



شکل ۱- اثر ساده سطوح مختلف خشکی (سمت راست) و محلول پاشی برگ جاسمونیک اسید (سمت چپ) بر میزان پرولین برگ پرتقال تامسون ناول. حروف مشترک نشان دهنده عدم معنی داری در سطوح متناظر با آزمون LSD است. میله‌های هر سون نشان دهنده خطای استاندارد (Standard Error) می باشد.

می‌گیرد. در این میان، یکی از مکانیسم‌های مؤثر گیاه در شرایط کم‌آبی، تنظیم اسمزی است. قندهای محلول و اسیدهای آمینه مانند پرولین و گلیسین بتائین از جمله ترکیبات مهمی هستند که در تنظیم اسمزی نقش اصلی دارند. پرولین یکی از اسیدهای آمینه فعال در پدیده تنظیم اسمزی است که در حفظ و ایجاد فشار اسمزی نقش بسیار زیادی دارد. این متابولیت‌ها با واکنش‌های بیوشیمیایی سلول‌ها تضادی ندارد و به‌عنوان حلال‌های سازگار نامیده می‌شوند. می‌توان بیان کرد که پرولین

دانه‌های مرکبات و فیثائی و همکاران (۱۳۹۴) در پایه‌های تجاری مرکبات نشان دادند که اعمال تنش خشکی باعث افزایش معنی‌دار میزان قندهای محلول و پرولین گردید. مقاومت به تنش خشکی به توانایی گیاه برای ادامه حیات خود در شرایطی که پتانسیل آب بافت‌های گیاهی کاهش یابد، اطلاق می‌شود. سازوکارهای مقاومت به خشکی اغلب از راه حفظ تورم یاخته‌ای (با تجمع نمک‌های محلول داخل یاخته‌ای) و یا با تحمل خشکی (به‌وسیله مقاومت پروتوپلاسمی) صورت

از محققان کربوهیدرات‌هایی شناسایی شدند که سبب تعدیل اثر بازدارندگی خشکی بر روی نسخه‌برداری از ژن‌های فتوسنتیک می‌شوند؛ برای نمونه بیان ژن‌های کدکننده زیر واحدهای کوچک و بزرگ روبیسکو در طی خشکی، بیانگر مکانیسم کنترل‌شده‌ای است که این امر می‌تواند یکی از دلایل تجمع کربوهیدرات‌ها در برگ باشد (Koch, 1996; Gupta et al., 2020; Kapoor et al., 2020).

مطالعه El-Sayed و همکاران (۲۰۱۴) نشان داد که تیمار جاسمونیک اسید باعث افزایش میزان پرولین در برگ زیتون تحت شرایط تنش‌های محیطی گردید. در گزارش Guo و همکاران (۲۰۰۶) بیان شده است که تحت شرایط تنش‌های محیطی جاسمونیک اسید با تحریک سنتز بازدارنده پروتئیناز و بیان ژن آن، سبب پایداری پروتئین‌های گیاه برنج (*Oryza sativa*) می‌شود. به نظر می‌رسد جاسمونیک اسید با تنظیم افزایشی بیان ژن‌های پروتئین‌های بازدارنده به‌ویژه پرولین، سبب افزایش میزان این آمینواسید در گیاهان تحت شرایط تنش خشکی می‌شود (Wang et al., 2009). در مطالعه Gupta و همکاران (۱۹۹۳) گزارش شد که متیل جاسمونات با القاء آنزیم سنتزکننده پرولین باعث افزایش تولید پرولین در گیاه نخود (*Cicer arietinum*) می‌شود، که با نتایج بررسی حاضر مطابقت دارد.

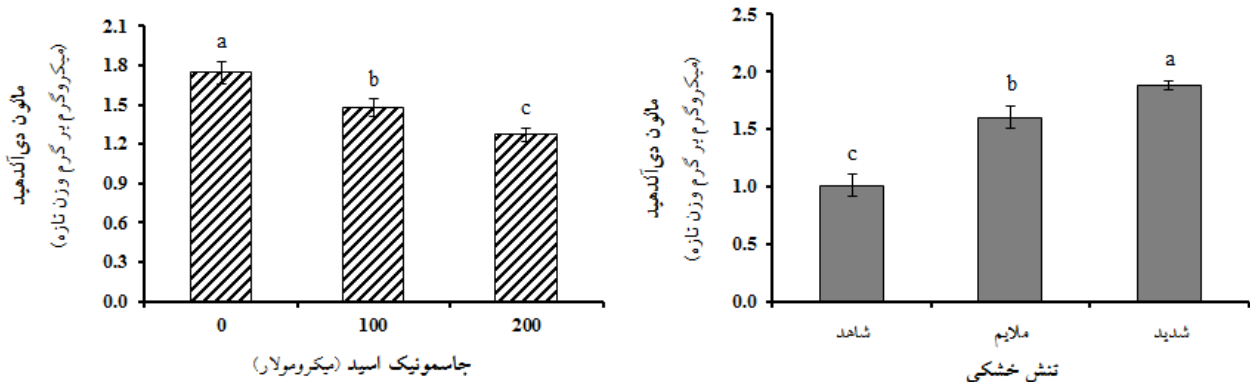
**آسیب سلولی، نشت یونی:** مطابق جدول جدول ۱ مشخص شد که نشت یونی برگ پرتقال تامسون ناول به‌طور معنی‌دار و در سطح احتمال ۱ درصد تحت تأثیر اثرات ساده و اثرات متقابل تنش خشکی و محلول‌پاشی برگی جاسمونیک اسید قرار گرفت. مقایسه میانگین نشان داد که نشت یونی برگ در پاسخ به تنش خشکی به‌طور معنی‌داری افزایش یافت (جدول ۳). در مجموع گیاهان محلول‌پاشی‌شده با غلظت ۱۰۰ میکرومولار جاسمونیک اسید از نشت یونی کمتری در مقایسه با گیاهان تیمار نشده برخوردار بودند (جدول ۲).

**مالون دی‌آلدهید:** مشخص شد که اثرات ساده تنش خشکی و محلول‌پاشی برگی جاسمونیک اسید بر میزان مالون دی‌آلدهید برگ در سطح احتمال ۱ درصد معنی‌دار بود و اثرات

از طریق تنظیم اسمزی، ممانعت از تخریب آنزیم‌ها و حذف رادیکال‌های هیدروکسیل، تحمل‌پذیری گیاه را در برابر تنش خشکی افزایش می‌دهد. در واقع پرولین به‌عنوان منبع نیتروژن و کربن برای گیاهان تحت تنش شدید عمل می‌کند و به گیاه کمک می‌کند که در دوره کوتاهی بعد از اعمال تنش خشکی، زنده بماند و بتواند بعد از رفع تنش، رشد خود را بازیابی کند (Hasanuzzaman and Tanveer, 2020; Gupta et al., 2020; Kapoor et al., 2020).

تجمع پرولین به‌دلیل تنش خشکی می‌تواند ناشی از تحریک سنتز آن یا جلوگیری از تجزیه آن و یا تجزیه پروتئین‌ها باشد (Gomes). مشخص شده که تجمع پرولین به موازات افزایش فعالیت آنزیم‌های شرکت‌کننده در سنتز پرولین از طریق مسیر گلوتامیت شامل ۲-گلوتامین کیناز، گلوتامیل فسفات ردوکتاز و دلتا-پیرولین-۵-کربوکسیلات ردوکتاز است. همچنین تنش خشکی باعث می‌گردد فعالیت آنزیم تجزیه‌کننده پرولین (پرولین اکسیداز) کاهش پیدا کند. از این‌رو کاهش فعالیت آنزیم پرولین اکسیداز و افزایش فعالیت ۲-گلوتامیل کیناز می‌تواند دلیل تجمع پرولین در گیاهان تحت تنش خشکی باشد (Fujita et al., 2003; Manivannan et al., 2007; Gomes et al., 2010).

تحقیقات متعددی در زمینه نقش کربوهیدرات‌های محلول و افزایش آن‌ها تحت شرایط تنش‌های گوناگون صورت پذیرفته است که همگی بر نقش ترکیبات مذکور در تنظیم اسمزی سلول دلالت دارند. به‌طورکلی، در شرایط تنش خشکی باوجود کاهش میزان تولید مواد نورساختی، محتوای قندهای محلول به‌دلیل تغییر شکل بیشتر نشاسته و یا دیگر شکل‌های ذخیره‌ای به قند، تجزیه پلی‌ساکاریدهای دیواره یاخته‌ای، تغییر در میزان انتقال قندها و یا مصرف کمتر کربوهیدرات‌ها توسط بافت‌ها افزایش می‌یابد (Maness, 2010). در مجموع افزایش قندهای محلول در طی تنش خشکی را می‌توان با توجه به مواردی توجیه کرد: ۱) تخریب کربوهیدرات‌های نامحلول که منجر به افزایش قندهای محلول می‌شود، ۲) سنتز این ترکیبات از مسیرهای غیرفتوسنتزی و ۳) متوقف‌شدن رشد. به‌نظر برخی



شکل ۲- اثر ساده سطوح مختلف خشکی (سمت راست) و محلول پاشی برگی جاسمونیک اسید (سمت چپ) بر میزان مالون دی آلدئید برگ پرتقال تامسون ناول. حروف مشترک نشان دهنده عدم معنی داری در سطوح متناظر با آزمون LSD است. میله‌های هر سون نشان دهنده خطای استاندارد (Standard Error) می باشد.

افزایش شدت و مدت زمان تنش خشکی باعث ایجاد اختلال شدیدتر در فعالیت‌های بیولوژیک غشاء سلولی، کاهش سیالیت آن و غیرفعال‌سازی یا کاهش سرعت پمپ‌شدن یون‌های غشائی می‌شود، بنابراین بر میزان نشت یون‌ها نیز اضافه می‌شود. تنش خشکی یک سری تغییرات را در فسفولیپیدهای غشاء ایجاد می‌کند و اسیدهای چرب غیراشباع، افزایش می‌یابند. در تنش‌های شدید بعضی از قسمت‌های فسفولیپیدهای دو لایه‌ای غشاء، حالت هگزاگونال (شش وجهی) پیدا کرده و ساختار غشاء به ساختار منفذدار با مقاومت کم تبدیل شده و محتویات سلول به بیرون ریخته می‌شود در این شرایط مقدار ماده تری‌هالوز که وظیفه استحکام غشای سلولی را دارد، کاهش می‌یابد. به‌طور کلی تنش خشکی باعث افزایش پراکسیداسیون چربی‌ها و در نهایت کاهش شاخص پایداری غشای سلول در گیاهان مختلف می‌شود (Gupta et al., 2020; Kapoor et al., 2020).

محتوی مالون دی آلدئید شاخصی از میزان خسارت تنش اکسیداتیو است. تخریب غشاهای سلول یکی از پیامدهای مستقیم کمبود آب است. به عبارت دیگر بین میزان مالون دی آلدئید شدت تنش خشکی رابطه مستقیمی وجود دارد. افزایش مالون دی آلدئید در بافت برگ در شرایط تنش خشکی نشان می‌دهد که سازوکارهای ترمیم سلولی با سازوکارهای تخریب حاصل از کمبود آب که می‌توانند بر تجزیه و بازیابی

متقابل آن‌ها معنی‌دار نبود (جدول ۱). براساس شکل ۲، میزان مالون دی آلدئید برگ پرتقال تامسون ناول با اعمال تنش خشکی به‌طور معنی‌دار افزایش یافت به‌طوری‌که میزان آن از ۱/۰۱ میکروگرم بر گرم وزن تازه در شرایط بدون تنش به ۱/۸۸ میکروگرم بر گرم وزن تازه در شرایط تنش خشکی شدید افزایش یافت. محلول پاشی برگی جاسمونیک اسید توانست به‌طور معنی‌داری از افزایش مالون دی آلدئید برگ جلوگیری نماید که در این میان غلظت ۲۰۰ میکرومولار جاسمونیک اسید مؤثرتر بود (شکل ۲).

افزایش میزان نشت یونی و مالون دی آلدئید در پاسخ به تنش خشکی قبلاً هم توسط فیفائی و همکاران (۱۳۹۴) در پایه‌های تجاری مرکبات، فیفائی و همکاران (۱۳۹۵) در دانه‌های مرکبات، رفیعی‌راد و همکاران (۱۳۹۷) در نارنگی پیچ و فیفائی و همکاران (۱۳۹۸) در ژنوتیپ‌های طبیعی مرکبات گزارش شده است.

تحت تنش خشکی، غشاء سلولی پایداری خود را از دست داده و در صورت قرارگرفتن برگ در یک محیط آبی مواد محلول از سلول‌های آن به بیرون تراوش می‌کند، لذا پایداری غشاء به‌وسیله ارزیابی تراوش یون‌ها از آن ارزیابی می‌شود. به‌نظر می‌رسد که پایداری غشاء سلولی در تنش‌ها با سنتز پروتئین‌های شوک گرمایی و ویژگی‌های سیستم فتوسنتزی، از جمله آنزیم‌های کلیدی و غشاءهای تیلاکوئیدی مرتبط است.

برگی جاسمونیک اسید توانست میزان فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز را افزایش دهد که در این میزان غلظت ۱۰۰ میکرومولار جاسمونیک اسید مؤثرتر بود (جدول ۳).

**آسکوربات پراکسیداز:** مشخص شد که فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز تحت تأثیر اثرات ساده و همچنین اثرات متقابل تنش خشکی و محلول پاشی برگگی جاسمونیک اسید قرار گرفت (جدول ۱). براساس جدول ۳، میزان فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز برگ با اعمال تنش خشکی به طور معنی دار افزایش یافت. محلول پاشی برگگی جاسمونیک اسید توانست به طور معنی داری فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز را افزایش دهد که در این میان غلظت ۱۰۰ میکرومولار جاسمونیک اسید مؤثرتر بود (جدول ۳).

**پراکسیداز:** نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز فقط تحت تأثیر اثرات ساده تنش خشکی و محلول پاشی برگگی جاسمونیک اسید قرار گرفت (جدول ۱). میزان فعالیت آنزیم کاتالاز از ۲۷/۱۰ واحد بر گرم وزن تازه در شرایط بدون تنش، به ۳۹/۵۴ واحد بر گرم وزن تازه در شرایط تنش خشکی ملایم و ۵۱/۳۷ واحد بر گرم وزن تازه در شرایط تنش خشکی شدید افزایش یافت (شکل ۴). گیاهان محلول پاشی شده با غلظت ۱۰۰ میکرومولار جاسمونیک اسید با ۴۷/۵۷ واحد بر گرم وزن تازه دارای فعالیت آنزیم پراکسیداز بیشتری در مقایسه با گیاهان محلول پاشی شده با غلظت ۲۰۰ میکرومولار جاسمونیک اسید (۳۹/۰۶ واحد بر گرم وزن تازه) و گیاهان محلول پاشی نشده (۳۴/۲۰ واحد بر گرم وزن تازه) بودند (شکل ۴).

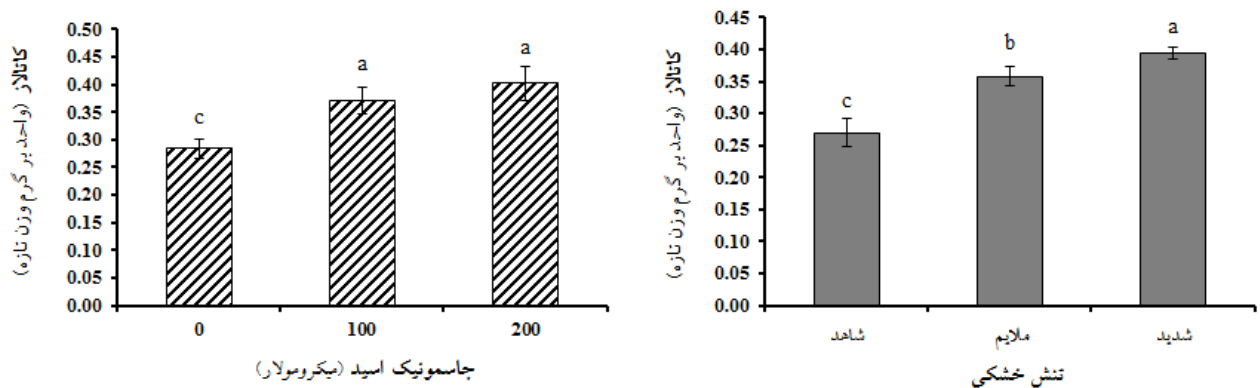
همراستا با نتایج بررسی حاضر Dos Santos و همکاران (۲۰۱۹) بیان نمودند که فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی مانند کاتالاز، سوپراکسید دیسموتاز و آسکوربات پراکسیداز در طول تنش خشکی در مرکبات افزایش پیدا کرد. تنش‌های محیطی تثبیت CO<sub>2</sub> را در گیاهان محدود می‌کند و به دنبال آن تولید NADP<sup>+</sup> توسط چرخه کلونین کاهش می‌یابد، در نتیجه به دلیل برانگیختگی زنجیره انتقال الکترون فتوسنتزی، رادیکال‌های اکسیژن تنها و سوپراکسید، تولید می‌شود (Dmitrieva et al.,

لیپیدهای غشاء تأثیر بگذارند، همگام نمی‌شوند؛ به ویژه در اثر تنش خشکی، پراکسیداسیون گلیکولیپیدهای تیلاکوئید کلروپلاستی و به دنبال آن تولید دی‌آسیل گلیسرول، تری‌آسیل گلیسرول و اسیدهای چرب آزاد اتفاق می‌افتد و در نتیجه میزان مالون دی‌آلدئید در بافت گیاهی افزایش می‌یابد (Smirnoff, 1993; Hasanuzzaman and Tanveer, 2020).

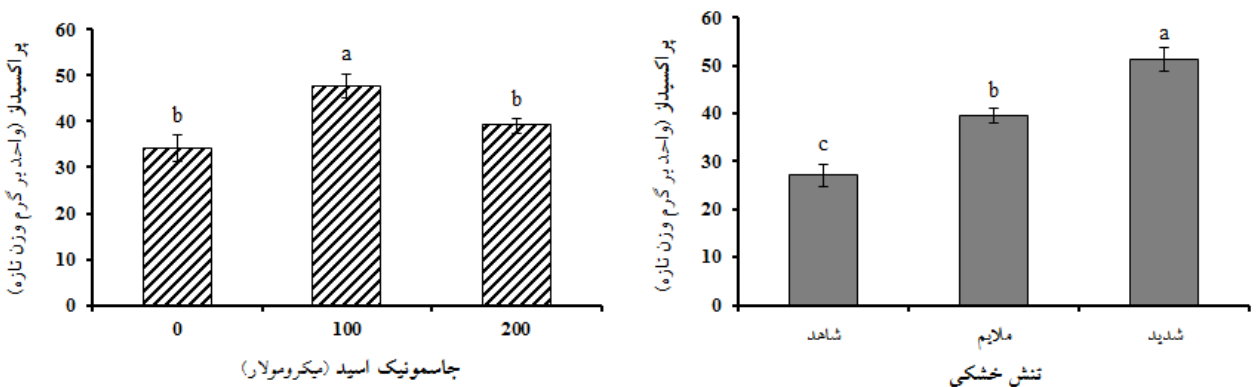
در بررسی صورت گرفته توسط خادمیان و همکاران (۱۳۹۸) مشخص شد که جاسمونیک اسید از افزایش میزان مالون دی‌آلدئید برگ گیاه گلرنگ تحت تنش خشکی جلوگیری نمود. بیان شده است که جاسمونات‌ها با بالا نگهداشتن سطح فعالیت آنتی‌اکسیداتیوی سلول (مانند افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی) مانع اثر ROSها حاصل از تنش خشکی بر غشاء سلولی گیاه توت‌فرنگی (*Fragaria × ananassa*) شده و در نتیجه از پراکسیده شدن لیپیدهای غشاء و نشت یونی جلوگیری می‌کنند (Wangm, 1999).

**فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی، کاتالاز:** تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که میزان فعالیت آنزیم کاتالاز فقط تحت تأثیر اثرات ساده تنش خشکی و محلول پاشی برگگی جاسمونیک اسید قرار گرفت (جدول ۱). میزان فعالیت آنزیم کاتالاز از ۰/۲۷۰ واحد بر گرم وزن تازه در شرایط بدون تنش، به ۰/۳۵۸ واحد بر گرم وزن تازه در شرایط تنش خشکی ملایم و ۰/۳۹۴ واحد بر گرم وزن تازه در شرایط تنش خشکی شدید افزایش یافت (شکل ۳). گیاهان محلول پاشی شده با جاسمونیک اسید به ترتیب با ۰/۳۷۰ و ۰/۴۰۱ واحد بر گرم وزن تازه دارای فعالیت آنزیم کاتالاز بیشتری در مقایسه با گیاهان محلول پاشی نشده (۰/۲۸۳ واحد بر گرم وزن تازه) بودند که البته از لحاظ آماری با یکدیگر اختلاف معنی داری نداشتند (شکل ۳).

**سوپراکسید دیسموتاز:** مطابق جدول ۱، اثرات ساده و اثرات متقابل تنش خشکی و محلول پاشی برگگی جاسمونیک اسید بر میزان فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز معنی دار بود. مقایسه میانگین داده‌ها نشان داد که تنش خشکی باعث افزایش میزان فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز برگ پرتقال تامسون ناول گردید (جدول ۳). همچنین مشخص شد که محلول پاشی



شکل ۳- اثر ساده سطوح مختلف خشکی (سمت راست) و محلول پاشی برگ جاسمونیک اسید (سمت چپ) بر میزان فعالیت آنزیم کاتالاز برگ پرتقال تامسون ناول. حروف مشترک نشان‌دهنده عدم معنی‌داری در سطوح متناظر با آزمون LSD است. میله‌های هر سون نشان‌دهنده خطای استاندارد (Standard Error) می‌باشد.



شکل ۴- اثر ساده سطوح مختلف خشکی (سمت راست) و محلول پاشی برگ جاسمونیک اسید (سمت چپ) بر میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز برگ پرتقال تامسون ناول. حروف مشترک نشان‌دهنده عدم معنی‌داری در سطوح متناظر با آزمون LSD است. میله‌های هر سون نشان‌دهنده خطای استاندارد (Standard Error) می‌باشد.

Hasanuzzaman *et al.*, 2020). از آنجایی که کاتالاز  $H_2O_2$  را بدون هیچ نیروی احیایی تجزیه می‌کند، آنزیم را برای حذف رادیکال  $H_2O_2$  در گیاهان بسیار مناسب می‌سازد. کاتالاز، آسکوربات پراکسیداز و سوپراکسیداز دیسموتاز کارآمدترین آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان هستند. افزایش فعالیت این آنزیم‌ها باعث افزایش مقاومت به تنش‌ها از جمله تنش خشکی می‌شود (Unuofin and Lebelo, 2020).

آنزیم سوپراکسیداز دیسموتاز اولین خط دفاعی در مقابل ROS و پالایند اصلی رادیکال سوپراکسیداز است. این آنزیم نقش کلیدی در تنظیم غلظت رادیکال سوپراکسیداز و پراکسیداز دارد. تجمع رادیکال‌های آزاد به دلیل کاهش مکانیسم‌های

تنش خشکی موجب ایجاد ROSهایی مانند سوپراکسیداز هیدروژن، رادیکال هیدروکسید و اکسیژن می‌شود. این اکسیژن‌های فعال شده سیتوزولی، موجب اختلال در متابولیسم از طریق خسارت اکسیداتیو بر لیپیدها، پروتئین‌ها و اسیدهای نوکلئیک می‌شود و فعالیت آنزیم‌های اکسیدانت مانند کاتالاز، پراکسیداز، آسکوربات پراکسیداز و سوپراکسیداز دیسموتاز را تحت تنش افزایش می‌دهد. سطح ROS، آغازگر پاسخ‌های سیگنالی مانند فعال‌سازی آنزیم‌ها، بیان ژن، مرگ برنامه‌ریزی شده سلول و آسیب‌های سلولی است. کاتالاز از آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی مهم در پراکسی‌زوم‌ها می‌باشد که  $H_2O_2$  را به آب تبدیل می‌کند (Mittler, 2002; )

دیسموتاز در اثر تیمار جاسمونیک اسید در گیاه گلرنگ تحت تنش خشکی افزایش یافت. براساس شواهد موجود جاسمونیک اسید به‌عنوان مولکول هشداردهنده در شرایط نامساعد محیطی فعالیت می‌کند و می‌تواند باعث بکار انداختن سیستم آنتی‌اکسیدانی در گیاه گردد (Memelink, 2009).

### نتیجه‌گیری

در بررسی حاضر مشخص شد که تنش خشکی باعث کاهش محتوای نسبی آب، پتانسیل آب گیاه، شاخص سطح برگ، هدایت روزنه‌ای و کلروفیل کل برگ پرتقال تامسون ناول گردید. از طرف دیگر، میزان نشت یونی، مالون دی‌آلدئید، قندهای محلول، پرولین و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی به‌طور معنی‌داری در پاسخ به تنش خشکی افزایش یافت. در این میان، محلول‌پاشی برگی جاسمونیک اسید توانست با حفظ بهتر وضعیت آبی برگ (محتوای نسبی آب برگ و پتانسیل آب گیاه)، افزایش شاخص سطح برگ، هدایت روزنه‌ای، حفظ بهتر پایداری غشاء سلولی (با کاهش نشت یونی و مالون دی‌آلدئید)، حفظ کلروفیل کل در حد مطلوب، افزایش میزان محلول‌های سازگار (قندهای محلول و پرولین) و همچنین افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی (کاتالاز، سوپراکسید دیسموتاز، آسکوربات پراکسیداز و پراکسیداز) پرتقال تامسون ناول تحت شرایط تنش خشکی، باعث کاهش تأثیرات منفی تنش خشکی شده و در نتیجه گیاه را مقاوم‌تر می‌سازد. بنابراین، با توجه به نتایج این پژوهش کاربرد محلول‌پاشی برگی جاسمونیک اسید به‌ویژه در غلظت ۱۰۰ میکرومولار (به‌دلیل اینکه در اکثر موارد یا با غلظت ۲۰۰ میکرومولار اختلاف معنی‌داری نداشت و یا حتی در مواردی بهتر و مؤثرتر عمل کرد) برای کاهش اثرات منفی تنش خشکی در پرتقال تامسون ناول پیشنهاد می‌گردد.

حذف‌کننده آن‌ها صورت می‌گیرد. آنزیم سوپراکسید دیسموتاز رادیکال‌های سوپراکسید را به پراکسید هیدروژن و اکسیژن تبدیل می‌کند و به این ترتیب غلظت سوپراکسید را در حد پایین نگه می‌دارد. افزایش فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز در شرایط تنش‌های زیستی به‌علت افزایش تولید رادیکال سوپراکسید در این شرایط است که باعث فعال‌شدن مسیرهای انتقال پیام در سلول می‌شود و در نهایت بیان ژن‌های رمزکننده آنزیم سوپراکسید دیسموتاز را افزایش می‌دهد (Mittler, 2002; Unuofin and Lebelo, 2020). بنابراین افزایش فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز در شرایط تنش منجر به تعدیل قابل توجه رادیکال سوپراکسید می‌شود تا خسارت‌های ناشی از آن نیز کمتر شود (Gupta et al., 2018) که با نتایج بدست آمده در تحقیق حاضر هم‌خوانی دارد.

پراکسیداز به‌همراه آسکوربات پراکسیداز، پراکسید هیدروژن ( $H_2O_2$ ) را هم درون سلول و هم آپوپلاست خنثی می‌کند.  $H_2O_2$  نسبتاً پایدار و از نظر بار الکتریکی خنثی است، اما از آنجا که می‌تواند از میان غشاء سلولی عبور کرده و وارد اجزای سلولی شود، بسیار خطرناک است.  $H_2O_2$  در حضور رادیکال سوپراکسید، رادیکال هیدروکسیل را که بسیار فعال است تولید می‌کند. بنابراین خنثی کردن پراکسید هیدروژن برای بقای سلول اهمیت ویژه‌ای دارد. پراکسیدازها نسبت به سایر آنزیم‌ها، کمتر اختصاصی هستند و با بسیاری از پیش‌ماده‌ها به عنوان دهنده الکترون، واکنش می‌دهند (Gupta et al., 2018; Hasanuzzaman et al., 2020).

در آزمایش صورت گرفته توسط مزارعی و همکاران (۱۳۹۸) در گیاه مریم‌گلی مشخص شد که تیمار جاسمونیک اسید باعث افزایش فعالیت آنزیم‌های کاتالاز، گایاکول پراکسیداز، پراکسیداز، آسکوربات پراکسیداز و سوپراکسید دیسموتاز گردید که با نتایج بررسی حاضر هم‌خوانی دارد. همچنین، خادمیان و همکاران (۱۳۹۸) گزارش نمودند که فعالیت آنزیم‌های کاتالاز، گلوکاتیون پراکسیداز و سوپراکسید

### منابع

بی‌نام، (۱۳۹۷) آمارنامه کشاورزی. جلد سوم، محصولات باغبانی. وزارت جهاد کشاورزی، معاونت برنامه‌ریزی و اقتصادی، مرکز



فناوری اطلاعات و ارتباطات.

حسنی مقدم، ا.، اثنی‌عشری، م. و رضائی‌نژاد، ع. ح. (۱۳۹۴) اثر تنش خشکی روی برخی از خصوصیات فیزیولوژیکی شش رقم انار (*Punica granatum L.*) تجاری ایرانی. فناوری تولیدات گیاهی ۱۵: ۱۱-۱.

حقیقی، م. و منصوری، ف. (۱۳۹۷) تأثیر اسید جاسمونیک و اسید سالیسیلیک بر تغییرات رشدی و فیزیولوژیکی گیاه گوجه‌فرنگی تحت تنش شوری. علوم و فنون کشت‌های گلخانه‌ای ۹: ۱۳-۱.

خادمیان، ر.، قربانی‌نهوچی، م. و اصغری، ب. (۱۳۹۸) اثر جاسمونیک اسید بر خصوصیات فیزیولوژیکی، فیتوشیمیایی و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانتی گیاه دارویی گلرنگ (*Carthamus tinctorius L.*) تحت تنش خشکی. فصلنامه گیاهان دارویی ۱۳۴-۱۱۲: ۱۸.

راد، م. ه.، اصغری، م. ر. و عصاره، م. ح. (۱۳۹۴) اثر تنش خشکی بر رشد، عملکرد و کیفیت میوه انار (*Punica granatum L.*) رقم رباب نیریز در شرایط اقلیمی خشک. مجله به‌زراعی نهال و بذر ۳۱: ۷۵-۹۰.

رفیعی‌راد، ز.، گلچین، ا.، تاجور، ی. و فتاحی‌مقدم، ج. (۱۳۹۷) اثر سطوح سوپرچادز آب‌آزورب بر رشد رویشی و زایشی نارنگی پیچ تحت شرایط تنش خشکی. به‌زراعی کشاورزی ۲۰: ۷۳۵-۷۱۹.

عبادی، ه.، رائینی‌سرجاز، م. و غلامی سفیدکوهی، م. ع. (۱۳۹۴) تعیین عمق‌های آستانه‌ای آب آبیاری برای تولید مرکبات در مناطق مرطوب ایران. نشریه آبیاری و زهکشی ایران ۶: ۹۲۶-۹۱۸.

فیفاغی، ر.، فتاحی‌مقدم، ج. و طاهری، ح. (۱۳۹۸) ارزیابی تغییر برخی ترکیبات حاصل از تنش خشکی در ژنوتیپ‌های طبیعی مرکبات. علوم باغبانی ایران ۵۰: ۴۲۰-۴۰۹.

فیفاغی، ر.، فتوحی قزوینی، ر.، گلچین، ب. و حمیداوغلی، ی. (۱۳۹۴) اثر تنش خشکی بر مقدار پرولین، قندهای محلول، مالون دی‌آلدئید و رنگدانه‌ها در پایه‌های تجاری مرکبات شمال کشور. به‌زراعی کشاورزی ۱۷: ۹۵۲-۹۳۹.

فیفاغی، ر.، فتوحی قزوینی، ر.، گلچین، ب. و حمیداوغلی، ی. (۱۳۹۵) بررسی تأثیر تنش آبی شدید بر برخی ویژگی‌های دانه‌های مرکبات. علوم باغبانی ایران ۴۷: ۴۰۵-۳۹۷.

محتشمی، ف. و تدین، م. ر. (۱۳۹۹) ارزیابی اثر اسید آسکوربیک و اسید جاسمونیک بر برخی صفات مورفو فیزیولوژیکی ژنوتیپ‌های گلرنگ تحت تیمارهای کم آبیاری. فرآیند و کارکرد گیاهی ۹: ۵۵-۳۹.

مزارعی، ا.، موسوی‌نیک، س. م.، قنبری، ا. و فهمیده، ل. (۱۳۹۸) تأثیر محلول‌پاشی غلظت‌های مختلف جاسمونیک اسید و نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم بر برخی صفات فیزیولوژیکی و فعالیت آنزیم‌های مریم‌گلی (*Salvia officinalis L.*). زیست‌شناسی گیاهی ایران ۱۱: ۲۲-۱.

وهبی، ن.، امام، ی. و پیرسته‌انوشه، ه. (۱۳۹۶) بهبود رشد و عملکرد گندم با استفاده از کلرمکوات کلراید، سالیسیلیک اسید و جاسمونیک اسید در شرایط تنش رطوبتی. نشریه پژوهش‌های زراعی ایران ۱۵: ۱۳۵-۱۲۴.

Arnon, D. I. (1949) Copper enzymes in isolated chloroplast polyphenol oxidase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiology* 24: 1-15.

Bates, L. S., Waldren, R. P. and Teare, I. D. (1973) Rapid determination of free proline for waterstress studies. *Plant and Soil* 39: 205-207.

Beauchamp, C. O. and Fridovich, I. (1971) Superoxide dismutase: Improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Annual Review of Biochemistry* 44: 276-287.

Cakmak, I. and Horst, W. (1991) Effect of aluminium on lipid peroxidation, superoxide dismutase, catalase and peroxidase activities in root tip of soybean (*Glysin max*). *Plant Physiology* 83: 463-468.

Campos, P. S., Quartin, V., Ramalho, J. C. and Nunes, M. A. (2003) Electrolyte leakage and lipid degradation account for cold sensitivity in leaves of *Coffea sp.* plants. *Journal of Plant Physiology* 160: 283-292.

- Dmitrieva, V. A., Tyutereva, E. V. and Voitsekhovskaja, O. V. (2020) Singlet oxygen in plants: Generation, detection, and signaling roles. *International Journal of Molecular Sciences* 21: 3237.
- Dos Santos, I. C., de Almeida, A. A. F., Pirovani, C. P., Costa, M. G. C., da Conceicao, A. S., Filho, W. S. S., Filho, M. A. C. and Gesteira, A. S. (2019) Physiological, biochemical and molecular responses to drought conditions in field-grown grafted and ungrafted citrus plants. *Environmental and Experimental Botany* 162: 406-420
- El-Sayed, O. M., El-Gammal, O. H. M. and Salama, A. S. M. (2014) Effect of ascorbic, proline and jasmonic acid foliar spraying on fruit set and yield of Manzanillo olive trees under salt stress. *Scientia Horticulturae* 176: 32-37
- Elsheery, N. I. and Cao, K. F. (2008) Gas exchange, chlorophyll fluorescence, and osmotic adjustment in two mango cultivars under drought stress. *Acta Physiologiae Plantarum* 30: 769-777.
- FAO, (2020) Available online at <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>.
- Fujita, T., Maggio, A., Rios, M. G., Stauffacher, C., Bressan, R. A. and Csonka, L. N. (2003) Identification of regions of the tomato - glutamyl kinase that are involved in allosteric regulation by proline. *Journal of Biological Chemistry* 278: 14203-14210.
- Gomes, F. P., Oliva, M. A., Mielke, M. S., Almeida, A. A. F. and Aquino, L. A. (2010) Osmotic adjustment, proline accumulation and membrane stability in leaves of *Cocos nucifera* submitted to drought stress. *Scientia Horticulturae* 126: 379-384.
- Gomi, K. (2020) Jasmonic Acid Pathway in Plants. Plant Genome and Resource Research Center, Faculty of Agriculture, Kagawa University, Miki, Kagawa, Japan.
- Guo, Z., Ouw Lu, S. and Zhong, Q. (2006) Differential responses of antioxidative system to chilling and drought in four rice cultivars differing in sensitivity. *Plant Physiology and Biochemistry* 44: 828-836.
- Gupta, A., Rico-Medina, A. and Cano-Delgado, A. I. (2020) The physiology of plant responses to drought. *Science* 368: 266-269
- Gupta, A. K., Singh, J., Kaur, N. and Singh, R. (1993) Effect of polyethylene glycol induced water stress on uptake introversion and transport of sugars in chickpea seedling. *Plant Physiology and Biochemistry* 31: 743-747.
- Gupta, D. K., Palma, J. M. and Corpas, F. J. (2018) Antioxidants and Antioxidant Enzymes in Higher Plants. Springer International Publishing AG, part of Springer Nature.
- Hasanuzzaman, M. and Tanveer, M. (2020) Salt and Drought Stress Tolerance in Plants, Signaling Networks and Adaptive Mechanisms. Springer International Publishing, Springer Nature Switzerland AG.
- Hasanuzzaman, M., Bhuyan, M. B., Zulfiqar, F., Raza, A., Mohsin, S. M., Mahmud, J. A., Fujita, M. and Fotopoulos, V. (2020) Reactive oxygen species and antioxidant defense in plants under abiotic stress: Revisiting the crucial role of a universal defense regulator. *Antioxidants* 9: 681.
- Hegar, H., Ueda, N. and Shal, S. V. (1996) Role of reactive oxygen metabolites in DNA damage and cell death in chemical hypoxic injury LLC-PK1 cells. *American Journal of Physiology* 271: 209-215.
- Irigoyen, J. J., Emerich, D. W. and Sanchez-Diaz, M. (1992) Water stress induced changes in concentrations of proline and total soluble sugars in nodulated alfalfa (*Medicago sativa* L.) plants. *Physiologia Plantarum* 84: 55-60.
- Kapoor, D., Bhardwaj, S., Landi, M., Sharma, A., Ramakrishnan, M. and Sharma, A. (2020) The impact of drought in plant metabolism: How to exploit tolerance mechanisms to increase crop production. *Applied Sciences* 10: 5692.
- Koch, K. E. (1996) Carbohydrate-modulated gene expression in plant. *Annual Review of Plant Physiology* 47: 509-515.
- Maness, N. (2010) Extraction and analysis of soluble carbohydrates. In: *Plant Stress Tolerance, Methods and Protocols* (ed. Sunkar, R.) Pp. 341-370. Springer Science and Business Media (Humana press).
- Manivannan, P., Jaleel, C. A., Sankar, B., Kishorekumar, A., Somasundaram, R., Lakshmanan, G. M. A. and Panneerselvam, R. (2007) Growth, biochemical modifications and proline metabolism in *Helianthus annuus* L. as induced by drought stress. *Colloids Surf B Biointerfaces* 59: 141-149.
- Memelink, J. (2009) Regulation of gene expression by jasmonate hormones. *Phytochemistry* 70: 1560-1570.
- Mittler, R. (2002) Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plant Science* 7: 405-410.
- Nakano, Y. and Asad, K. (1981) Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplast. *Plant, Cell and Environment* 22: 867-880.
- Nohong, B. and Nompo, S. (2015) Effect of water stress on growth, yield, proline and soluble sugars contents of Signal grass and Napier grass species. *American-Eurasian Journal of Sustainable Agriculture* 9: 14-21.
- Ortuno, M. F., Garcia-Orellana, Y., Conejero, W., Ruiz-Sanchez, M. C., Mounzer, O., Alarcon, J. J. and Torrecillas, A. (2006) Relationships between climatic variables and sap flow, stem water potential and maximum daily trunk shrinkage in lemon trees. *Plant and Soil* 279: 229-242.
- Rasheed, M., Hussain, A. and Mahnood, T. (2003) Growth analysis of hybrid maize as influenced by planting techniques and nutrient management. *Journal of Agriculture Biology* 5: 32-41.
- Sheng Wu, Q., Ning Zou, Y. and Xue Xia, R. (2006) Effect of water stress and arbuscular mycorrhizal fungi on reactive oxygen metabolism and antioxidant production by citrus (*Citrus tangerine*) roots. *European Journal of Soil Biology* 42: 166-172.

- Siddiqi, K. S. and Husen, A. (2019) Plant response to jasmonates: Current developments and their role in changing environment. *Bulletin of the National Research Centre* 43: 153.
- Smirnoff, N. (1993) The role of active oxygen in response of plants to water deficit and desiccation. *New Phytologist* 125: 27-58.
- Sullivan, C. Y. and Ross, W. M. (1979) Selecting for drought and heat resistance in grain sorghum. In: *Stress Physiology in Crop Plants* (eds. Mussel, H. and Staples, R. C.) Pp. 263-281. Wiley Interscience, New York.
- Turner, N. C. (1981) Techniques and experimental approaches for the measurement of plant water status. *Plant and Soil* 58: 339-366.
- Unuofin, J. O. and Lebelo, S. L. (2020) Antioxidant effects and mechanisms of medicinal plants and their bioactive compounds for the prevention and treatment of type 2 diabetes: An updated review. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2020.
- Wahbi, S., Wakrim, R., Aganchich, B., Tahi, H. and Serraj, R. (2005) Effects of partial rootzone drying (PRD) on adult olive tree (*Olea europaea*) in field conditions under arid climate; I. Physiological and agronomic responses. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 106: 289-301.
- Wang, J., Song, L., Gong, X., Xu, J. and Li, M. (2020) Functions of jasmonic acid in plant regulation and response to abiotic stress. *International Journal of Molecular Sciences* 21: 1446.
- Wang, W. B., Kim, Y. H., Lee, H. S., Kim, K. Y., Deng, X. P. and Kwak, S. (2009) Analysis of antioxidant enzyme activity during germination of alfalfa under salt and drought stresses. *Plant Physiology and Biochemistry* 47: 570-577.
- Wangm, S. Y. (1999) Methyl jasmonate reduces water stress in strawberry. *Journal of Plant Growth Regulation* 18: 127-134.
- Wasternack, C. (2014) Action of jasmonates in plant stress responses and development-Applied aspects. *Biotechnology Advances* 32: 31-39.

## Study of the physiological changes of Thomson Navel orange in response to foliar application of jasmonic acid under drought stress conditions

Katayoun Delfani<sup>1</sup>, Mahmoud Asadi<sup>1\*</sup>, Behrouz Golein<sup>2</sup>, Babak Babakhani<sup>1</sup> and Roghayeh Razeghi Jadid<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Department of Plant Sciences, Faculty of Biological Sciences, Tonekabon Branch, Islamic Azad University, Tonekabon, Iran

<sup>2</sup> Citrus and Subtropical Fruits Research Center, Horticultural Science Research Institute, Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), Ramsar, Iran

(Received: 01/11/2020, Accepted: 12/12/2020)

### Abstract

In order to evaluate the effects of different concentrations of jasmonic acid on the physiological changes of Thomson Navel orange under drought stress conditions, a factorial experiment was conducted based on a completely randomized design with three replications. The treatments included three levels of drought stress 100% of field capacity (as control), 75% of field capacity (mild drought stress) and 50% of field capacity (severe drought stress) as well as three concentrations of jasmonic acid 0, 100 and 200  $\mu\text{M}$ . The results showed that drought stress significantly reduced relative water content, plant water potential, leaf area index, stomatal conductance and total chlorophyll of Thomson Novel orange leaf, whereas ion leakage, malondialdehyde, soluble sugars, proline content and antioxidant enzyme activity increased under drought stress conditions. Also, it was found that foliar application of jasmonic acid was able to maintain the leaf water status (relative leaf water content and plant water potential), increase leaf area index, stomatal conductance, maintain cell membrane stability (by reducing ion and malondialdehyde leakage), maintain total chlorophyll at the optimal levels, increase the amount of compatible solutions (soluble sugars and proline) as well as increase the activity of catalase, superoxide dismutase, ascorbate peroxidase and peroxidase, and thus, reduce the negative effects of drought stress. Overall, the foliar application of jasmonic acid, especially at 100  $\mu\text{M}$  concentration, is recommended to reduce the negative effects of drought stress on Thomson Novel oranges.

**Keywords:** Membrane stability, Water potential, Compatible solutions, Catalase, Stomatal conductance

Corresponding author, Email: mahmoudasadi2000@gmail.com