

## بررسی پیش‌تیمار سالیسیلیک اسید، نانوآکسید روی و سدیم نیتروپروساید بر برخی پارامترهای فیزیولوژیک و فعالیت آنزیمی بنفشه معطر در شرایط تنش کم‌آبی

حمیده باقری<sup>۱</sup>، داود هاشم‌آبادی<sup>۱\*</sup>، بهمن پاسبان اسلام<sup>۲</sup>، شهرام صداقت‌حور<sup>۱</sup> و بهزاد کاویانی<sup>۱</sup>

<sup>۱</sup> گروه باغبانی، واحد رشت، دانشگاه آزاد اسلامی، رشت

<sup>۲</sup> بخش تحقیقات علوم زراعی و باغی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان آذربایجان شرقی، سازمان تحقیقات،

آموزش و ترویج کشاورزی، تبریز

(تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۸/۱۴، تاریخ پذیرش نهایی: ۱۴۰۱/۰۱/۲۳)

### چکیده

بنفشه معطر (*Viola odorata*) گیاهی علفی چندساله با ویژگی‌های زینتی و دارویی است. هدف از آزمایش حاضر، بررسی اثر سطوح مختلف تنش کم‌آبی و محلول‌پاشی با سالیسیلیک اسید، سدیم نیتروپروساید و نانوآکسید روی بر پارامترهای فیزیولوژیک، متابولیت‌های ثانویه و فعالیت آنزیمی بنفشه معطر بود. آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با دو فاکتور؛ تنش کم‌آبی در سه سطح (۵۵، ۶۵ و ۸۵ درصد ظرفیت زراعی یا FC خاک گلدان) و محلول‌پاشی‌ها شامل سالیسیلیک اسید (۲۰۰ و ۳۰۰ میلی‌گرم در لیتر)، نانوآکسید روی (۱۰۰۰ و ۱۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر) و سدیم نیتروپروساید (۲۰۰ و ۳۰۰ میکرومولار) در سه تکرار انجام شد. نتایج نشان داد که با افزایش تنش کم‌آبی، میزان ترکیبات فنلی، پرولین و فیتول، همچنین درصد متابولیت‌های ثانویه، فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان و پایداری غشای پلاسمایی افزایش یافت. بیشترین ترکیبات فنلی (۵۷/۰۷ میلی‌گرم در اسید گالیک در هر گرم وزن خشک) و میزان پرولین (۵۲/۴۷ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن تر)، در تیمار ۳۰۰ میکرومولار سدیم نیتروپروساید در ۵۵ درصد FC بدست آمد. بیشترین فعالیت آنزیم کاتالاز (۰/۱۹۸ واحد آنزیم بر میلی‌گرم بر پروتئین بر دقیقه) و پلی‌فنل اکسیداز (۰/۲۴۸ واحد آنزیم بر میلی‌گرم بر پروتئین بر دقیقه)، به ترتیب در تیمارهای ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر سالیسیلیک اسید و ۲۰۰ و ۳۰۰ میکرومولار سدیم نیتروپروساید، هر سه در ۵۵ درصد FC، بدست آمد. بیشترین مقدار فیتول (۲/۸۷ درصد) متعلق به تیمار شاهد در ۵۵ درصد FC بود. بیشترین میزان عناصر سدیم (۲۸/۶۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) و فسفر (۰/۶۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) در گیاهان شاهد در تنش ۵۵ درصد و پتاسیم (۴/۲۹ میلی‌گرم بر کیلوگرم)، آهن (۳۰۶ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن خشک) و درصد ماده خشک شاخساره (۲۶/۲۳) و ریشه (۲۷/۶۰)، به ترتیب در محلول‌پاشی با ۱۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر نانوآکسید روی در تنش ۸۵ درصد، ۱۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر نانوآکسید روی در تنش ۶۵ درصد، ۲۰۰ میکرومولار سالیسیلیک اسید در تنش ۸۵ درصد و ۱۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر نانوآکسید روی در تنش ۵۵ درصد مشاهده شد. در مجموع، استفاده از ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر سالیسیلیک اسید به صورت محلول‌پاشی علاوه بر بهبود شرایط رشد و نمو گیاه بنفشه معطر، اثرات منفی تنش کم‌آبی را تعدیل کرد و مقاومت گیاه در برابر تنش کم‌آبی را افزایش داد.

واژه‌های کلیدی: آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی، ذرات نانو، گیاهان زینتی - دارویی، متابولیت‌های ثانویه

## مقدمه

بنفشه معطر (*Viola odorata*) از خانواده ویولاسه (Violaceae) به‌عنوان یک گیاه با ارزش تجاری در نظر گرفته می‌شود. گیاه علفی، چندساله با ریزوم‌های خزنده منشعب و شاخه‌های خزنده زیرزمینی که بالغ بر ۲۰/۰۰۰ رقم دارد. بنفشه معطر یکی از مهم‌ترین گیاهان زینتی بومی مناطق سردسیر است و به دلایل مختلف از جمله توانایی گلدهی در طول سال و تنوع در رنگ و شکل گلبرگ و برگ، محبوبیت زیادی دارد. منشأ اصلی بنفشه معطر، نواحی مرطوب و سایه‌دار اروپا و آسیا است. این گیاه به‌طور عمده در نواحی شمالی ایران و منطقه البرز رویش دارد (Solgi and Taghizadeh, 2015).

کم‌آبی یکی از اثرگذارترین عوامل محدودکننده محیطی برای گیاهان است، که بیش از هر عامل محیطی دیگر رشد گیاهان را تحت تأثیر قرار می‌دهد. یکی از اثرات تنش کم‌آبی، برهم‌زدن تعادل تغذیه‌ای در گیاه است. به‌عنوان مثال، تنش کم‌آبی اثر معنی‌داری بر تغییر غلظت عناصر کم‌مصرف مانند سدیم، آهن، روی و مس در گیاه مریم‌گلی (*Salvia macrosiphon*) داشت (Sodaeizadeh and Mansouri, 2014). یکی دیگر از مضرات تنش‌ها در سیستم گیاهی، تولید انواع گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) از جمله رادیکال‌های سوپراکسید ( $O^-$ )، رادیکال‌های هیدروکسیل ( $OH^-$ ) و پراکسید هیدروژن ( $H_2O_2$ ) است. تغییر در فرآیندهای بیوشیمیایی، فیزیولوژیکی، آناتومیکی و مورفولوژیکی، مقاومت، تحمل، جبران و اجتناب از خشکی (توانایی بالا نگه‌داشتن پتانسیل آب)، زودگلدهی (تغییر مراحل فنولوژیک) و زود خفتگی، از مکانیزم‌های دفاعی گیاهان در برابر تنش کم‌آبی یا خشکی است (Harrison et al., 2014). استفاده از روش‌های صحیح تغذیه معدنی و استفاده از ترکیبات ضدتنش مانند انواع متابولیت‌های ثانویه، برخی راهکارهای دیگر کاهش اثرات زیان‌بار تنش کم‌آبی است. استفاده از سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی از جمله آنزیم‌هایی مانند کاتالاز (CAT)، آسکوربات پراکسیداز (APX)، سوپراکسید دیسموتاز (SOD) و گایاکول پراکسیداز

(GPX) از دیگر رویکردهای دفاعی گیاهان در برابر انواع تنش‌ها است (De Oliveira et al., 2018).

متابولیت‌های ثانویه از جمله ترکیبات فنلی با داشتن خاصیت آنتی‌اکسیدانی، نقش دفاعی در برابر انواع تنش‌های زیستی و غیرزیستی دارند (Shibli et al., 2007). سالیسیلیک اسید (SA) یا اورتو‌هیدروکسی بنزوئیک اسید یک تنظیم‌کننده رشد گیاهی از گروه فنل‌ها است و به‌عنوان یک مولکول علامت (سیگنال) در تنظیم فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی و بسیاری از فرآیندهای فیزیولوژیک مؤثر است. این ماده نقش مهمی در مواجهه گیاهان با تنش‌های زنده و غیرزنده ایفا می‌کند. گزارش‌های اولیه بیانگر نقش تنظیم‌کنندگی آن در تنش‌های اکسیداتیو می‌باشد (Sivaci and Elmas, 2012). سالیسیلیک اسید باعث تغییر برخی صفات مورفولوژیک و فیزیولوژیک از جمله میزان پرولین و اسانس در پروانش (*Catharanthus roseus* L.) (Idress et al., 2013) و چمن ژاپنی (*Zoysia species*) (Beiraghdar et al., 2014) شد. به‌نظر می‌رسد SA با تنظیم فرآیندهای فیزیولوژیک و بیوشیمیایی در مواجهه با تنش‌های زنده و غیرزنده، باعث افزایش قابل‌توجهی در عملکرد گیاه می‌شود و با تأثیر مثبت روی فتوسنتز و رشد گیاه در شرایط تنش، تجمع پرولین را افزایش می‌دهد و باعث تسریع در بهبود رشد گیاه می‌شود (Shibli et al., 2007). تیمار با SA منجر به تجمع آب‌سزیک اسید (ABA) و ساخت پروتئین‌های ضدتنش می‌شود (Sivaci and Elmas, 2012). سطوح مختلف تنش شوری اثر نامساعدی روی صفات رویشی و زایشی گیاه همیشه‌بهار (*Calendula officinalis* L.) داشت، درحالی‌که کاربرد SA باعث تعدیل این اثرات منفی شد (Kamkari et al., 2016).

سدیم نیتروپروساید (SNP) یکی دیگر از موادی است که اخیراً به‌منظور کاهش اثرات تنش‌ها در گیاهان مورد آزمایش قرار گرفته است. این ماده به‌عنوان واسطه در عمل تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی شرکت می‌کند و در انتقال پیام و پاسخ به تنش‌های زیستی و غیرزیستی دخالت دارد. این ماده به‌عنوان یک ترکیب رهاکننده اکسید نیتریک (NO) نقش

است. نانواکسید روی (ZnO) از جمله نانوذرات مورد استفاده در پژوهش‌های کشاورزی است که دارای سطح ویژه بسیار بالایی است. تیمار نانو ZnO در نعنای فلفلی (*Mentha spicata*) باعث افزایش میزان عنصر روی در گیاه و افزایش شاخص‌های رشدی شد (Zare Dehabadi et al., 2010). Burman و همکاران (۲۰۱۴) و Das و Roychoudhury (۲۰۱۴) نشان دادند که نانو ZnO عملکرد گیاه نخودفرنگی (*Pisum sativum* L.) را افزایش داد. تیمار نانو ZnO در غلظت ۱۰ میلی‌گرم بر لیتر باعث افزایش کلروفیل و کاروتنوئید در گیاه کرچک (*Ricinus communis*) شد (Esparham et al., 2017). احتمالاً یکی از دلایل کاهش محتوای کلروفیل در غلظت‌های بالا، ایجاد تنش اکسیداتیو و تخریب آن‌ها به‌وسیله انواع ROS است. غلظت‌های بالای نانو ZnO باعث کاهش رنگدانه‌های فتوسنتزی می‌شود (Lin and Aarts, 2012). استفاده از عنصر روی در لوبیا (*Phaseolus vulgaris*) با افزایش کربوهیدرات‌های محلول بر میزان ماده خشک گیاه افزود و این افزایش نتیجه نقش کلیدی عنصر روی در تحریک فعالیت‌های فتوسنتزی و افزایش میزان فرآورده‌های گیاهی بود (Fusconi et al., 2007).

بنفشه معطر از لحاظ دارویی، زینتی و خوراکی حائز اهمیت است و به‌دلیل داشتن مواد مؤثره، به یک گیاه دارویی منحصر به فرد تبدیل شده است. تا کنون پژوهشی در رابطه با تأثیر تنش کم‌آبی بر پارامترهای مورفولوژیک، فیزیولوژیک و بیوشیمیایی (مانند متابولیت‌های ثانویه) در بنفشه معطر انجام نشده است. بنابراین، هدف از پژوهش حاضر، بررسی اثر سطوح مختلف تنش کم‌آبی و محلول‌پاشی با ترکیبات ضدتنش (SA، SNP و ZnO) بر غلظت برخی عناصر، پارامترهای فیزیولوژیک، متابولیت‌های ثانویه و فعالیت آنزیمی بنفشه معطر بود.

#### مواد و روش‌ها

**تهیه و کاشت نمونه گیاهی:** آزمایش در فروردین سال ۱۳۹۷ در مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان

غیرمستقیم بسیار مهمی در مقابله با تنش‌ها ایفا می‌کند (Fan et al., 2012). سدیم نیتروپروساید از طریق کاهش نشت یونی و سرعت تنفس موجب بسته‌شدن روزنه‌ها و افزایش مقاومت روزنه‌ای و تحمل گیاه به تنش‌های کم‌آبی و اکسیداتیو می‌شود (Tian and Li, 2007). بوته‌های آفتاب‌گردان (*Helianthus annuus*) تیمار شده با ۰/۵ میلی‌مولار SNP در شرایط تنش، رشد بهتری نسبت به گیاهان تیمار نشده داشتند و علایم کاهش کلروز و نکروز برگ‌ها و کاهش محتوای آب نسبی در برگ‌ها با کاربرد این ماده مشاهده شد (Laspina et al., 2005). تیمار ۵۰ میکرومولار SNP در دندروبیوم (*Dendrobium huoshanense*)، محتوای آب نسبی برگ‌ها و میزان آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان را افزایش داد، اما غلظت‌های بالاتر این ماده، اثرات تنش را تشدید کرد (Fan et al., 2012). سدیم نیتروپروساید در مارتیغال (*Silybium marianum*) قرار گرفته در شرایط کم‌آبی، با افزایش پایداری غشای سلول، اثرات منفی ناشی از تنش را کاهش داد (Zangani et al., 2017).

عنصر روی به‌عنوان کوآنزیم در ساختار و فعال‌سازی بسیاری از آنزیم‌های گیاهی نقش دارد و عنصر ضروری برای ساخت این آنزیم‌ها (به‌ویژه آنزیم‌های مسیر بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه) به‌شمار می‌رود (Zare Dehabadi et al., 2010). کمبود این عنصر می‌تواند منجر به کاهش فتوسنتز و کاهش میزان کربوهیدرات و پروتئین شود که در نهایت کاهش عملکرد گیاه را به‌دنبال دارد. بنابراین، با افزایش میزان عنصر روی در گیاه، فعالیت برخی آنزیم‌ها و تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی افزایش می‌یابد (Fusconi et al., 2007). عنصر روی نقش مهمی در برخی فعالیت‌های متابولیسمی دیگر از جمله تنظیم میزان بازبودن روزنه‌ها، سنتز پروتئین‌ها، RNA و DNA، فتوسنتز، تبدیل قند به نشاسته، متابولیسم اکسین، حفظ غشاهای زیستی، تولید کلروفیل، عملکرد دانه‌گرده، باروری و جوانه‌زنی بذر و مقاومت به برخی عوامل بیماری‌زا دارد (Cakmak, 2000; Zare Dehabadi et al., 2010; Esparham et al., 2017).

در سال‌های اخیر، نقش برخی ذرات نانو در بهبود رشد و بهره‌وری گیاهان تحت شرایط نامساعد محیطی نشان داده شده

جدول ۱- خصوصیات فیزیکی و شیمیایی خاک بستر کشت

هدایت الکتریکی	اسیدیته کل	کربنات	درصد	درصد	فسفر قابل جذب	پتاسیم	درصد	درصد	درصد
$EC \times 10^3$	pH	T.N.V	O.C	T.N	p.p.m.	p.p.m.	ازت کل	سیلت	رس
۴/۵۴	۷/۳۵	۷/۲۵	۳/۳۹	۰/۳۴	۵۱/۶	۳۷۵	۵۶	۳۲	۱۲

آذربایجان شرقی شهر تبریز با عرض جغرافیایی ۳۸ درجه و ۸ دقیقه شمالی و طول جغرافیایی ۴۶ درجه و ۳۱ دقیقه با ارتفاع ۱۴۵۶ متر از سطح دریا انجام شد. نشاهای بنفشه معطر در مرحله ۲-۴ برگی در تاریخ ۸ فروردین ۱۳۹۷ از دره مکیدی واقع در شهرستان کلبر استان آذربایجان شرقی با مختصات طول جغرافیایی ۳۸ درجه و ۵۲ دقیقه شمالی و عرض جغرافیایی ۴۷ درجه و ۲ دقیقه شرقی با ارتفاع ۱۱۴۴ متر از سطح دریا جمع‌آوری شدند و در گلدان‌های پر شده با خاک باغچه دارای بافت لوم- شنی کاشته شدند. پس از آماده‌سازی بستر در گلدان‌های با قطر دهانه ۱۵ سانتی‌متر و ارتفاع ۱۴ سانتی‌متر، عملیات انتقال نشاهای بنفشه معطر زینتی صورت گرفت. خصوصیات فیزیکی و شیمیایی خاک بستر کاشت در جدول ۱ ارائه شده است. در هر پلات، چهار گلدان و در هر گلدان یک بوته کاشته شد. همچنین در طی مراحل رشد، وجین علف‌های هرز نیز انجام شد.

**طرح آزمایشی و تیمارهای مورد استفاده:** این آزمایش به صورت فاکتوریل در قالب طرح بلوک کاملاً تصادفی در سه تکرار اجرا شد. تیمارهای آزمایشی شامل؛ تنش کم‌آبی در سه سطح (۵۵، ۶۵ و ۸۵ درصد ظرفیت زراعی یا FC) به عنوان فاکتور اول و محلول‌پاشی در هفت سطح شامل شاهد، ZnO در دو سطح (۱۰۰۰ و ۱۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر)، SA در دو سطح (۲۰۰ و ۳۰۰ میلی‌گرم در لیتر) و SNP در دو سطح (۲۰۰ و ۳۰۰ میکرومولار) به عنوان فاکتور دوم بودند.

**طرز تهیه تیمارهای آزمایشی:** برای تیمار ۱۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر ZnO، ۱/۸ گرم از پودر نانو ZnO (Merck, Germany) در ۱۰ میلی‌لیتر اتانول حل شد و به حجم ۱۸۰۰ میلی‌لیتر رسانده شد. برای تیمار ۱۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر ZnO، ۲/۷ گرم از پودر ZnO در ۱۰ میلی‌لیتر اتانول حل شد و به حجم ۱۸۰۰

میلی‌لیتر رسانده شد. برای تیمار ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر SA، مقدار ۰/۳۶ گرم از پودر SA (Merck, Germany) در آب مقطر حل شد و به حجم ۱۸۰۰ میلی‌لیتر رسانده شد. برای تیمار ۳۰۰ میلی‌گرم در لیتر SA، مقدار ۰/۵۴ گرم از پودر SA در آب مقطر حل شد و به حجم ۱۸۰۰ میلی‌لیتر رسانده شد. برای تیمار ۲۰۰ میکرومولار SNP، مقدار ۰/۰۶ گرم از پودر SNP (Merck, Germany) در ۱۰ میلی‌لیتر حلال اتانول حل شد و به حجم ۱۰۰۰ میلی‌لیتر رسانده شد. از همه محلول‌های تهیه‌شده فوق، روی هر گلدان مقدار ۵۰ میلی‌لیتر اسپری گردید.

آزمایش در مجموع با ۲۱ تیمار، سه تکرار، ۶۳ پلات و در هر پلات چهار گلدان و در مجموع با ۲۵۲ گلدان در فضای باز انجام شد. دو هفته پس از استقرار بوته‌ها در بستر کشت، محلول‌پاشی به میزان ۵۰ میلی‌لیتر برای هر گلدان در دو مرحله به فاصله یک هفته از یکدیگر انجام شد و برای تیمار شاهد از آب مقطر برای محلول‌پاشی استفاده گردید. اعمال تنش کم‌آبی، یک هفته پس از دومین مرحله محلول‌پاشی براساس FC بستر به روش وزنی آغاز شد و تا زمان زرد شدن برگ‌ها که مقارن با پایان آزمایش بود ادامه یافت (Sadeghian et al., 2013). گیاهان در محیط باز و در معرض تغییرات دمایی و نوری، در دامنه قابل قبول، قرار داده شدند. شرایط برای همه گیاهان و تیمارها یکسان بود و تغییرات نیز اثرات یکسانی داشتند و هرگز با اثرات تیمارهای مورد مطالعه تداخل نداشتند. برداشت نمونه‌ها چهار ماه پس از اعمال تنش کم‌آبی و در پایان آزمایش انجام شد و اعمال تنش کم‌آبی تا پایان آزمایش ادامه داشت.

**روش وزنی تعیین رطوبت FC:** یک گلدان حاوی خاک در یک تشت پلاستیکی که دو سوم آن با آب پر شده بود قرار داده شد. گلدان حاوی خاک اشباع به آرامی از آب خارج شد و بلافاصله برای تعیین درصد رطوبت در حالت اشباع توزین

تعیین ترکیبات فنلی و میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان کاتالاز (CAT) و پلی‌فنل اکسیداز (PPO) استفاده شد.

**پرولین:** برای اندازه‌گیری پرولین برگ از روش Bates و همکاران (۱۹۷۳) استفاده شد. بدین منظور، ۰/۱ گرم از برگ گیاه وزن گردید و در هاون چینی به‌همراه ۳ میلی‌لیتر سولفور سالیسیلیک اسید ۳ درصد به‌طور کامل ساییده شد و سپس با دستگاه سانتریفیوژ (HERMLE, Z 207, Germany) با دور ۱۲۰۰۰ در دقیقه به‌مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شد. سپس ۲ میلی‌لیتر از عصاره بالایی محلول سانتریفیوژ شده، داخل فالدکون ریخته شد و به آن ۲ میلی‌لیتر معرف ناین‌هیدرین و ۲ میلی‌لیتر استیک اسید گلاسیل اضافه گردید. سپس فالدکون‌ها به‌مدت یک ساعت در حمام بن‌ماری در دمای ۱۰۰ درجه سلسیوس قرار داده شدند. در مرحله بعد، نمونه‌ها در حمام یخ به‌مدت ۳۰ دقیقه نگهداری شدند. در مرحله آخر، ۴ میلی‌لیتر تولوئن به محتوای هر فالدکون اضافه گردید و به‌مدت ۳۰ دقیقه توسط دستگاه لرزا (شیکر) مخلوط شد. در این مرحله، محلول به دو فاز تبدیل شد، لایه رویی که به رنگ صورتی تا قرمز بود، برداشت گردید و میزان جذب لایه فوقانی که حاوی پرولین و تولوئن بود با دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۲۰ نانومتر خوانده شد. برای محاسبه مقدار پرولین (میکرومول پرولین بر گرم وزن تر) از منحنی استاندارد پرولین و فرمول زیر استفاده شد.

$$\text{گرم نمونه} = \frac{\text{میلی لیتر تولوئن} \times \text{میکروگرم پرولین بر میلی لیتر}}{5} = \frac{115.13 \text{ میکروگرم بر میکرومول}}{\text{پرولین}}$$

از پرولین خالص برای تهیه غلظت‌های ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰ و ۴۰۰ میکرومولار پرولین و تهیه منحنی استاندارد استفاده شد.

**پایداری غشای سلول:** از هر واحد آزمایشی، ۲۰ دیسک برگ‌گی تهیه شد. تعداد پنج نمونه از دیسک‌ها (شاهد) در ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر و پنج نمونه دیگر (تیمار خشکی) در ۱۰ میلی‌لیتر محلول PEG ۶۰۰۰ (پلی‌اتیلن گلیکول) (۴۰ درصد) قرار داده شد. پس از ۲۴ ساعت، مواد محلول دور ریخته شد و به هر دو دسته از نمونه‌ها، ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر اضافه شد و پس از ۲۴ ساعت، هدایت الکتریکی آب محتوی نمونه‌ها با

گردید. گلدان، بعد از گذشت ۱۲ ساعت مجدداً توزین گردید. این عمل با فواصل زمانی ۲ ساعت تکرار شد و زمانی که در ۳ قرائت متوالی، وزن گلدان به حالت ثابت رسید، خاک گلدان در دمای ۱۰۵ درجه سانتی‌گراد آون به‌مدت ۲۴ ساعت خشک شد. از رابطه زیر درصد رطوبت وزنی در حالت FC در تیمارهای ۵۵، ۶۵ و ۸۵ درصد محاسبه گردید (Smith and Mullins, 1991).

$$\theta_{FC} = \left( \frac{\text{وزن خاک خشک آون} - \text{وزن خاک مرطوب}}{\text{وزن خاک خشک آون}} \right) \times 100$$

**درصد ماده خشک شاخساره و ریشه:** در پایان آزمایش، بوته‌ها به‌طور کامل از گلدان خارج گردیدند و از قسمت طوقه بریده شدند. شاخساره‌ها و ریشه‌های تهیه‌شده، در پاکت قرار داده شدند و به‌مدت ۲۴ ساعت در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد در آون الکتریکی خشک شدند. سپس با ترازوی دیجیتال توزین و درصد ماده خشک شاخساره طبق فرمول زیر بدست آمد.

$$100 \times \frac{\text{وزن خشک}}{\text{وزن تر}} = \text{درصد ماده خشک شاخساره و ریشه}$$

**ترکیبات فنلی:** برای ارزیابی محتوای کل ترکیبات فنولی، از معرف Folin-Ciocalteu استفاده شد. به این ترتیب، ۰/۵ میلی‌لیتر از این معرف به ۰/۵ میلی‌لیتر عصاره استخراج‌شده گیاهی و استانداردهای گالیگ اسید اضافه گردید و سپس به مخلوط حاصل ۴ میلی‌لیتر سدیم کربنات یک مولار اضافه شد. پس از ۱۵ دقیقه نگهداری در دمای محیط، جذب نمونه‌ها در طول موج ۷۶۵ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر (HACH, DR 6000) خوانده شد. نتایج به‌صورت میلی‌گرم هم‌ارز گالیگ اسید بر گرم وزن خشک گزارش گردید (Ordonez et al., 2006). برای تهیه عصاره آنزیمی، ۰/۱ گرم از بافت تازه برگ گیاه در نیتروژن مایع ساییده شد و در یک میلی‌لیتر بافر سدیم فسفات ۵۰ میلی‌مولار (pH=۷) حاوی یک میلی‌مولار EDTA حل گردید. ترکیب حاصل در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ دقیقه با سرعت ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. از محلول شفاف رویی که حاوی عصاره آنزیمی بود، جهت

مقدار جذب نوری در طول موج ۴۱۰ نانومتر در فواصل زمانی ۵ ثانیه‌ای به مدت ۲ دقیقه خوانده گردید و منحنی تغییرات جذب نور در مدت ۲ دقیقه رسم شد. سپس فعالیت آنزیمی برحسب تغییرات واحد جذب در دقیقه به ازای هر میلی‌گرم پروتئین براساس تغییرات واحد جذب در دقیقه محاسبه شد.

**عناصر معدنی:** مقدار ۱/۲۵ گرم از نمونه‌های گیاهی در دمای ۴۸۰ درجه سلسیوس به مدت ۲ ساعت خشک شد. پس از خارج کردن نمونه‌ها از کوره، ۱۰ میلی‌لیتر از محلول اسید رقیق (۳۰۰ میلی‌لیتر HCl غلیظ و ۱۰۰ میلی‌لیتر HNO<sub>3</sub> غلیظ که مجموعاً با آب مقطر به حجم یک لیتر رسانده شد) به آن اضافه گردید و در دمای ۱۰۰ درجه سلسیوس به مدت ۳۰ دقیقه حرارت داده شد و از خشک شدن آن جلوگیری گردید. پس از سرد شدن، محتویات بوتله چینی با استفاده از کاغذ صافی شماره ۴۲ به داخل بالن ۲۵ میلی‌لیتری صاف گردید و با آب مقطر به حجم رسانده شد (Westerman, 1990). برای نمونه‌هایی با ماده خشک کم، ۰/۵ گرم از نمونه گیاهی توزین شد و پس از برداشتن از کوره با ۵ میلی‌لیتر از مخلوط دو اسید حرارت داده شد و در پایان به حجم نهایی ۱۰ میلی‌لیتر رسانده شد. در داخل این عصاره، غلظت عناصر فسفر، سدیم و آهن اندازه‌گیری گردید (Wolf et al., 2003). در نهایت غلظت سدیم برحسب گرم بر کیلوگرم ماده خشک محاسبه شد (Waling et al., 1989). اندازه‌گیری آهن در عصاره‌های گیاهی با جذب اتمی (SHIMADZU, AA-6300, USA) صورت گرفت (Waling et al., 1989). اندازه‌گیری غلظت فسفر عصاره‌های گیاهی با روش وانادومولیدو فسفریک اسید یا روش زرد انجام شد (Olsen and Sommers, 1982). اندازه‌گیری پتاسیم به روش نشر شعله‌ای (فلیم‌فتومتر) انجام گردید (Waling et al., 1989).

**آلکالوئید ویولین:** برای عصاره‌گیری از روش Kern و همکاران (۱۹۹۸) و Milo و همکاران (۱۹۸۸) استفاده شد. مقدار یک گرم از بافت گیاهی پودر شده با ۴۰ میلی‌لیتر استیک اسید ۲/۵ درصد به مدت ۲۰ دقیقه به وسیله سونیکاتور عصاره‌گیری شد. بعد از سانتریفیوژ (HERMLE, Z207 A,

استفاده از EC متر برحسب  $\mu\text{s/cm}$  تعیین شد. سپس نمونه‌ها به مدت ۱۵ دقیقه در اتوکلاو قرار داده شدند و هدایت الکتریکی نمونه‌ها مجدداً خوانده شد. درصد خسارت ناشی از تنش کم‌آبی با توجه به رابطه درصد خسارت به پایداری غشای سلولی تعیین گردید (Blum and Ebercon, 1981).

$$= 1 - [(1 - (T_1/T_2)) / (1 - (C_1 - C_2))] \times 100$$

خسارت به پایداری غشای سلول در فرمول بالا؛  $C_1$  و  $C_2$  به ترتیب هدایت الکتریکی نمونه‌های شاهد در قرائت‌های اول و دوم و  $T_1$  و  $T_2$  به ترتیب هدایت الکتریکی نمونه‌های تیمار شده با PEG در قرائت‌های اول و دوم برحسب  $\mu\text{s/cm}$  است.

**کاتالاز:** مقدار ۰/۲۵ گرم بافت تازه برگ با کمک نیتروژن مایع در هاون چینی آسیاب شد و به بافت آسیاب شده، یک میلی‌لیتر بافر فسفات ۵۰ میلی‌مولار (pH=۷) حاوی ۰/۵ مولار EDTA و PVPP دو درصد اضافه گردید. محلول حاصل در دمای ۴ درجه سلسیوس به مدت ۲۰ دقیقه در ۱۴۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ (HERMLE, Z 207, Germany) شد. سپس محلول رویی برای سنجش فعالیت آنزیم‌های SOD, POD و CAT مورد استفاده قرار گرفت (Chance and Maehly, 1955). پس از آماده‌سازی عصاره پروتئینی، به منظور سنجش فعالیت سینتیکی آنزیم CAT، ۲/۵ میلی‌لیتر بافر فسفات (۰/۵ و pH=۷) با ۰/۳ میلی‌لیتر آب اکسیژنه ۳ درصد در حمام یخ با یکدیگر مخلوط شدند و بلافاصله ۰/۲ میلی‌لیتر عصاره آنزیمی به آن افزوده شد. منحنی تغییرات جذب در طول موج ۲۴۰ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر (HACH, DR 6000) خوانده شد. فعالیت آنزیمی برحسب تغییرات واحد جذب در دقیقه به ازای هر میلی‌گرم پروتئین براساس تغییرات واحد جذب در دقیقه محاسبه گردید (Chance and Maehly, 1955).

**پلی‌فنل اکسیداز:** برای تعیین مقدار PPO از روش Lowry و همکاران (۱۹۵۱) استفاده شد. مخلوط واکنش شامل ۲۰۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی و ۱۰۰۰ میکرولیتر بافر فسفات پتاسیم و ۸۰۰ میکرولیتر متیل کوکتل ۰/۰۲ مولار تهیه شد و

شد (Justesen *et al.*, 1998). از استانداردهای گالیک اسید، کاتچین، کافئیک اسید، کلرژنیک اسید و کوئرستین برای اندازه‌گیری ترکیب‌ها در گستره غلظت (۰/۰۰۰۱ تا یک میلی‌گرم بر لیتر) و به روش استاندارد خارجی استفاده شد. منحنی کالیبراسیون از ترسیم سطح زیر پیک استانداردها بر حسب غلظت محلول‌های استاندارد بدست آمد.

تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار آماری SAS نسخه ۹/۲ انجام شد و برای مقایسه میانگین داده‌ها از آزمون حداقل تفاوت معنی‌دار (LSD)، در سطح احتمال پنج درصد استفاده گردید. نمودارها به وسیله نرم‌افزار Excel رسم شدند.

### نتایج و بحث

**درصد ماده خشک ریشه:** نتایج تجزیه واریانس داده‌ها (جدول ۲) نشان داد که اثر ساده تنش کم‌آبی، محلول‌پاشی (SA، SNP و ZnO) و اثر متقابل این دو فاکتور بر درصد ماده خشک ریشه بنفشه معطر در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود. نتایج مقایسه میانگین اثر متقابل تنش کم‌آبی و محلول‌پاشی نشان داد که با افزایش تنش کم‌آبی، درصد ماده خشک ریشه بنفشه معطر افزایش یافت و ZnO در هر سه سطح FC و سپس تیمار SNP، درصد ماده خشک ریشه را افزایش دادند. بیشترین درصد ماده خشک ریشه (۲۷/۶۰ درصد) در تیمار ۱۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر ZnO در ۵۵ درصد FC بدست آمد (شکل ۱).

ریشه به‌عنوان اندام اصلی گیاه در استقرار و پایداری آن اهمیت ویژه‌ای دارد. اثرهای نامطلوب تنش کم‌آبی بر رشد گیاه می‌تواند با توسعه ریشه، جبران و باعث افزایش جذب آب توسط گیاه شود (Turner, 1986). در این آزمایش، SNP با کاهش اثرات منفی تنش کم‌آبی، باعث افزایش ماده خشک ریشه در گیاه بنفشه معطر شد و بیشترین ماده خشک ریشه مربوط به تیمار ZnO بود. محلول‌پاشی با غلظت ۲۵ میکرومولار SNP تحت تنش کم‌آبی، باعث افزایش وزن خشک ریشه و اندام هوایی در گیاه کلزا (*Brassica napus* L.) شد (Nikravesht *et al.*, 2016). این ماده در شرایط تنش کم‌آبی، به‌عنوان یک مولکول پیام‌آور، با بستن روزنه‌ها و کاهش

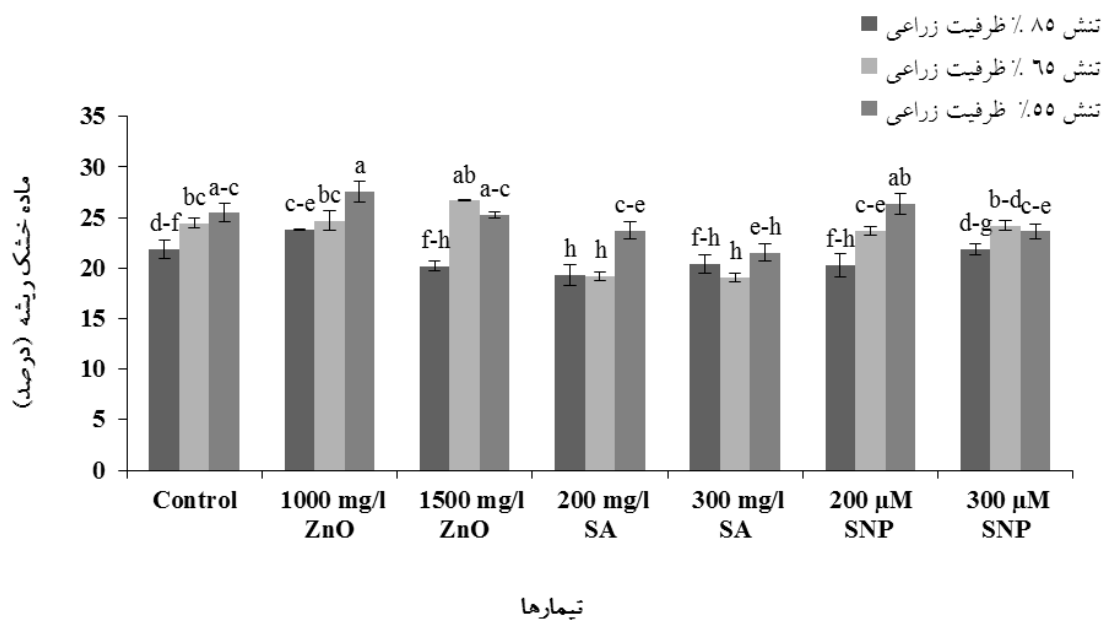
و صاف‌کردن، عصاره‌گیری برای بار دوم تکرار شد. محلول‌ها صاف گردیدند و ترکیب شدند. سپس فاز آبی، به‌منظور چربی‌زدایی، با ۲۸ میلی‌لیتر هگزان مخلوط گردید و تکان داده شد. دو فاز تشکیل‌شده به‌وسیله قیف جداکننده از هم جدا گردیدند. در مرحله بعد، pH فاز آبی با آمونیاک قلیایی و بعد فاز آبی به‌وسیله کلروفرم - پروپانول (به نسبت ۳ به ۱) سه بار و هر بار با ۴۵ میلی‌لیتر عصاره‌گیری شد و توسط روتاری تغلیظ گردید. مقدار ۲/۵ میلی‌لیتر متانول به باقیمانده محلول اضافه شد و به‌وسیله کاغذ صافی ۰/۴۵ میکرومولار صاف گردید. برای آنالیز عصاره، از دستگاه کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) (Agilent 1200, Germany) استفاده شد. میزان جریان (Flow rate) برابر ۰/۸ میلی‌لیتر در دقیقه و ترکیب فاز متحرک به‌کار برده شده، استونیتریل و بافر استات سدیم با pH= ۳/۲ (یک گرم استات سدیم در ۳۹۰ میلی‌لیتر آب) بود. نوع ماده پرکننده، C<sub>18</sub> Reversed 390 و طول ستون، ۲۵ سانتی‌متر و اندازه ذرات پایه، ۵ میکرومتر بود. دتکتور استفاده‌شده، UV با طول‌موج ۲۸۰ نانومتر و حجم هر بار تزریق، برابر ۲۰ میکرولیتر بود. دمای اتاق برای انجام آزمایش، ۲۵ درجه سانتی‌گراد در نظر گرفته شد.

**فیتول:** مقدار ۰/۲ گرم از گیاه خشک آسیاب‌شده به میکروتیوب منتقل گردید و برای استخراج اولیه از ۲ میلی‌لیتر حلال (شامل ۸۵ درصد متانول و ۱۵ درصد استیک اسید به مدت ۲۴ ساعت) استفاده شد. بعد از ۲۴ ساعت، نمونه‌ها به مدت ۱۵ دقیقه در معرض ارتعاشات فراصوتی قرار گرفتند. سپس نمونه‌ها در دمای صفر درجه و ۱۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ (HERMLE, Z207 A, Germany) شدند. فاز رویی جدا شد و روی بقیه، هگزان نرمال ریخته شد و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای صفر درجه و ۱۰۰۰ دور در دقیقه درون سانتریفیوژ قرار داده شد. سپس، با سرنگ ترکیب‌های پلی‌فنلی (فاز زیرین) کشیده شد و پس از عبور از فیلتر ۰/۲۲ میکرومتر تا زمان آنالیز با دستگاه HPLC (Agilent 1200, Germany) در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد در فریزر نگهداری

جدول ۲- آنالیز واریانس اثر سالیسیلیک اسید، نانواکسید روی و سدیم نیتروپروساید همراه با تنش کم آبی روی ماده خشک شاخساره و ریشه، پرولین و عناصر معدنی در بنفشه معطر

میانگین مربعات							درجه	منبع تغییرات
پتاسیم	فسفر	آهن	سدیم	پرولین برگ	ماده خشک ریشه	ماده خشک شاخساره	آزادی	
۳۸۵۷۱۴۲ <sup>ns</sup>	۰/۰۰۲ <sup>ns</sup>	۴۷۶/۰۰ <sup>ns</sup>	۳۰۴۷۶/۰۰ <sup>ns</sup>	۹/۳۳ <sup>ns</sup>	۹/۹۰*	۴۴/۲۰**	۲	تکرار
۴۹۱۶۷۱۴۲**	۰/۰۰۳ <sup>ns</sup>	۳۱۵۸/۰۰**	۹۴۱۱۴/۰۰*	۵۹۰/۰۰**	۱۷/۱۰**	۲/۱۵ <sup>ns</sup>	۲	تنش کم آبی (A)
۴۳۱۰۶۱۹۰**	۰/۰۰۵*	۳۱۹۶/۰۰**	۲۰۳۲۰/۰۰**	۸۸۳/۹۹**	۱۹/۵۲**	۷/۲۰**	۶	محلول پاشی ها (B)
۱۸۷۳۵۴۷۶**	۰/۰۰۸ <sup>ns</sup>	۲۱۷۲/۰۰**	۳۸۱۷۱۴/۰۰**	۲۱۰/۰۰**	۲۱/۳۳**	۸/۵۲**	۱۲	A × B
۳۸۵۷۱۴۳**	۰/۰۱	۴۷۶/۱۹	۳۰۴۷۶/۱۹	۹/۳۳	۲/۳۴	۳/۵۴	۴۰	خطا
۵/۲۷	۱۸/۸۴	۹/۳۱	۸/۳۱	۱۱/۳۴	۶/۶۴	۹/۱۷	-	ضریب تغییرات (C.V.)

ns، \* و \*\*: به ترتیب تفاوت غیر معنی دار و تفاوت معنی دار در سطح احتمال یک و ۵ درصد

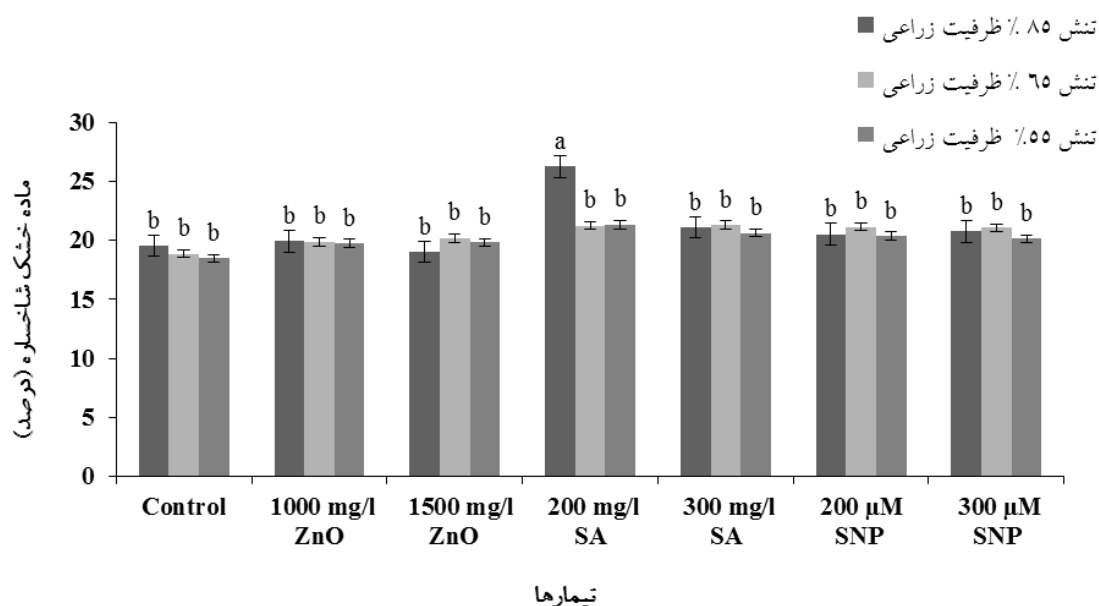


شکل ۱- مقایسه میانگین اثر متقابل ترکیبات ضدتنش (سالیسیلیک اسید، نانواکسید روی و سدیم نیتروپروساید) و تنش کم آبی بر ماده خشک ریشه در گیاه بنفشه معطر. ZnO: نانواکسید روی، SA: سالیسیلیک اسید، SNP: سدیم نیتروپروساید. در هر ستون میانگین های دارای حروف مشابه براساس آزمون LSD در سطح ۵ درصد تفاوت معنی داری ندارند.

ایجاد تنش اکسیداتیو و سمیت شدید نانواکسید روی می تواند اثر بازدارنده داشته باشد (Esparham et al., 2017) که با نتایج بدست آمده در این تحقیق مطابقت دارد.

درصد ماده خشک شاخساره: نتایج تجزیه واریانس داده ها نشان داد که اثر ساده محلول پاشی و اثر متقابل تنش کم آبی و

تعرق و نیز افزایش توسعه ریشه های نابه جا، باعث افزایش طول ریشه ها شد و ماده خشک ریشه را افزایش داد (Yildiztugay et al., 2014). همچنین، محلول پاشی نانواکسید روی در گیاه کرچک (۱۰ میلی گرم بر لیتر) طول ریشه را در مقایسه با تیمار شاهد افزایش داد و در سطوح بالا نیز به علت

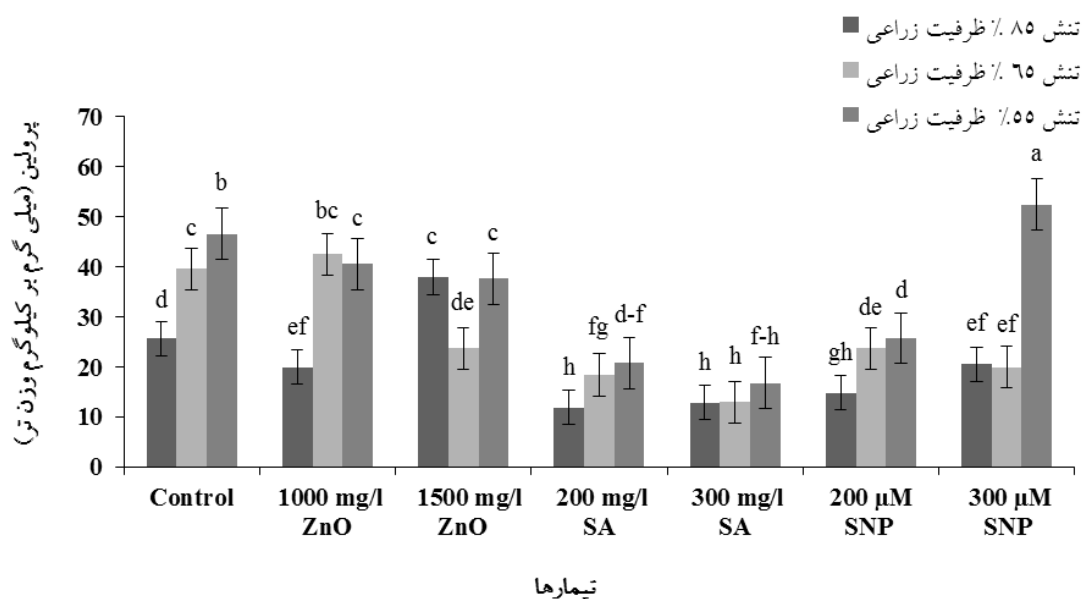


شکل ۲- مقایسه میانگین اثر متقابل ترکیبات ضد تنش (سالیسیلیک اسید، نانو اکسید روی و سدیم نیتروپروساید) و تنش کم آبی بر ماده خشک شاخساره در گیاه بنفشه معطر. ZnO: نانو اکسید روی، SA: سالیسیلیک اسید، SNP: سدیم نیتروپروساید. در هر ستون میانگین های دارای حروف مشابه بر اساس آزمون LSD در سطح ۵ درصد تفاوت معنی داری ندارند.

۲۵ درصد FC بدست آمد (Zadeh Bagheri *et al.*, 2014). با کاهش رطوبت خاک، پساایدگی پروتوپلاسم توأم با کاهش آماس سلولی اتفاق می افتد و اندازه سلول و سرعت تقسیم سلول کاهش پیدا می کند (Kafi *et al.*, 2001). همچنین، کمبود رطوبت خاک، باعث کاهش انتقال مواد غذایی به سطح ریشه شده و جذب مواد غذایی کاهش پیدا می کند. لذا، گیاه علاوه بر کمبود آب از کمبود مواد غذایی نیز رنج می برد (Mirnia and Habibzadeh, 2006). در این آزمایش نیز تیمار با SA تحت تنش کم آبی، درصد ماده خشک شاخساره را در بنفشه معطر افزایش داد و تیمار با SA تحت تنش کم آبی با جذب عناصر غذایی در گیاه آفتاب گردان (Nematollahi *et al.*, 2013) و همیشه بهار (Dehghan Nairi *et al.*, 2016) باعث افزایش وزن خشک شاخساره شد، که با نتایج تحقیق حاضر همخوانی دارد. پرولین برگ: نتایج تجزیه واریانس داده های پرولین نشان داد که اثر ساده تنش کم آبی، محلول پاشی و اثر متقابل تنش کم آبی و محلول پاشی در سطح احتمال یک درصد معنی دار شد (جدول ۲). نتایج مقایسه میانگین اثر متقابل تنش کم آبی و محلول پاشی نشان داد که با افزایش تنش کم آبی میزان پرولین

محلول پاشی بر درصد ماده خشک شاخساره در سطح احتمال یک درصد معنی دار شد، ولی اثر ساده تنش کم آبی معنی دار نشد (جدول ۲). مقایسه میانگین اثر متقابل تنش کم آبی و محلول پاشی نشان داد که با افزایش تنش کم آبی مقدار ماده خشک شاخساره کاهش یافت؛ ولی محلول پاشی ها درصد ماده خشک شاخساره را نسبت به تیمار شاهد افزایش دادند. تیمار SA در هر سه سطح تنش کم آبی باعث افزایش درصد ماده خشک شاخساره نسبت به تیمار شاهد شد. بیشترین افزایش (۲۶/۲۳ گرم) در تیمار ۲۰۰ میلی گرم در لیتر SA در ۸۵ درصد FC به دست آمد (شکل ۲).

تنش کم آبی علاوه بر این که رشدونمو گیاهان را کاهش می دهد، باعث تغییر در مسیر برخی از فرآیندهای متابولیسم گیاه نیز می شود. این تغییرات می تواند گیاه را در مقابل تنش کم آبی مقاوم سازد (Oukarroum *et al.*, 2009). در آزمایشی تأثیر سطوح مختلف تنش کم آبی در گیاه اطلسی (*Petunia*) نشان داد که با کاهش میزان آبیاری، وزن خشک شاخساره کاهش یافت. به طوریکه، بیشترین (۱۵ گرم) و کمترین (۷/۱۴ گرم) درصد ماده خشک شاخساره، به ترتیب در تیمار ۱۰۰ و



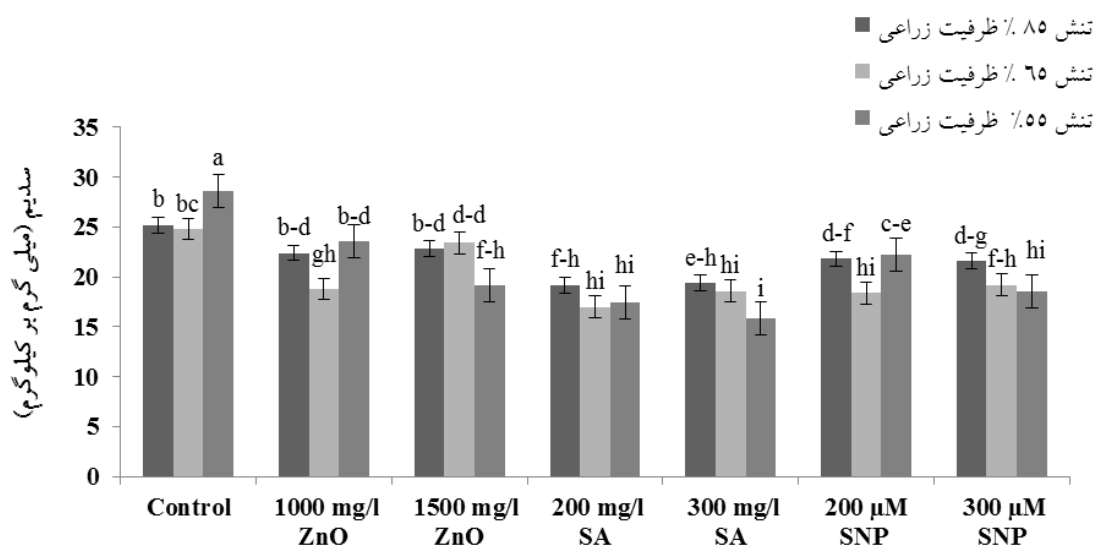
شکل ۳- مقایسه میانگین اثر متقابل ترکیبات ضدتنش (سالیسیلیک اسید، نانوآکسید روی و سدیم نیتروپروساید) و تنش کم آبی بر میزان پرولین برگ در گیاه بنفشه معطر. ZnO: نانوآکسید روی، SA: سالیسیلیک اسید، SNP: سدیم نیتروپروساید. در هر ستون میانگین‌های دارای حروف مشابه براساس آزمون LSD در سطح ۵ درصد تفاوت معنی‌داری ندارند.

غشای سلول می‌شود ولی با افزایش میزان پرولین، خسارت به غشا کاهش پیدا می‌کند در نتیجه با روش تنظیم اسمزی، تحمل به تنش کم‌آبی افزایش می‌یابد (Pandey and Agarwal, 1998). مطالعه روی گوجه‌فرنگی (*Solanum lycopersicum*) نشان داد که، پیش‌تیمار با ۱۰۰ میکرومولار SNP یا کمتر می‌تواند از طریق القای آنزیم‌های اکسیداتیو نقش حفاظتی در برابر تنش کم‌آبی داشته باشد (Nasiby, 2011). در این آزمایش نیز تیمار با SA و SNP کمترین مقدار پرولین را در گیاه بنفشه معطر نشان دادند و غلظت‌های زیاد SNP با تولید گونه‌های فعال نیتروژن (پراکسی نیتريت) تنش نیتروژن‌اتو ایجاد می‌کند و اثرات آسیب‌رسانی ROS را تشدید می‌نمایند (Nasiby, 2011; Nikraves et al., 2016; Gorgini, 2017). (Shabankareh and Khorasaninejad, 2017).

سدیم: نتایج تجزیه واریانس نشان داد که اثر ساده محلول‌پاشی و اثر متقابل تنش کم‌آبی و محلول‌پاشی در سطح احتمال یک درصد و اثر ساده تنش کم‌آبی در سطح احتمال ۵ درصد آماری روی میزان تغییر غلظت سدیم معنی‌دار بود (جدول ۲). نتایج مقایسه میانگین اثر متقابل تنش کم‌آبی و محلول‌پاشی

افزایش یافت. تیمار ۳۰۰ میکرومولار در لیتر SNP در ۵۵ درصد FC، میزان پرولین بیشتری (۵۲/۴۷ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن تر) را نسبت به سایر تیمارها و شاهد تحریک کرد (شکل ۳).

پرولین در گیاهان تحت تنش، به‌ویژه تنش‌های شوری و خشکی به‌عنوان یک اسمولیت، نقش مهمی در حفظ فشار اسمزی سلول ایفا می‌کند (Samadi et al., 2016) و تنظیم فشار اسمزی باعث برقراری تورژانس سلول‌های گیاهی در برابر تنش کم‌آبی می‌شود (Farooq et al., 2009). پرولین علاوه بر تنظیم اسمزی، به‌عنوان محافظ نیز در برابر تنش عمل می‌کند و به‌طور مستقیم یا غیرمستقیم با ماکرومولکول‌ها اثر متقابل دارد و به حفظ شکل و ساختار طبیعی آن‌ها در شرایط تنش کمک می‌کند (Koc et al., 2010). افزایش غلظت پرولین، عمومی‌ترین عکس‌العملی است که به محض کمبود آب یا کاهش پتانسیل اسمزی در گیاهان مشاهده می‌شود (2000 Chretien and Guillot). Ebrahimi و همکاران (۲۰۱۷) نشان دادند که تنش کم‌آبی باعث افزایش میزان پرولین در گیاه همیشه‌بهار شد. اگر چه، تنش کم‌آبی باعث کاهش پایداری



تیمارها

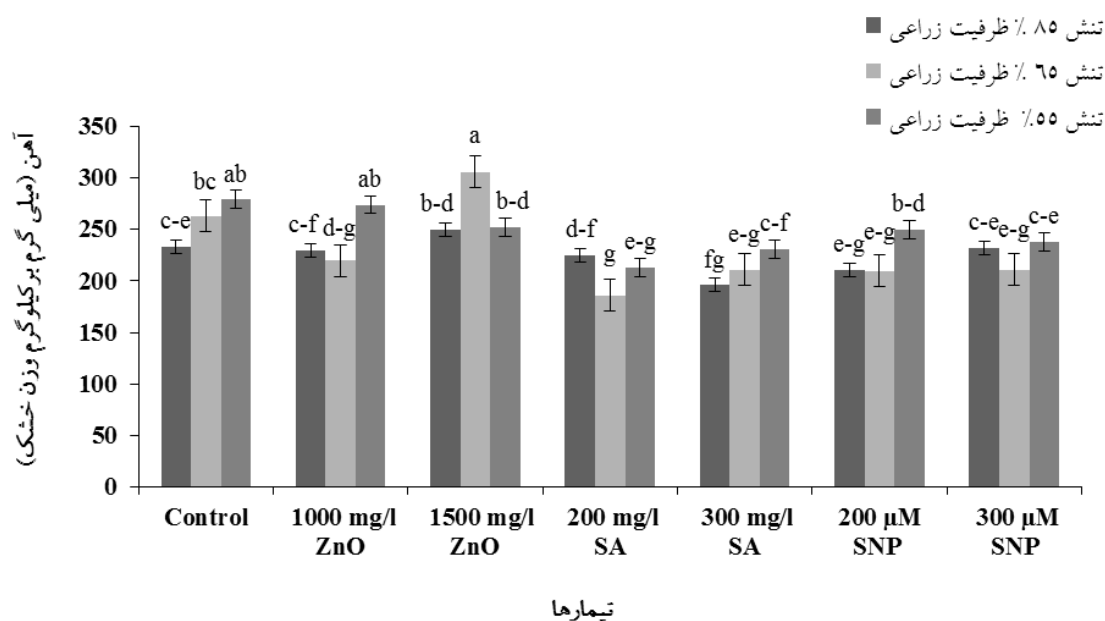
شکل ۴- مقایسه میانگین اثر متقابل ترکیبات ضد تنش (سالیسیلیک اسید، نانو اکسید روی و سدیم نیتروپروساید) و تنش کم آبی بر میزان سدیم در گیاه بنفشه معطر. ZnO: نانو اکسید روی، SA: سالیسیلیک اسید، SNP: سدیم نیتروپروساید. در هر ستون میانگین‌های دارای حروف مشابه بر اساس آزمون LSD در سطح ۵ درصد تفاوت معنی‌داری ندارند.

آهن: نتایج تجزیه واریانس نشان داد که اثر ساده تنش کم آبی، محلول‌پاشی و اثر متقابل تنش کم آبی و محلول‌پاشی بر غلظت آهن برگ در سطح احتمال یک درصد آماری معنی‌دار بود (جدول ۲). مقایسه میانگین اثر متقابل تنش کم آبی و محلول‌پاشی نشان داد که در اغلب تیمارها با افزایش تنش کم آبی، غلظت آهن نیز افزایش یافت. بیشترین غلظت آهن (۳۰۶ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن خشک) در تیمار ۱۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر ZnO در تنش کم آبی ۶۵ درصد FC بدست آمد (شکل ۵).

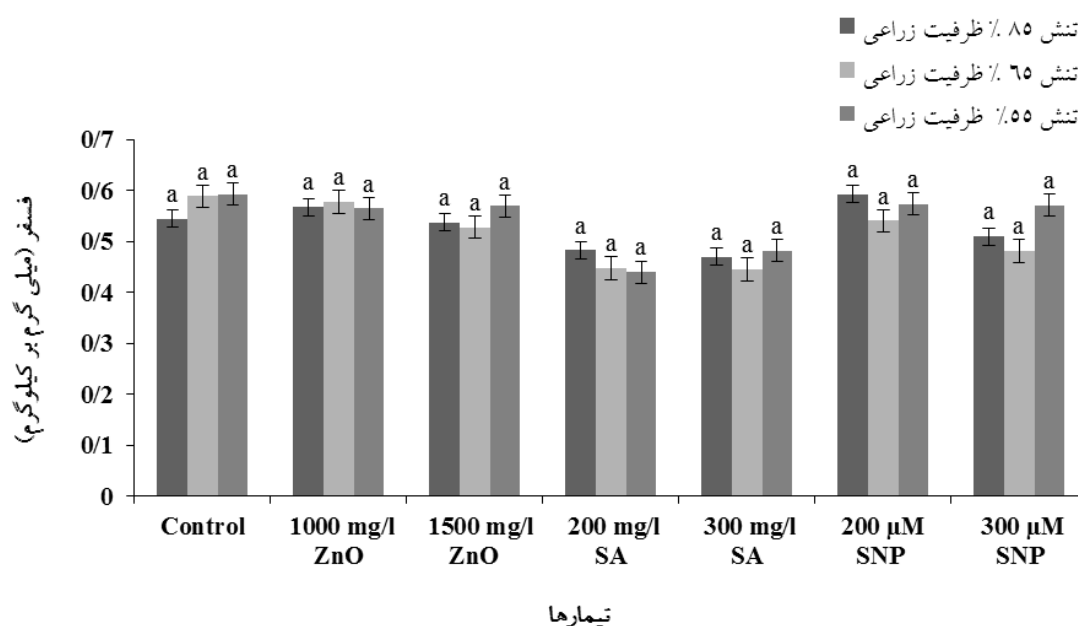
Kong و همکاران (۲۰۱۴) نشان دادند که SNP در حفظ تعادل عناصر غذایی و کاهش تنش اکسیداتیو ناشی از تنش و کمبود آهن نقش مؤثری دارد. همچنین محققان، بهبود جذب و انتقال و فعال‌سازی آهن را در برخی غلات با کاربرد SA و SNP گزارش کردند (Cakmak, 2000). در آزمایشی، افزایش تنش کم آبی سبب افزایش غلظت آهن در برگ گلرنگ (*Carthamus tinctorius*) شد و بیشترین غلظت در سطح رطوبتی ۳۰ درصد FC بدست آمد (Azizabadi et al., 2014). همچنین، در آزمایش دیگری، افزودن عنصر روی موجب

نشان داد که با افزایش تنش کم آبی، غلظت سدیم افزایش یافت و تیمارهای ZnO و SNP در افزایش غلظت سدیم تأثیرگذار بودند (شکل ۴). بیشترین غلظت سدیم (۲۸/۶۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) در گیاه بنفشه معطر در تیمار شاهد در تنش کم آبی ۵۵ درصد FC بدست آمد.

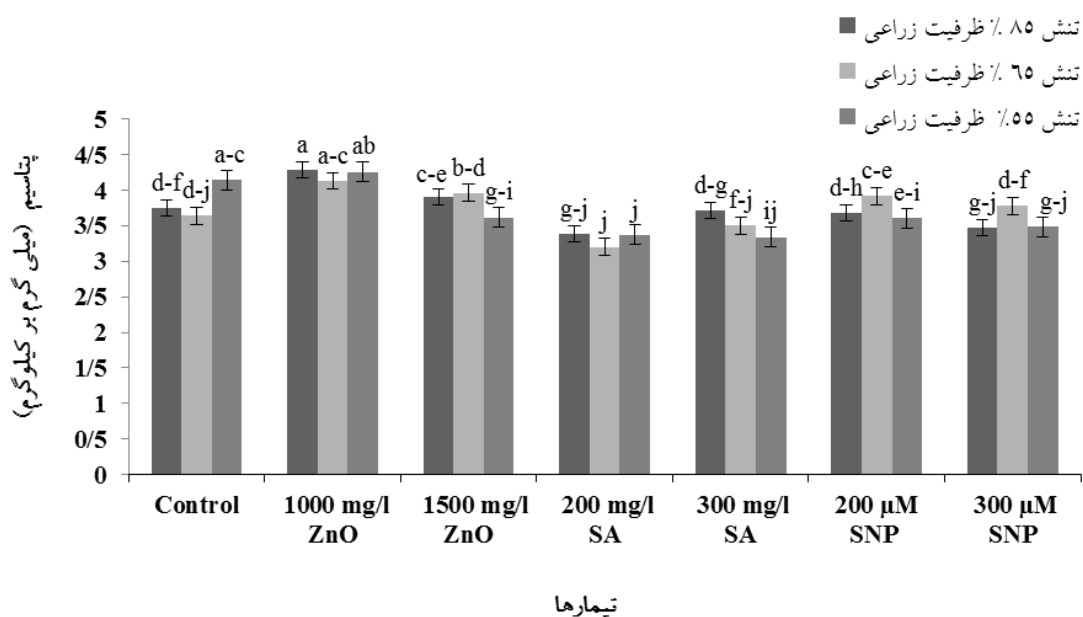
میزان عناصر موجود در بافت‌ها به‌ویژه سدیم، یکی از روش‌های بررسی میزان تحمل بافت‌ها به تنش‌ها است. گیاه با جذب سدیم و حفظ تعادل اسمزی، آب بیشتری جذب می‌نماید. در گیاه مریم‌گلی، با افزایش تنش کم آبی، میزان جذب سدیم افزایش یافت (Sodaeizadeh and Mansouri, 2014). در گیاه ریحان سبز (*Ocimum basilicum*)، با افزایش تنش شوری، میزان سدیم برگ افزایش یافت اما در طی تیمار با SA این مقدار کاهش یافت (Delavari Parizi et al., 2012). همچنین در آزمایش دیگری، تنش شوری باعث افزایش سدیم در گیاه ذرت (*Zea mays* L.) شد، در صورتیکه کاربرد SA باعث افزایش نیتروژن و کاهش یون‌های فسفر و سدیم تحت تنش کم آبی شد (Momeni et al., 2013) که با نتایج تحقیق حاضر، مطابقت دارد.



شکل ۵- مقایسه میانگین اثر متقابل ترکیبات ضد تنش (سالیسیلیک اسید، نانو اکسید روی و سدیم نیتروپروساید) و تنش کم آبی بر میزان آهن در گیاه بنفشه معطر. ZnO: نانو اکسید روی، SA: سالیسیلیک اسید، SNP: سدیم نیتروپروساید. در هر ستون میانگین‌های دارای حروف مشابه براساس آزمون LSD در سطح ۵ درصد تفاوت معنی‌داری ندارند.



شکل ۶- مقایسه میانگین اثر متقابل ترکیبات ضد تنش (سالیسیلیک اسید، نانو اکسید روی و سدیم نیتروپروساید) و تنش کم آبی بر میزان فسفر در گیاه بنفشه معطر. ZnO: نانو اکسید روی، SA: سالیسیلیک اسید، SNP: سدیم نیتروپروساید. در هر ستون میانگین‌های دارای حروف مشابه براساس آزمون LSD در سطح ۵ درصد تفاوت معنی‌داری ندارند.



شکل ۷- مقایسه میانگین اثر متقابل ترکیبات ضد تنش (سالیسیلیک اسید، نانو اکسید روی و سدیم نیتروپروساید) و تنش کم آبی بر میزان پتاسیم در گیاه بنفشه معطر. ZnO: نانو اکسید روی، SA: سالیسیلیک اسید، SNP: سدیم نیتروپروساید. در هر ستون میانگین های دارای حروف مشابه بر اساس آزمون LSD در سطح ۵ درصد تفاوت معنی داری ندارند.

این ماده به عنوان مولکول پیام رسان با تغییر ویژگی های غشای پلاسمایی منجر به تعادل عناصر غذایی در گیاهان تحت تنش می شود (EI-Tayeb, 2005). این نتایج با نتایج بدست آمده در پژوهش حاضر مطابقت دارد.

**پتاسیم:** نتایج تجزیه واریانس نشان داد که اثر ساده تنش کم آبی، محلول پاشی و اثر متقابل تنش کم آبی و محلول پاشی در غلظت پتاسیم برگ بنفشه معطر در سطح احتمال یک درصد معنی دار شد (جدول ۲). نتایج مقایسه میانگین اثر متقابل تنش کم آبی و محلول پاشی نشان داد که تنش کم آبی غلظت پتاسیم را افزایش داد و تیمار ۱۰۰۰ میلی گرم در لیتر ZnO در هر سه سطح تنش کم آبی باعث افزایش غلظت پتاسیم شد. همچنین SNP نیز در افزایش غلظت پتاسیم نقش مثبتی نشان داد (شکل ۷).

پتاسیم با کاهش اتلاف آب از گیاه از طریق تبخیر و تعرق، باعث مقاومت گیاه به تنش کم آبی می شود و موجب افزایش عملکرد گیاه در شرایط تنش رطوبتی می گردد. تأثیر سطوح مختلف تنش کم آبی در برگ اطلسی نشان داد که با کاهش میزان آبیاری، میزان پتاسیم برگ افزایش یافت و بیشترین پتاسیم برگ مربوط به تیمار ۲۵ درصد FC و کمترین میزان مربوط به

کاهش غلظت عنصر آهن در برخی غلات شد (Cakmak, 2000). یکی از علت های تغییر در غلظت عناصر، اثر تضاد (آنتاگونیزم) بین آنها است.

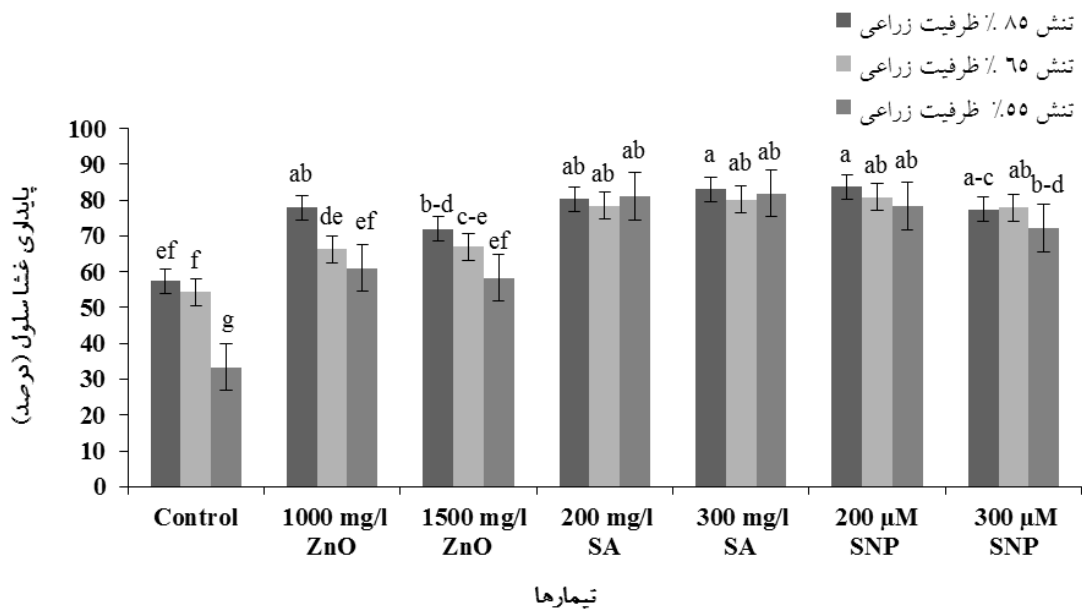
**فسفر:** نتایج تجزیه واریانس داده ها نشان داد که اثر ساده محلول پاشی در سطح احتمال ۵ درصد روی میزان فسفر معنی دار بود (جدول ۲). با افزایش تنش کم آبی، غلظت فسفر افزایش یافت، به طوریکه بیشترین غلظت فسفر (۰/۶ میلی گرم بر کیلوگرم) در تنش کم آبی ۵۵ درصد محاسبه شد (شکل ۶). بررسی اثر ساده محلول پاشی ها نشان داد که از بین تمام تیمارها، بیشترین غلظت فسفر (۰/۵۷ درصد) در تیمار ۳۰۰ میلی گرم در لیتر SA بدست آمد.

با افزایش سطوح تنش خشکی در آفتاب گردان، درصد فسفر برگ به طور معنی داری کاهش یافت ولی محلول پاشی با غلظت ۱۰۰ میکرومولار SA با افزایش جذب عناصر غذایی ماکرو (نیتروژن، فسفر و پتاسیم) و رنگدانه های فتوسنتزی، سبب کاهش خسارت ناشی از تنش خشکی شد (Nematollahi et al., 2013). در آزمایش حاضر نیز اثر ساده محلول پاشی با SA باعث افزایش غلظت فسفر در برگ بنفشه معطر شد. لذا،

جدول ۳- آنالیز واریانس اثر سالیسیلیک اسید، نانو اکسید روی و سدیم نیتروپروساید همراه با تنش کم آبی روی پایداری غشای پلاسمایی، کاتالاز، پلی فنل اکسیداز، ترکیبات فنلی، آلکالوئید ویولین و فیتول در بنفشه معطر

میانگین مربعات						درجه آزادی	منبع تغییرات
فیتول	آلکالوئید ویولین	ترکیبات فنلی	پلی فنل اکسیداز	کاتالاز	پایداری غشای پلاسمایی		
۰/۰۳ <sup>ns</sup>	۰/۱۶ <sup>ns</sup>	۱۹/۰۴ <sup>ns</sup>	۰/۰۰۱۹ <sup>ns</sup>	۰/۰۰۰۵ <sup>ns</sup>	۴۲/۸۰ <sup>ns</sup>	۲	تکرار
۱/۹۰ <sup>**</sup>	۲/۲۱ <sup>ns</sup>	۱۱۱/۰۰ <sup>**</sup>	۰/۰۰۷۹ <sup>*</sup>	۰/۰۰۷ <sup>**</sup>	۴۱۸/۰۰ <sup>**</sup>	۲	تنش کم آبی (A)
۰/۹۰ <sup>**</sup>	۴/۲۸ <sup>**</sup>	۱۹۰/۲۰ <sup>**</sup>	۰/۰۱۷۳ <sup>**</sup>	۰/۰۱۳ <sup>**</sup>	۱۱۲/۰۰ <sup>*</sup>	۶	محلول پاشی ها (B)
۰/۲۹ <sup>*</sup>	۱/۹۲ <sup>*</sup>	۷۴/۵۰ <sup>**</sup>	۰/۰۰۸۳۵ <sup>**</sup>	۰/۰۰۶ <sup>**</sup>	۶۷۶/۰۰ <sup>**</sup>	۱۲	A × B
۰/۱۵	۰/۸۷	۱۹/۰۵	۰/۰۰۱۹۰۴۸	۰/۰۰۰۵	۴۲/۸۵	۴۰	خطا
۲۲/۰۲	۱۳/۹۰	۹/۱۷	۲۹/۴	۱۷/۹۰	۹/۱۴	-	ضریب تغییرات (C.V.)

ns، \* و \*\*: به ترتیب تفاوت غیر معنی دار و تفاوت معنی دار در سطح احتمال یک و ۵ درصد



شکل ۸- مقایسه میانگین اثر متقابل ترکیبات ضد تنش (سالیسیلیک اسید، نانو اکسید روی و سدیم نیتروپروساید) و تنش کم آبی بر پایداری غشای سلول در گیاه بنفشه معطر. ZnO: نانو اکسید روی، SA: سالیسیلیک اسید، SNP: سدیم نیتروپروساید. در هر ستون میانگین های دارای حروف مشابه بر اساس آزمون LSD در سطح ۵ درصد تفاوت معنی داری ندارند.

از طریق تعامل با ABA در کنترل فعالیت کانال های درگیر در انتقال پتاسیم در روزنه ها نقش دارد و از این طریق موجب حفظ و افزایش تحمل گیاه در مقابل تنش کم آبی می شود (Majeed et al., 2020).

تیمار ۱۰۰ درصد FC بود (Zadeh Bagheri et al., 2014). در آزمایش حاضر نیز استفاده از ZnO و SNP باعث افزایش غلظت پتاسیم در برگ بنفشه معطر شد و NO از طریق تأثیر بر افزایش طول ریشه و تعداد ریشه های جانبی، باعث افزایش جذب عناصر غذایی از جمله پتاسیم می شود. همچنین این ماده

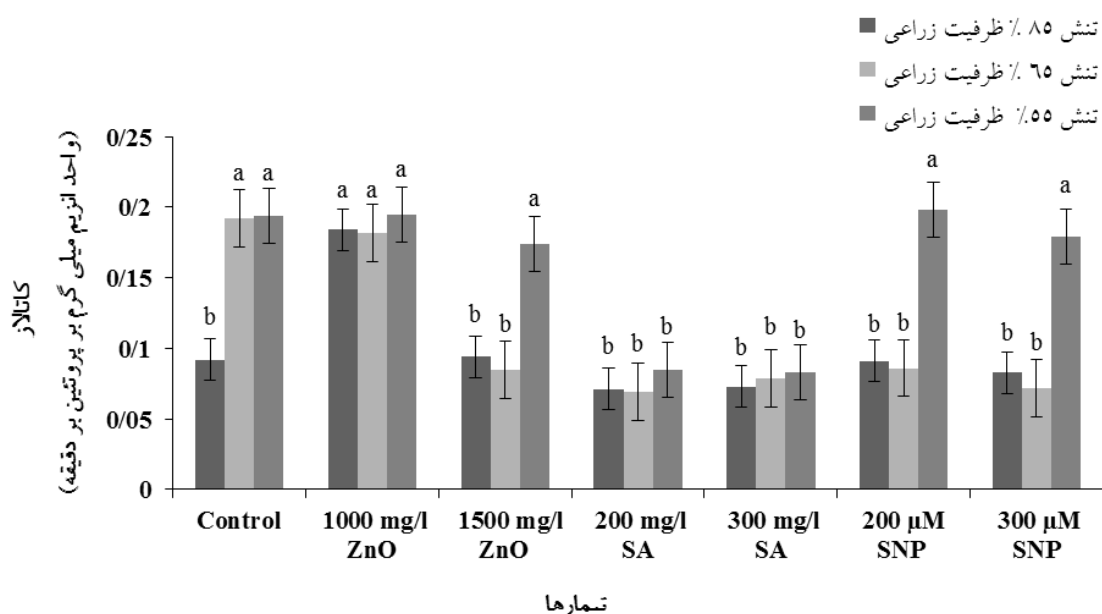
**پایداری غشای سلول:** نتایج تجزیه واریانس داده‌ها بر پایداری غشای سلول نشان داد که اثر ساده تنش کم‌آبی و اثر متقابل تنش کم‌آبی و محلول‌پاشی، در سطح احتمال یک درصد و اثر ساده محلول‌پاشی در سطح احتمال ۵ درصد معنی‌دار بود (جدول ۳). نتایج مقایسه میانگین داده‌ها نشان داد که با افزایش تنش کم‌آبی، پایداری غشای سلول کاهش یافت. همه تیمارهای محلول‌پاشی در هر سه سطح FC تأثیر مثبتی بر پایداری غشای سلول نسبت به تیمار شاهد نشان دادند. بیشترین مقدار پایداری غشا (۸۳/۷۰ و ۸۳/۱۰ درصد)، به ترتیب مربوط به تیمارهای ۲۰۰ میکرومولار SNP و SA در ۸۵ درصد FC بود (شکل ۸).

عمل غشا یک فرآیند فیزیولوژیکی است و در بسیاری از تنش‌های محیطی به صورت مستقیم و یا از طریق تولید گونه‌های فعال اکسیژن آسیب شدیدی می‌بیند. تحقیقات نشان داده است که در شرایط تنش، پایداری غشا کاهش می‌یابد (Sairam et al., 2002). در پژوهش حاضر نیز محلول‌پاشی با SA و SNP نسبت به ZnO باعث افزایش پایداری غشای سلول در برگ بنفشه‌معطر شد. در آزمایشی، محلول‌پاشی با SA باعث پایداری غشای سلول در شرایط تنش کم‌آبی شد و این ماده باعث کاهش اثرات مخرب ناشی از تنش کم‌آبی گردید (Ibrahim, 2016). همچنین، اعمال ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر SA در سطوح مختلف تنش کم‌آبی باعث بهبود پایداری غشای سلول در گیاه گندم (*Triticum sativum*) شد و اثر دیگر این ماده در بهبود رشد گیاه، انسجام و پایداری غشا از طریق کاهش  $H_2O_2$  (Agrawal et al., 2005)، کاهش تنش اکسیداتیو و جلوگیری از پراکسیداسیون غشای سلول است (Fazeli Kakhki and Goldani, 2014). در مطالعه دیگری گزارش شد که این ماده با جلوگیری از پراکسیداسیون لیپیدها باعث پایداری غشای سلول شد و تحمل گیاه را به شرایط تنش افزایش داد (Joseph and Sujatha, 2010). همچنین، کاربرد SA بر غالب واکنش‌های متابولیسمی گیاهان تأثیر می‌گذارد و از طریق افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان و افزایش میزان پلی‌آمین‌ها در گیاهان، خسارت ناشی از ROS را

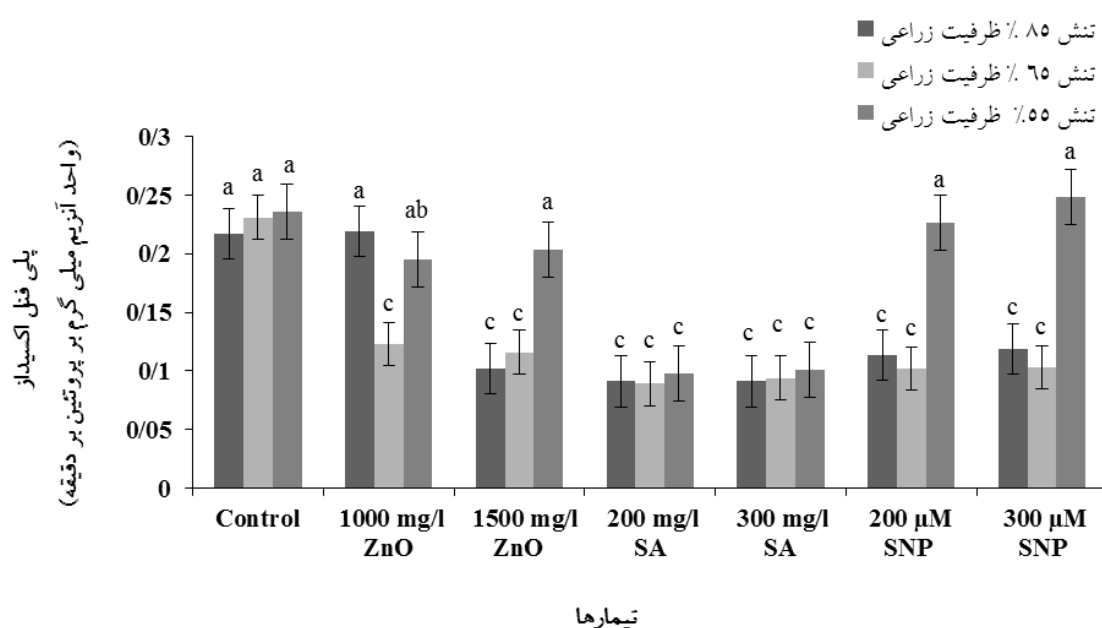
کاهش می‌دهد (Acosta-Motos et al., 2017). در رابطه با SNP نیز نتایج نشان داد که در گیاه مارتیغال با قطع آبیاری از مرحله ساقه‌روی و گرده‌افشانی تا پایان دوره رشد، پایداری غشای سلول به طور معنی‌داری کاهش یافت و کاهش در مرحله تنش گرده‌افشانی بیشتر از تنش ساقه‌روی بود (Zangani et al., 2017). لذا کاربرد SNP در غلظت مناسب با کاهش  $H_2O_2$  از نشت بیشتر یون در شرایط تنش جلوگیری می‌کند و این امر نشان می‌دهد که کاربرد خارجی NO می‌تواند کشسانی دیواره سلولی و سیالیت غشاها را بهبود ببخشد و رشد گیاه را افزایش دهد (Shojaei and Makarian, 2015). بنابراین، کاهش در نشت الکترولیت‌ها با کاربرد SNP ممکن است بر پایه نقش این ماده در کمک به کارکرد غشا از طریق القاء مکانیسم‌های آنتی‌اکسیدانی و بالابردن جذب یونی باشد (Li et al., 2013).

**کاتالاز:** نتایج تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که اثر ساده تنش کم‌آبی، محلول‌پاشی و اثر متقابل تنش کم‌آبی و محلول‌پاشی در غلظت آنزیم CAT در گیاه بنفشه‌معطر در سطح احتمال یک درصد آماری معنی‌دار بود (جدول ۳). نتایج مقایسه میانگین اثر متقابل تنش کم‌آبی و محلول‌پاشی نشان داد که با افزایش تنش کم‌آبی، فعالیت آنزیم CAT افزایش یافت. بیشترین فعالیت آنزیم CAT (۰/۱۹۸، ۰/۱۹۵ و ۰/۱۹۴ واحد آنزیم بر میلی‌گرم پروتئین بر دقیقه)، به ترتیب در تیمار ۲۰۰ میکرومولار SNP، ۱۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر ZnO و شاهد هر سه در تنش ۵۵ درصد FC حاصل شد (شکل ۹).

افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی، عمومی‌ترین واکنش گیاهان در مواجهه با صدمات ناشی از تنش اکسیداتیو است. تغییر در فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی به طور گسترده در بسیاری از گیاهان تحت تنش، گزارش شده است و آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی نقش مهمی در پاک‌سازی ROS از طریق یک‌سری واکنش‌های پیچیده ایفا می‌کنند (Javani et al., 2008). در شرایط تنش، میزان تولید ROS از ظرفیت جاروب‌کردن آن‌ها توسط سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی بیشتر می‌شود و در نتیجه تنش اکسیداتیو رخ می‌دهد. بنابراین، برای مقابله با تنش اکسیداتیو، تغییر ظرفیت سیستم آنتی‌اکسیدانی



شکل ۹- مقایسه میانگین اثر متقابل ترکیبات ضدتنش (سالیسیلیک اسید، نانو اکسید روی و سدیم نیتروپروساید) و تنش کم آبی بر فعالیت آنزیم کاتالاز در گیاه بنفشه معطر. ZnO: نانو اکسید روی، SA: سالیسیلیک اسید، SNP: سدیم نیتروپروساید. در هر ستون میانگین‌های دارای حروف مشابه براساس آزمون LSD در سطح ۵ درصد تفاوت معنی‌داری ندارند.



شکل ۱۰- مقایسه میانگین اثر متقابل ترکیبات ضدتنش (سالیسیلیک اسید، نانو اکسید روی و سدیم نیتروپروساید) و تنش کم آبی بر فعالیت آنزیم پلی فنل اکسیداز در گیاه بنفشه معطر. ZnO: نانو اکسید روی، SA: سالیسیلیک اسید، SNP: سدیم نیتروپروساید. در هر ستون میانگین‌های دارای حروف مشابه براساس آزمون LSD در سطح ۵ درصد تفاوت معنی‌داری ندارند.

ضروری است (Moller et al., 2007). در پژوهش حاضر، تیمار ZnO و SNP باعث افزایش غلظت CAT در برگ بنفشه معطر شد. محلول پاشی با ۲۰۰ میکرومولار SNP، فعالیت آنزیم‌های CAT، POD، SOD و APX را تحت تنش گرمایی

شدید (۳۵ درصد FC) در گیاه جو بهاره، باعث افزایش فعالیت آنزیم PPO شد (Movludi et al., 2014). در آزمایش دیگری، محلول پاشی با SA باعث تعدیل اثرات تنش کم آبی در گیاه به لیمو (Dianat et al., 2016) و در گوجه فرنگی و لوبیا باعث مقاومت گیاهان به تنش کم آبی شد (Bezrukova et al., 2001) که با نتایج تحقیق حاضر مطابقت دارد. سدیم نیتروپروساید، اثرات منفی تنش کم آبی را در کدوی پوست کاغذی (*Cucurbita pepo* L.) کاهش داد (Yadollahi and Asgharpour, 2014). لذا، ارتباط تنگاتنگی بین فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدانی و افزایش مقاومت گیاهان در مقابل تنش کم آبی و شوری وجود دارد (Yang et al., 2010; Dianat et al., 2016).

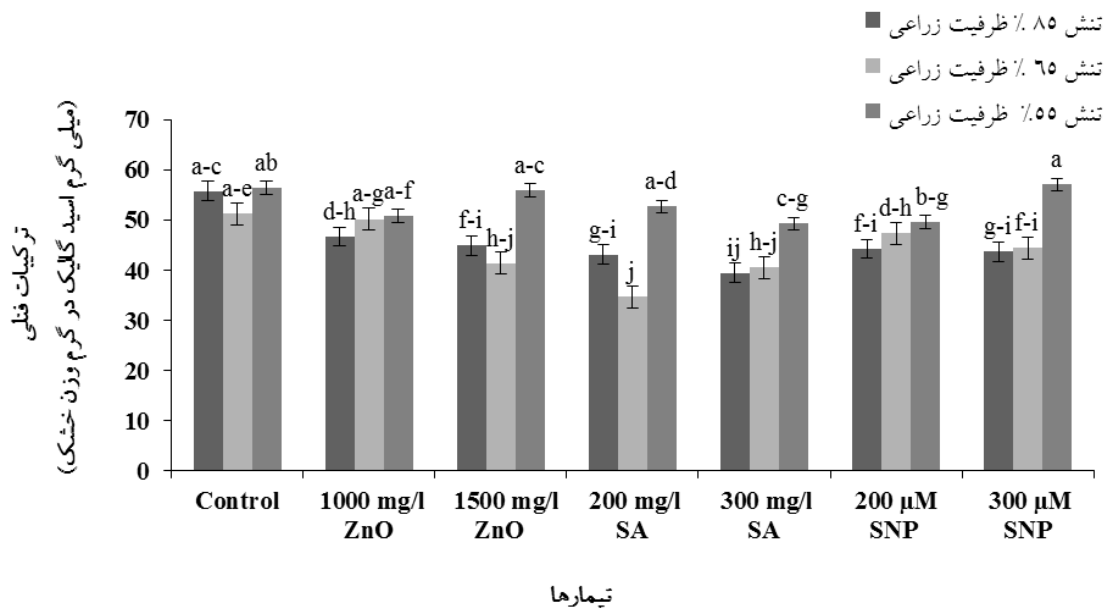
**ترکیبات فنلی:** نتایج تجزیه واریانس داده ها نشان داد که اثرات ساده تنش کم آبی و محلول پاشی و اثر متقابل تنش کم آبی و محلول پاشی در ترکیبات فنلی در سطح احتمال یک درصد معنی دار شد (جدول ۳). مقایسه میانگین اثر متقابل تنش کم آبی و محلول پاشی نشان داد که در تیمار شاهد و همه تیمارها، بالاترین مقدار ترکیبات فنلی، در شرایط تنش کم آبی ۵۵ درصد FC بدست آمد. نتایج نشان داد که در مجموع تیمارها، بالاترین مقدار ترکیبات فنلی (۵۷/۰۷ میلی گرم اسید گالیک در گرم وزن خشک) مربوط به تیمار ۳۰۰ میکرومولار SNP در ۵۵ درصد ظرفیت زراعی بود (شکل ۱۱).

ترکیبات فنولی از مهم ترین گروه ها در میان مواد دارای ظرفیت آنتی اکسیدانی هستند (Crozier et al., 2006). ترکیبات فنلی جزئی از مواد محلول سلولی هستند که تأثیر خسارت زای تنش را تعدیل می کنند. تجمع این ترکیبات در گیاهان از راهکارهای مهار فعالیت رادیکال های فعال اکسیژن و محافظت از غشای سلول در برابر آسیب های تنش محسوب می شود (Singh, 2004). در آزمایشی، افزایش ترکیبات فنلی در فلفل (Koc et al., 2010) و رازیانه تحت تنش کم آبی گزارش شده است (Salarpour Ghoraba and Farahbakhsh, 2014). همچنین، در گیاه بومادران تحت تنش کم آبی (۵۰ درصد FC) میزان ترکیبات فنلی به میزان ۴۰ درصد نسبت به تیمار شاهد

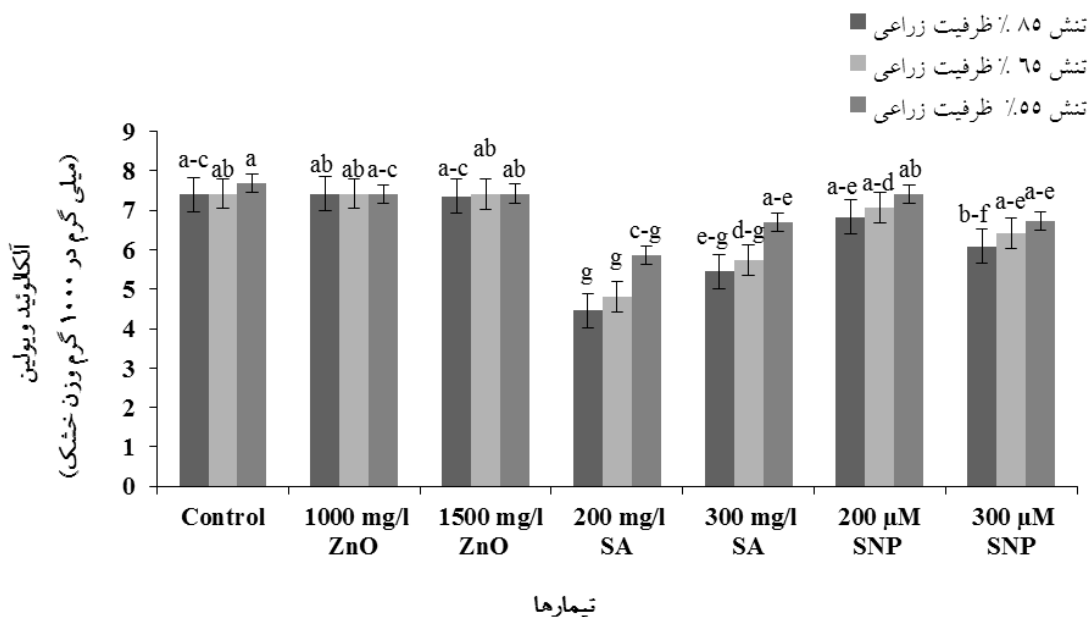
در گیاه داودی (*Chrysanthemum*) افزایش داد (Yang et al., 2010). اکسید نیتریک به عنوان یک پیام رسان ثانویه، باعث افزایش فعالیت یا القای برخی از آنزیم های آنتی اکسیدان مانند CAT و APX گردید و در نتیجه مانع عملکرد ROS ها گردید و باعث افزایش تحمل گیاهان به شرایط تنش کم آبی شد (Zangani et al., 2017). همچنین، نتایج داده ها در ارتباط با تأثیر نانوذرات بر غلظت آنزیم CAT، Moaveni و همکاران (۲۰۱۱) طی تحقیقی روی گیاه همیشه بهار به این نتیجه رسیدند که بیشترین میانگین فعالیت آنزیم CAT، در تیمار ۰/۰۳ درصد نانو اکسید تیتانیوم و کمترین میانگین در تیمار شاهد بدست آمد و سطوح مختلف تنش کم آبی و غلظت های مختلف نانو ZnO و همچنین اثر متقابل تیمارها بر میزان فعالیت آنزیم CAT در گیاه سویا در سطح احتمال یک و ۵ درصد معنی دار شد (Cakmak, 2008). بنابراین، می توان چنین استنباط کرد که در زمان تنش کم آبی، تیمار ZnO توانسته است با افزایش فعالیت آنزیم ها، گیاه را در سطح مطلوب تری نگه دارد و باعث محافظت گیاه در برابر آسیب های اکسیداتیو شود (Huang et al., 2012).

**پلی فنل اکسیداز:** نتایج تجزیه واریانس (جدول ۳) آشکار کرد که اثر ساده محلول پاشی و اثر متقابل تنش کم آبی و محلول پاشی در سطح احتمال یک درصد و اثر ساده تنش کم آبی در سطح احتمال ۵ درصد روی فعالیت آنزیم PPO در گیاه بنفشه معطر معنی دار بود. اثر متقابل تنش کم آبی و محلول پاشی نشان داد که با افزایش تنش کم آبی فعالیت PPO افزایش یافت. بیشترین فعالیت (۰/۲۴۸ واحد آنزیم بر میلی گرم پروتئین بر دقیقه) در تیمار ۳۰۰ میکرومولار SNP در تنش کم آبی ۵۵ درصد FC اندازه گیری شد (شکل ۱۰). هر دو غلظت SA (۲۰۰ و ۳۰۰ میلی گرم در لیتر) در هر سه سطح تنش کم آبی باعث تحریک کمترین فعالیت آنزیم PPO شد.

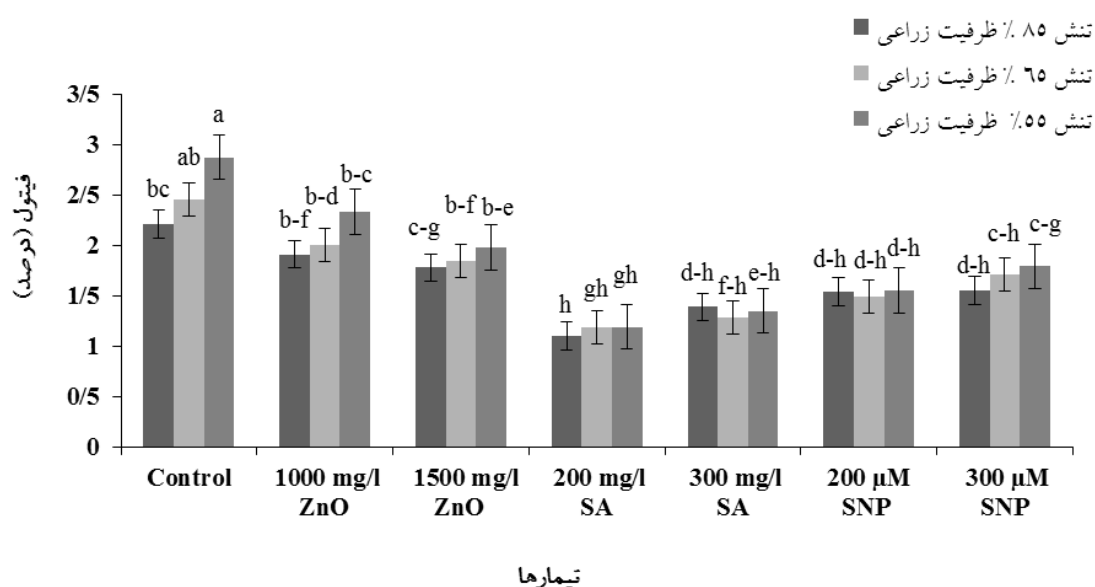
پلی فنل اکسیدازها به عنوان گروهی از آنزیم ها، در اکسیداسیون فنل ها به کینون ها و تشکیل لیگنین در سلول های گیاهی، نقش مهمی ایفا می کنند و افزایش فعالیت آنزیم PPO، افزایش واکنش های دفاعی گیاه را به دنبال دارد و تنش کم آبی



شکل ۱۱- مقایسه میانگین اثر متقابل ترکیبات ضدتنش (سالیسیلیک اسید، نانو اکسید روی و سدیم نیتروپروساید) و تنش کم آبی بر صفت ترکیبات فنلی در گیاه بنفشه معطر. ZnO: نانو اکسید روی، SA: سالیسیلیک اسید، SNP: سدیم نیتروپروساید. در هر ستون میانگین‌های دارای حروف مشابه براساس آزمون LSD در سطح ۵ درصد تفاوت معنی‌داری ندارند.



شکل ۱۲- مقایسه میانگین اثر متقابل ترکیبات ضدتنش (سالیسیلیک اسید، نانو اکسید روی و سدیم نیتروپروساید) و تنش کم آبی بر مقدار آلکالوئید ویولین در گیاه بنفشه معطر. ZnO: نانو اکسید روی، SA: سالیسیلیک اسید، SNP: سدیم نیتروپروساید. در هر ستون میانگین‌های دارای حروف مشابه براساس آزمون LSD در سطح ۵ درصد تفاوت معنی‌داری ندارند.



شکل ۱۳- مقایسه میانگین اثر متقابل ترکیبات ضد تنش (سالیسیلیک اسید، نانو اکسید روی و سدیم نیتروپروساید) و تنش کم آبی بر مقدار فیتول در گیاه بنفشه معطر. ZnO: نانو اکسید روی، SA: سالیسیلیک اسید، SNP: سدیم نیتروپروساید. در هر ستون میانگین‌های دارای حروف مشابه بر اساس آزمون LSD در سطح ۵ درصد تفاوت معنی داری ندارند.

مقایسه میانگین اثر متقابل تیمارهای آزمایشی نشان داد که اعمال تنش کم آبی باعث افزایش مقدار آلکالوئید ویولین در برگ بنفشه معطر شد. کمترین مقدار ویولین (۴/۴۶ میلی گرم در ۱۰۰ گرم وزن خشک) در تیمار ۲۰۰ میلی گرم در لیتر SA در FC ۸۵ درصد و بیشترین مقدار (۷/۶۸ میلی گرم در ۱۰۰ گرم وزن خشک) در تیمار شاهد در FC ۵۵ درصد بدست آمد که از نظر آماری با تیمارهای شاهد در FC ۸۵ و ۶۵ درصد و سطوح مختلف SNP و ZnO در هر سه سطح FC اختلاف معنی داری نشان نداد (شکل ۱۲).

**فیتول:** نتایج تجزیه واریانس داده‌ها در مقدار فیتول برگ بنفشه معطر نشان داد که اثر ساده تنش کم آبی و اثر ساده محلول پاشی، در سطح احتمال یک درصد و اثر متقابل تنش کم آبی و محلول پاشی، در سطح احتمال ۵ درصد معنی دار شد (جدول ۳). مقایسه میانگین اثر متقابل تنش کم آبی و محلول پاشی نشان داد که با افزایش تنش کم آبی، درصد فیتول برگ افزایش یافت و بیشترین مقدار فیتول (۲/۸۷ درصد) در تیمار شاهد در ۵۵ درصد FC بدست آمد که از نظر آماری با تیمار شاهد در ۶۵ درصد FC اختلاف معنی داری نشان نداد.

افزایش نشان داد (Gharibi *et al.*, 2016). بنابراین، افزایش فنل در شرایط تنش کم آبی با توجه به این موضوع امری بدیهی بود و مطابق با نتایج مطالعه حاضر است. در آزمایش انجام شده، بیشترین ترکیبات فنلی در گیاه بنفشه معطر در تیمار با نانو اکسید روی و SNP بدست آمد. بسیاری از ترکیبات فنلی، از پالاینده‌های بسیار کارآمد پراکسید هیدروژن، رادیکال‌های هیدروکسیل و متوقف‌کننده زنجیره‌های پراکسیداسیون لیپید است (Hayat *et al.*, 2010). محلول پاشی با ۲۵ میکرومولار SNP تحت تنش کم آبی محتوای فنل کل را در گیاه کلزا به طور معنی داری افزایش داد ولی غلظت‌های بالای این ماده (۷۵ و ۱۰۰ میکرومولار) باعث کاهش ترکیبات فنلی شد (Nikravesh *et al.*, 2016). لذا، ترکیبات فنلی با دادن الکترون به آنزیم‌های تیپ POD و سم زدایی  $H_2O_2$  می‌توانند به عنوان آنتی‌اکسیدان در برابر ROSها عمل کنند (Sakihama *et al.*, 2002).

**آلکالوئید ویولین:** بررسی جدول تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که اثر ساده محلول پاشی در سطح احتمال یک درصد و اثر متقابل تنش کم آبی و محلول پاشی، در سطح احتمال ۵ درصد معنی دار شد و اثر ساده تنش کم آبی معنی دار نشد (جدول ۳).

محدودیت آب در بسیاری از موارد باعث افزایش محتوای متابولیت‌های ثانویه مانند آلکالوئیدها و اسانس‌ها می‌شود و هر کمبودی که رشد را بیش از فتوسنتز محدود کند، تولید

کردند که محلول‌پاشی پیاز (*Allium cepa* L.) با نانو ذرات روی منجر به افزایش درصد اسانس گردید. همچنین، محلول‌پاشی ۲۵۰ میلی‌گرم بر لیتر روی در شرایط تنش شوری منجر به افزایش محتوا و عملکرد اسانس ریحان (*Ocimum basilicum* L.) گردید (Said-Al Ahl and Mahmoud, 2010). در بسیاری از موارد، گزارش شده است که محلول‌پاشی گیاهان با کودهای حاوی روی می‌تواند منجر به افزایش خصوصیات کمی گیاهان دارویی مانند نعناع فلفلی، رزماری (*Salvia farinacea*) و مریم‌گلی شود (Nahed and Balbaa, 2007) که با نتایج بدست آمده در این پژوهش مطابقت دارد، به‌طوریکه محلول‌پاشی با ZnO منجر به افزایش عملکرد متابولیت‌های ثانویه در گیاه بنفشه‌معطر شد.

#### نتیجه‌گیری

استفاده از ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر سالیسیلیک اسید به‌صورت محلول‌پاشی علاوه بر بهبود صفات کمی و کیفی گیاه بنفشه معطر، قادر به تعدیل اثرات منفی تنش کم‌آبی شده و با توجه به ارزان بودن و در دسترس بودن، استفاده از این ترکیب به‌صورت محلول‌پاشی امکان کشت در مناطق خشک و کم‌آب را فراهم می‌کند و باعث مقاومت گیاه در برابر تنش کم‌آبی می‌شود.

پس از تیمار شاهد، تیمارهای نانوآکسید روی و سدیم نیتروپروساید نیز درصد فیتول برگ را افزایش دادند و کمترین درصد (۱/۱۰ درصد) را تیمار ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر SA در ۸۵ درصد FC نشان داد (شکل ۱۳).

متابولیت‌های ثانویه را افزایش می‌دهد (Gorgini Shabankareh et al., 2015). تنش کم‌آبی، سبب افزایش روغن‌های فرار در گیاهان بادرنجبویه (*Melissa officinalis* L.) (Aliabadi Farahani et al., 2009) و زیره سیاه (*Carum carvi* L.) (Laribi et al., 2009) شد. یکی از ترکیباتی که در انتقال پیام و پاسخ به تنش‌های زیستی و غیرزیستی دخالت دارد، SNP است. در آزمایشی روی گیاه مرزه (*Satureja khuzestanica*)، نتایج داده‌ها نشان داد که بیشترین درصد اسانس (۱/۵۸ درصد)، از تیمار ترکیبی ۴۰ درصد FC و ۱۰۰ میلی‌مولار SNP بدست آمد (Gorgini Shabankareh and Fakheri, 2015). سدیم نیتروپروساید نقش دهنده نیتروژن را دارد و کاربرد نیتروژن در گیاهان دارویی و معطر سبب افزایش فتوسنتز، میزان کلروفیل، رشد، توسعه برگ و عملکرد اسانس می‌شود. افزایش میزان اسانس به‌دلیل نقش مهم نیتروژن در توسعه و تقسیم سلول‌های جدید حاوی اسانس، کانال‌های اسانس، مجاری ترشحی و کرک‌های ترشحی است که این اثرات را می‌توان به ترکیب نیتروژن رهاشده از SNP نسبت داد (Nasiby, 2011). در پژوهش حاضر، تیمار ZnO باعث افزایش متابولیت‌های ثانویه در گیاه بنفشه‌معطر شد. گیاهان بادرشبو (*Dracocephalum moldavica* L.) محلول‌پاشی شده با غلظت ۵۰۰ میلی‌گرم بر لیتر نانوذرات روی، بیشترین درصد اسانس را داشتند، درحالی‌که کمترین میزان درصد اسانس مربوط به گیاهان محلول‌پاشی نشده بود (Esmaelpour et al., 2020). مطابق با نتایج این آزمایش، El-Tohamy و همکاران (۲۰۰۹) گزارش

#### منابع

- Acosta-Motos, J. R., Ortuno, M. F., Bernal-Vicente, A., Diaz-Vivancos, P., Sanchez-Blanco, M. J. and Hernandez, J. A. (2017) Plant responses to salt stress: Adaptive mechanisms. *Agronomy* 7: 1-18.
- Agrawal, S., Sairam, R. K., Srivastava, G. C. and Meena, R. C. (2005) Changes in antioxidant enzymes activity and oxidative stress by abscisic acid and salicylic acid in wheat genotypes. *Biologia Plantarum* 49: 541-550.
- Aliabadi Farahani, H., Valadabadi, S. A., Daneshian, J. and Khalvati, M. A. (2009) Evaluation changing of essential oil of balm (*Melissa officinalis* L.) under water deficit stress conditions. *Journal of Medical Plant Research* 3: 329-333.

- Azizabadi, E., Golchin, A. and Delavar, M. A. (2014) Effect of potassium and drought stress on growth indices and mineral content of safflower leaf soil and plant interactions. *Journal of Science and Technology of Greenhouse Culture* 5: 1-12.
- Bates, L. S., Waldren, R. P. and Teare, I. D. (1973) Rapid determination of free proline in water-stress studies. *Plant and Soil* 39: 205-207.
- Beiraghdar, M., Yazdanpoor, S., Naderi, D. and Zakerin, A. (2014) The effects of various salicylic acid treatments on morphological and physiological features of *Zoysia* grass (*Zoysia species*). *Journal of Novel Applied Sciences* 3: 984-987.
- Bezrukova, M., Sakhabutdinova, V., Fatkhutdinova, R., Kyldiarova, R. A., Shakirova, I. and Sakhabutdinova, F. A. R. (2001) The role of hormonal changes in protective action of salicylic acid on growth of wheat seedlings under water deficit. *Agrochemiya (Russ)* 2: 51-54.
- Blum, A. and Ebercon, A. (1981) Cell membrane stability as a measure of drought and heat tolerance in wheat. *Crop Sciences* 21: 43-47.
- Burman, R., Gunasekera, S., Stromstedt, A. A. and Goransson, U. (2014) Chemistry and biology of cyclotides: Circular plant peptides outside the box. *Journal of Natural Products* 77: 724-736.
- Cakmak, I. (2000) Possible roles of zinc in protecting plant cells from damage by reactive oxygen species. *New Phytologist* 146: 185-205.
- Cakmak, I. (2008) Enrichment of cereal grains with zinc: Agronomic or genetic biofortification? *Plant and Soil* 1-2: 1-17.
- Chance, B. and Maehly, A. C. (1955) Assay of catalase and peroxidase. *Methods in Enzymology* 2: 764-775.
- Chretien, D. and Guillot, T. (2000) Lipid and protein changes in jojoba under salt stress. *Physiology of Plant* 85: 372-380.
- Crozier, A., Jaganath, I. B. and Clifford, M. N. (2006) Phenols, Polyphenols and Tannins: An overview. In *Plant Secondary Metabolites: Occurrence, Structure and Role in the Human Diet*. Blackwell, Oxford UK.
- Das, K. and Roychoudhury, A. (2014) Reactive oxygen species (ROS) and response of antioxidants as ROS-scavengers during environmental stress in plants. *Frontiers in Environmental Science* 2: 1-13.
- De Oliveira, W. F., Dos Santos, S., Marcelino, P., Breitenbach Barroso Coelho, L. C., dos Santos, C. and Tereza, M. (2018) Plant antioxidants and mechanisms of action. *Letters in Drug Design and Discovery* 15: 1103-1115.
- Dehghan Nairi, F., Saffari, H. and Maghsoudi Maud, A. (2016) Salicylic acid effects on stomatal characteristics and some growth of calendula plants (*Calendula officinalis* L.) under salt stress. *Iranian Journal of Horticultural Sciences* 47: 193-202.
- Delavari Parizi, M., Baghizadeh, A., Enteshari, Sh. and Manouchehri Kalantari, Kh. (2012) The study of the interactive effects of salicylic acid and salinity stress on induction of oxidative stress and mechanisms of tolerance in *Ocimum basilicum*. *Iranian Journal of Plant Biology* 4: 25-36.
- Dianat, M., Saharkhi, M. J. and Tavassolian, I. (2016) Salicylic acid mitigates drought stress in *Lippia citriodora* L.: Effects on biochemical traits and essential oil yield. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* 8: 286-293.
- Ebrahimi, M., Zamani, Gh. and Alizadeh, Z. (2017) A study on the effect of water deficit stress on physiological and yield-related traits of pot marigold (*Calendula officinalis* L.). 33: 492-508.
- El-Tayeb, M. A. (2005) Response of barley grains to the interactive effect of salinity and salicylic acid. *Journal of Plant Growth Regulation* 46: 215-225.
- El-Tohamy, W. A., Khalid, A. Kh., El-Abagy, H. M. and Abou-Hussein, S. D. (2009) Essential oil, growth and yield of onion (*Allium cepa* L.) in response to foliar application of some micronutrients. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences* 3: 201-205.
- Esmailpour, B., Shiekhalipour, M. and Torabi-Giglo, M. (2020) Effects of zinc nanoparticles on growth, some physiological characteristics, and essential oil yield of *Dracocephalum moldavica* L. under salinity stress conditions. *Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants Research* 36: 867-884.
- Esparham, E., Saeidisar, S., Mahmoodzadeh, H. and Hadi, M. R. (2017) The effects of zinc oxide (ZnO) nanoparticles on the germination, biochemical and ultrastructural cell characteristics of *Ricinus communis*. *Journal of Cell and Tissue* 8: 151-165.
- Fan, H., Li, T., Guan, L., Li, Z., Cai, Y. and Lin, Y. (2012) Effect of exogenous nitric oxide on antioxidant and DNA methylation of *Dendrobium huoshanense* grown under drought stress. *Plant Cell, Tissue and Organs Culture* 109: 307-314.
- Farooq, M., Basra, S. M. A., Wahid, A. and Rehman, H. (2009) Exogenously applied nitric oxide enhances the drought tolerance in fine grain aromatic rice. *Journal of Agronomy and Crop Science* 195: 254-261.
- Fazeli Kakhki, S. F. and Goldani, M. (2014) Effect of salicylic acid on drought stress through improving some morphological, physiological and yield components traits of mustard plant (*Brassica campestris* var. parkland). *Journal of Environmental Stresses in Crop Sciences* 7: 65-77.

- Fusconi, A., Gallo, C. and Camusso, W. (2007) Effect of cadmium on root apical meristems of *Pisum sativum* L.: Cell viability, cell proliferation and microtubule pattern as suitable markers for assessment of stress pollution. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 632: 9-19.
- Gharibi, S., Tabatabaei, B. E. S., Saeidi, G. and Goli, S. A. H. (2016) Effect of drought stress on total phenolic, lipid peroxidation, and antioxidant activity of *Achillea* species. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 178: 796-809.
- Gorgini Shabankareh, H. and Khorasaninejad, S. (2017) Effects of sodium nitroprusside on physiological and biochemical characteristics of savory (*Satureja khuzestanica*) under deficit water regimes. *Journal of Plant Production (Journal of Agricultural Sciences and Natural Resources)* 24: 55-70.
- Gorgini Shabankareh, H. and Fakheri, B. (2015) The effect of different levels of salinity and drought stresses on growth indices and the essential oil of lemon balm (*Melissa officinalis* L.). *Iranian Journal of Field Crop Science* 46: 686-673.
- Harrison, M. T., Tardieu, F., Dong, Z., Messina, C. D. and Hammer, G. L. (2014) Characterizing drought stress and trait influence on maize yield under current and future conditions. *Global Change Biology* 20: 867-878.
- Hayat, Q., Hayata, S. H., Irfan, M. and Ahmad, A. (2010) Effect of exogenous salicylic acid under changing environment: A review. *Environmental and Experimental Botany* 68: 14-25.
- Huang, G. T., Ma, S. L., Bai, L. P., Zhang, L., Ma, H., Jia, P., Zhong, M. and Guo, Z. F. (2012) Signal transduction during cold, salt, and drought stresses in plants. *Molecular Biology Reports* 39: 969-987.
- Ibrahim, E. A. (2016) Seed priming to alleviate salinity stress in germinating seeds. *Journal of Plant Physiology* 192: 38-46.
- Idress, M., Naeem, M., Aftab, T., Masroor, M., Khan, A. and Moinuddin, M. (2013) Salicylic acid restrains nickel toxicity, improves antioxidant defence system and enhances the production of anticancer alkaloids in *Catharanthus roseus* (L.). *Journal of Hazardous Materials* 15: 252-253.
- Javani, F., Abd Almaleki, P. and Ghanati, F. (2008) Investigation on the effect of static magnetic field on the activity of antioxidant enzymes and flavonoid content of broad bean (*Vicia faba* L.). *Research Journal of University of Isfahan "Science* 35: 195-208.
- Joseph, B., Jini, D. and Sujatha, S. (2010) Insight into the role of exogenous salicylic acid on plants grown under salt environment. *Asian Journal of Crop Science* 2: 226-235.
- Justesen, U., Knuthsen, P. and Leth, T. (1998) Quantitative analysis of flavonols, flavones and flavanons in fruits, vegetables and beverages by HPLC with photodiode array and mass spectrometric detection. *Journal of chromatography A* 799: 101-110.
- Kafi, M., Zand, A., Kamkar, B., Sharifi, H. and Goldani, M. (2001) *Plant physiology (translation)*. University Jihad of Mashhad Publications 379: 2.
- Kamkari, B., Asgharzadeh, A. and Azimzadeh, M. (2016) Effects of salt stress and salicylic acid on vegetative and reproductive traits of pot marigold. *Institute of Integrative Omics and Applied Biotechnology* 7: 34-41.
- Kern, L., Glantschnig, S. and Sorgner, U. (1998) Determination of the five major opium alkaloids by reversed-phase high-performance liquid chromatography on a base-deactivated stationary phase. *Chromatographia* 47: 21-24.
- Koc, E., Islek, C. and Ustun, A. S. (2010) Effect of cold on protein, proline, phenolic compounds and chlorophyll content of two pepper (*Capsicum annuum* L.) varieties. *Gazi University Journal of Science* 23: 1-6.
- Kong, J., Dong, Y., Xu, L., Liu, S. and Bai, X. (2014) Effects of foliar application of salicylic acid and nitric oxide in alleviating iron deficiency induced chlorosis of *Arachis hypogaea* L. *Botanical Studies* 55, 9: 1-12.
- Laribi, B., Bettaieb, I., Kouki, K., Sahli, A., Mougou, A. and Marzouk, B. (2009) Water deficit effects on caraway (*Carum carvi* L.) growth, essential oil and fatty acid composition. *Industrial Crops and Products* 30: 372-379.
- Laspina, N. V., Groppa, M. D., Tomaro, M. L. and Benavides, M. P. (2005) Nitric oxide protects sunflower leaves against Cd-induced oxidative stress. *Plant Science* 169: 323-330.
- Li, G. L., Wu, H. X., Sun, Y. Q. and Zhang, S. Y. (2013) Response of chlorophyll Fluorescence parameters to drought stress in sugar beet seedlings. *Russian Journal of Plant Physiology* 60: 337-342.
- Lin, Y. F. and Aarts, M. G. (2012) The molecular mechanism of zinc and cadmium stress response in plants. *Cellular and Molecular Life Sciences* 69: 3187-3206.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J. (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry* 193: 265-75.
- Majeed, S., Nawaz, F., Naeem, M., Ashraf, M. Y., Ejaz, S., Ahmad, K. S., Tauseef, S., Farid, Gh., Khalid, I. and Mehmood, K. (2020) Nitric oxide regulates water status and associated enzymatic pathways to inhibit nutrients imbalance in maize (*Zea mays* L.) under drought stress. *Plant Physiology and Biochemistry* 155: 147-160.
- Milo, J., Levy, A. and Palevitch, D. (1988) High performance liquid chromatographic analysis of the alkaloid spectrum in the roots and capsules of the species and hybrids of *Papaver bracteatum* section *oxytona*. *Journal of Chromatography B* 452: 563-570.
- Mirnia, S. and Habibzadeh, F. (2006) *Plant Nutrition Guide*. Takrang Publications, Tehran.

- Moaveni, P., Aliabadi Farahani, H. and Maroufi, K. (2011) Effect of TiO<sub>2</sub> nanoparticles spraying on wheat (*Triticum aestivum* L.) under field condition. *Advances in Environmental Biology* 5: 2208-2210.
- Moller, I. M., Jensen, P. E. and Hansson, A. (2007) Oxidative modifications to cellular components in plants. *Annual Review of Plant Biology* 58: 459-481.
- Momeni, N., Arvin, M. J., Khagoei Negad, Gh., Keramat, B. and Daneshmand, F. (2013) Effects of sodium chloride and salicylic acid on some photosynthetic parameters and mineral nutrition in maize (*Zea mays* L.) plants. *Iranian Journal of Plant Biology* 5: 15-30.
- Movludi, A., Ebadi, A., Jahanbakhsh, S., Davari, M. and Parmoon, Gh. (2014) The effect of water deficit and nitrogen on the antioxidant enzymes activity and quantum yield of barley (*Hordeum vulgare* L.). *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca* 42: 398-404.
- Nahed, G. and Balbaa, L. K. (2007) Influence of tyrosine and zinc on growth, flowering and chemical constituents of *Salvia farinacea* plants. *Journal Application Science* 3: 1479-1489.
- Nasiby, P. (2011) The effect of different concentrations of sodium nitroprusside (SNP) at a discount oxidative damage induced by drought stress in tomato plants. *Journal of Plant Biology* 2: 74-63.
- Nematollahi, E., Jafari, A. and Bagheri, A. (2013) Effect of drought stress and salicylic acid on photosynthesis pigments and macronutrients absorption in two sunflower (*Helianthus annuus* L.) cultivars. *Plant Ecophysiology* 5: 37-51.
- Nikraves, M., Kholdebarin, B., Nejadstari, T. and Najafi, F. (2016) Effect of sodium nitroprusside (SNP) on some physiological parameters in oilseed rape (*Brassica napus* L.) seedlings under drought stress. *Journal of Plant Research* 29: 658-644.
- Olsen, S. R. and Sommers, L. E. (1982) Phosphorus. In: *Methods of Soil Analysis*. (eds. Page, et al.) Pp. 403-430. ASA, SSSA, Madison. WI. USA.
- Ordóñez, A. A. L., Gomez, J. D., Vattuone, M. A. and Isla, M. I. (2006) Antioxidant activities of *Sechium edule* (Jacq.) Swartz extracts. *Food Chemistry* 97: 452-458.
- Oukarroum, A., Schansker, G. and Strasser, R. J. (2009) Drought stress effects on photosystem I content and photosystem II thermotolerance analyzed using Chl a fluorescence kinetics in barley varieties differing in their drought tolerance. *Physiology of Plant* 137: 188-199.
- Pandey, R. and Agarwal, R. M. (1998) Water stress-induced change in praline contents and nitratereductase activity in rice under light and dark condition. *Physiology and Molecular Biology of Plants* 4: 53-59.
- Sadeghian, F., Hadian, J., Hadavi, M., Mohamadi, A., Ghorbanpour, M. and Ghafarzadegan, R. (2013) Effects of exogenous salicylic acid application on growth, metabolic activities and essential oil composition of *Satureja khuzistanica* Jamzad. *Journal of Medicinal Plants* 12: 1-13.
- Said-Al Ahl, H. A. H. and Mahmoud, A. A. (2010) Effect of zinc and/or iron foliar application on growth and essential oil of sweet basil (*Ocimum basilicum* L.) under salt stress. *Ozean Journal of Applied Sciences* 3: 97-111.
- Sairam, R. K., Veerabhadra Rao, K. and Srivastava, G. C. (2002) Differential response of wheat genotypes to long term salinity stress in relation to oxidative stress, antioxidant activity and osmolyte concentration. *Plant Science* 163: 1037-1046.
- Sakihama, Y., Cohen, M., Grace, S. and Yamasaki, H. (2002) Plant phenolic antioxidant and prooxidant activities phenolic-induced oxidative damage mediated by metals in plant. *Toxicology* 177: 67-80.
- Salarpour Ghoraba, F. and Farahbakhsh, H. (2014) Effects of drought stress and salicylic acid on morphological and physiological traits of (*Foeniculum vulgare* mill.). *Journal of Crops Improvement (Journal of Agriculture)* 16: 765-778.
- Samadi, S., Qasem Nejad, A., Alizadeh, M. and Aflame, M. (2016) Photosynthetic pigments variability, chlorogenic acid, caffeic acid and proline of *Cynara scolymus* callus under the influence of metabolic stimuli. *Iran Horticultural Sciences* 47: 435-443.
- Shibli, R. A., Kushad, M., Yousef, G. G. and Lila, M. A. (2007) Physiological and biochemical responses of tomato micro shoots to induced salinity stress with associated ethylene accumulation. *Plant Growth Regulation* 51: 159-169.
- Shojaei, H. and Makarian, H. (2015) The effect of nano and non-nano zinc oxide particles foliar application on yield and yield components of mungbean (*Vigna radiate*) under drought stress. *Iranian Journal of Field Crops Research* 12: 727-737.
- Singh, A. K. (2004) The physiology of salt tolerance in four genotypes of chickpea during germination. *Journal of Agricultural Science and Technology* 6: 87-93.
- Sivaci, A. and Elmas, E. (2012) The combined effects of cadmium and salinity on some pigments and total phenolic compounds of *Myriophyllum heterophyllum* Michx. and *Potamogeton crispus* L. *Agricultural Research* 7: 3813-3818.
- Smith, K. A. and Mullins, C. E. (1991) *Soil and Environmental Analysis: Physical Methods*. 2<sup>nd</sup> Ed. Revised and Expanded, Marcel Dekker, Inc. New York, Basel.

- Sodaeizadeh, H. and Mansouri, F. (2014) Effects of drought stress on dry matter accumulation, nutrient concentration and soluble carbohydrate of *Salvia macrosiphon* as a medicinal plant. *Arid Biom Scientific and Research Journal* 4: 1-9.
- Solgi, M. and Taghizadeh, M. (2015) Disinfection of African violet *in vitro* culture by using silver nanoparticles by plant extracts. *Journal Processing of Agricultural and Horticultural Crops* 17: 357-349.
- Tian, X. and Li, Y. (2007) Nitric oxide treatment alleviates drought stress in wheat seedlings. *Biologia Plantarum* 50: 775-778.
- Turner, N. C. (1986) Adaptation to water deficit: A changing perspective. *Australian Journal of Plant Physiology* 13: 90-175.
- Waling, I., Vark, W. V., Houba, V. J. G. and Van der Lee, J. J. (1989) *Soil and Plant Analysis, A Series of Syllabi. Part 7. Plant Analysis Procedures*, Wageningen Agriculture University, Netherland.
- Westerman, L. Z. (1990) *Soil Testing and Plant Analysis*. Soil Science Society of America, INC. Madison, Wisconsin, USA.
- Wolf, A., Watson, M. and Wolf, N. (2003) Digestion and dissolution methods for P, K, Ca, Mg and trace elements. *Journal of Environmental Protection* 30-38.
- Yadollahi, P. and Asgharpour, M. R. (2014) The effect of sodium nitroprusside and ascorbic acid on the growth, morphological characteristics and performance parchment pumpkin (*Cucurbita pepo* L.) under irrigated conditions. *Journal of Crop* 6.
- Yang, W., Sun, Y., Chen, S., Jlang, J., Chen, F., Fang, W. and Liu, Z. (2010) The effect of exogenously applied nitric oxide on photosynthesis and antioxidant activity in heat stressed *Chrysanthemum*. *Biologia Plantarum* 54: 1-4.
- Yildiztugay, E., Ozfidan-Konakci, C. and Kucukoduk, M. (2014) Exogenous nitric oxide (as sodium nitroprusside) ameliorates polyethylene glycol-induced osmotic stress in hydroponically grown maize roots. *Journal of Plant Growth Regulation* 33: 683-696.
- Zadeh Bagheri, F., Al Boali, F., Sadeghi, H. and Javanmardi, Sh. (2014) The effect of distant irrigation on ionic changes, relative water content, prolin level, and some general characteristics of petunia. *Journal of Horticulture Science* 28: 259-347.
- Zangani, E., Zehtab Salmasi, S., Andalibi, B. and Zamani, A. A. (2017) Exogenous sodium nitroprusside application on the antioxidant enzymes activity and active substance yield in milk thistle under drought stress. *Journal of Plant Production* 24: 93-110.
- Zare Dehabadi, S., Asrar, Z. and Mehrabani, M. (2010) Biochemical changes in terpenoid compounds of *Mentha spicata* essential oils in response to excess zinc supply. *Iranian Journal of Plant Biology* 2: 25-34.

## Evaluation of salicylic acid, zinc Nano-oxide and sodium nitroprusside pre-treatments on some physiologic parameters and enzymatic activity of sweet violet under water-deficit stress conditions

Hamideh Bagheri<sup>1</sup>, Davood Hashemabadi<sup>1\*</sup>, Bahman Pasban Eslam<sup>2</sup>, Shahram Sedaghatoor<sup>1</sup> and Behzad Kaviani<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Department of Horticultural Science, Rasht Branch, Islamic Azad University, Rasht

<sup>2</sup> Crop and Horticultural Science Research Department, East Azarbaijan Agricultural and Natural Resources Research and Education Center, AREEO, Tabriz

(Received: 05/11/2021, Accepted: 12/04/2022)

### Abstract

Sweet violet (*Viola odorata*) is a perennial herbaceous plant with ornamental and medicinal properties. The purpose of this study was to investigate the effect of different levels of water-deficit and spraying with salicylic acid, sodium nitroprusside and zinc Nano-oxide on physiological parameters, secondary metabolites and enzymatic activity of sweet violet. Factorial experiment in completely randomized design was performed with two factors; water-deficit stress at 3 levels (55, 65 and 85% of field capacity or FC of pot soil) and sprays including salicylic acid (200 and 300 mg/l), zinc Nano-oxide (1000 and 1500 mg/l) and sodium nitroprusside (200 and 300  $\mu$ M) in three replications. The results showed that with increasing water-deficit stress, the amount of phenolic compounds, proline and phytol, as well as the percentage of secondary metabolites, antioxidant enzyme activity and plasma membrane stability increased. The highest phenolic compounds (57.07 mg/galic acid/g D.W.) and proline content (52.47 mg/kg F.W.) were obtained in the treatment of 300  $\mu$ M sodium nitroprusside at 55% of field capacity. The highest activity of superoxide dismutase (1.94 EU/mg/pro./min), catalase (0.198 EU/mg/pro./min) and polyphenol oxidase (0.248 EU/mg/pro./min) were obtained in treatments of 200 mg/l salicylic acid and 200 and 300  $\mu$ M sodium nitroprusside, respectively, in 55% FC. The highest amount of phytol (2.87%) belonged to the control treatment in 55% of FC. The highest amount of sodium (28.60 mg/kg) and phosphorus (0.60 mg/kg) in control plants in 55% stress and potassium (4.29 mg/kg), iron (306 mg/kg F.W.) and dry matter percentage of shoots (26.23) and roots (27.60) was observed in spraying with 1000 mg/l of zinc nanoparticles in stress 85%, 1500 mg/l zinc oxide in stress 65%, 200  $\mu$ M salicylic acid in stress 85% and 1000 mg/l of zinc Nano-oxide in 55% stress, respectively. Totally, the use of 200 mg/l of salicylic acid as spray, in addition to improving the growth and developmental conditions of sweet violet, decreased the negative effects of water-deficit stress and increased plant resistance to water-deficit.

**Keywords:** Salicylic acid, Sodium nitroprusside, Zinc oxide nanoparticle, Water stress, Sweet violet, Secondary metabolites, Antioxidant enzymes

Corresponding author, Email: davoodhashemabadi@yahoo.com