

## بررسی اثر اسید سالیسیلیک بر برخی صفات فیزیولوژیکی گیاه سنبليله تحت تنش خشکی

زهرا توحیدی نژاد، حسن فرحبخش\* و علی اکبر مقصودی مود

<sup>۱</sup>گروه زراعت، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید باهنر کرمان

(تاریخ دریافت: ۹۲/۱۲/۱۶، تاریخ پذیرش نهایی: ۱۳۹۴/۰۴/۲۴)

### چکیده:

برای بررسی تأثیر اسید سالیسیلیک (صفر، ۱۰، ۱۵ و ۲۰ میکرو مولار) بر برخی صفات فیزیولوژیکی سنبليله (*Trigonella foenum-graecum* L.) تحت تنش خشکی (۰، -۳ و -۶ بار)، آزمایشی به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی در سال زراعی ۱۳۹۱ در گلخانه تحقیقاتی دانشگاه شهید باهنر کرمان انجام شد. نتایج نشان داد که تنش خشکی میزان نشت یونی، پرولین و قندهای احیا کننده را به طور معنی داری افزایش داد اما سبب کاهش معنی دار سایر صفات (محتوای نسبی آب، شاخص پایداری غشاء، کلروفیل های a، b، a+b و کاروتنوئید) شد. افزایش سطح اسید سالیسیلیک توانست اثر تنش خشکی را بر صفات ذکر شده به جزء پرولین و قندهای احیا کننده کاهش دهد و منجر به افزایش میزان محتوای نسبی آب، شاخص پایداری غشاء، کلروفیل های a، b، a+b و کاروتنوئید و کاهش نشت یونی، در شرایط تنش خشکی شد. همچنین اثر متقابل بر روی همه ی صفات به جزء پرولین و قندهای احیا معنی دار گشت، که بیانگر پاسخ نسبتاً متفاوت اسید سالیسیلیک در سطوح تنش مختلف می باشد. بنابراین تیمار با سالیسیلیک اسید تحت شرایط تنش می تواند در کاهش و تعدیل اثرات تنش نقش داشته باشد.

کلمات کلیدی: پرولین، قندهای احیا کننده، محتوای نسبی آب، نشت یونی.

### مقدمه:

عنوان یک گیاه دارویی نیز مورد توجه است. یکی از گیاهان دارویی که در طب سنتی ایران و ملل مختلف سابقه ی مصرف دیرینه داشته و خواص درمانی چشمگیری برای آن ذکر شده گیاه سنبليله است. بذر و قسمت های هوایی این گیاه قرن ها به عنوان منبع ارزشمندی از پروتئین در تغذیه انسان و دام و همچنین در طب سنتی نیز تقریباً به همان قدمت، برای درمان دیابت و سل مورد مصرف بوده است (Salehi Surmaghi, 2008).

خشکی به عنوان عامل محدود کننده غیر زنده، اثر بسیار نامطلوبی بر رشد و تولید گیاهان زراعی می گذارد (Cheong et al., 2003). گیاهان به تنش خشکی در سطوح فیزیولوژیکی، سلولی و مولکولی پاسخ می دهند، این پاسخ به گونه و ژنوتیپ گیاه (Araus et al., 2001)، طول دوره و شدت

گیاهان دارویی یکی از منابع غنی کشور هستند که امکان صادرات آن ها نیز وجود دارد. ایران از نظر آب و هوا در زمینه رشد گیاهان دارویی یکی از بهترین مناطق جهان محسوب می شود (صمصام شریعت، ۱۳۸۲). اهمیت گیاهان دارویی سبب شده است که هر ساله تعداد بیشتری از کشاورزان با تغییر نوع کشت از زراعت های معمول به کشت گیاهان دارویی، به سمت تولید این دسته از گیاهان روی آورند (Sharma, 2004). سنبليله با نام علمی *Trigonella foenum-graecum* L. یکی از گیاهان دارویی خانواده نخود است که منشأ آن غرب آسیا (ایران) و نواحی مدیترانه ای گزارش شده است (صمصام شریعت، ۱۳۸۲). سنبليله در کشور ما نه تنها به عنوان سبزی بلکه به

\*نویسنده مسؤول، نشانی پست الکترونیکی: hfarahbakhsh@yahoo.com

با دنباله‌های خطی پروتئین‌ها، تنظیم ژن و تنظیم اسمزی می‌باشد (Ho et al., 2001).

سالیسیلیک اسید یکی از مولکول‌های سیگنال دهنده مهم است که باعث عکس‌العمل گیاه در برابر تنش‌های محیطی می‌شود. این ماده همانند یک آنتی‌اکسیدانت غیرآنزیمی نقش مهمی را در تنظیم فرآیند‌های فیزیولوژیکی در گیاه ایفا می‌کند (Arfan et al., 2007). علاوه بر این سالیسیلیک اسید به عنوان یک مولکول پیام‌رسان در مقاومت اکتسابی سیستمیک شناخته می‌شود (Raskin, 1992) و در واکنش‌های دفاعی گیاه به تنش‌های غیرزنده همچون خشکی، سرما و گرما مشارکت می‌کند (Yuan and Lin, 2008). سالیسیلیک اسید تحت شرایط تنش خشکی نیز می‌تواند از گیاه محافظت کند و سبب افزایش عملکرد آن گردد (Nemeth et al., 2002). به طوریکه کاربرد سالیسیلیک اسید تحت شرایط تنش خشکی سبب افزایش عملکرد گندم گردید (Nemeth et al., 2002). ایجاد تحمل به انواع تنش در گیاهان از راه تیمار با سالیسیلیک اسید و مشتقات آن در کشاورزی، باغبانی و جنگلداری امکان‌پذیر می‌باشد (Senaranta et al., 2002). با توجه به مشاهدات Shakirova و همکاران (۲۰۰۳) کاربرد سالیسیلیک اسید با غلظت ۰/۵ میلی‌مولار عملکرد دانه در گندم را افزایش داد. با توجه به نقش اسید سالیسیلیک در کاهش اثرات تنش خشکی در گیاهان پژوهش حاضر با هدف بررسی اثر اسید سالیسیلیک بر صفات فیزیولوژیکی گیاه شنبلیله در شرایط تنش خشکی اجرا شد.

#### مواد و روش‌ها:

به منظور بررسی اثر تنش خشکی و سطوح مختلف اسید سالیسیلیک بر صفات فیزیولوژیکی شنبلیله، آزمایشی به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار در گلخانه ی دانشکده ی کشاورزی دانشگاه باهنر کرمان در تابستان و پاییز سال ۱۳۹۱ اجرا گردید. تیمارهای آزمایش شامل سه سطح خشکی (۰، ۳- و ۶- بار) و چهار سطح اسید سالیسیلیک (صفر، ۱۰، ۱۵ و ۲۰ میکرومولار) بودند که برای اعمال تنش

کمبود آب (Rampino et al., 2006) و سن و مرحله ی نموی بستگی دارد. غشاهای بیولوژیک اولین هدف تنش‌های غیرزنده در گیاهان هستند (Bajji et al., 2002). در نتیجه صدمه به غشای سلولی، تراوایی افزایش یافته و نشت الکترولیتی از سلول باعث پژمردگی گیاه می‌شود (Blume and Ebercon, 1981). محتوای نسبی آب یکی از خصوصیات فیزیولوژیکی پاسخ دهنده به تنش خشکی است که همبستگی خوبی با تحمل به خشکی نشان می‌دهد (Colom and Vazzana, 2003). در شرایط تنش میزان تعرق افزایش می‌یابد و باعث کاهش حجم آب سلول و محتوای نسبی آب برگ می‌شود (کریمی، ۱۳۸۰). یکی دیگر از پارامترهای فیزیولوژیکی متأثر از تنش خشکی محتوای کلروفیل و کاروتنوئید برگ است برخی از گیاهان در طول تنش خشکی کلروفیل خود را حفظ میکنند و برخی دیگر کلروفیل خود را از دست می‌دهند (Muller et al., 2010). کاهش در محتوای کلروفیل تحت تنش خشکی اساساً به علت خسارت کلروفیل در نتیجه انواع اکسیژن فعال است (Mafakhery and et al., 2010). گیاهان همچنین از سازوکارهای مختلفی برای مقابله با تنش استفاده می‌کنند، یکی از این سازوکارها تنظیم اسمزی است. با تنظیم اسمزی تا حدی شرایط لازم برای ادامه جذب آب از محیط ریشه، حفظ و ادامه آماس سلول فراهم می‌شود (Good and Zaplachinski, 1994). افزایش در میزان قندهای محلول و پرولین از جمله واکنش‌هایی است که گیاهان مختلف برای کاهش پتانسیل اسمزی خود در مقابله با تنش خشکی از خود بروز می‌دهند (Sanchez et al., 1998). آزمایشات روی گیاهان مختلف تحت تنش خشکی نیز این واقعیت را اثبات می‌کند (Movahedi and et al., 2004). اسید آمینه پرولین مانند یک اسموتیکم در تنظیم اسمزی نقش اساسی داشته و ساختمان سه بعدی پروتئین‌ها را در مقابل فشار اسمزی (حاصل از تنش کم آبی) خارج سلولی حفظ می‌کند (Nayyer, 2003). همچنین عمل فیزیولوژیکی قندها، ممانعت از اتصال بین غشاهای مجاور در طول دوره تنش با نگهداری لیپیدها و پایداری پروتئینها از طریق ایجاد پیوندهای هیدروژنی

حاصل با EC متر اندازه گیری شد (EC1). در مرحله ی بعد نمونه ها به مدت ۲۴ ساعت فریز شده و بعد از گذشت این مدت نمونه ها خارج و به آون با دمای ۶۰ درجه ی سانتی گراد منتقل شدند تا یخ آن ها ذوب شود. نمونه ها را از آون خارج و بعد از اینکه دمای آن ها با دمای محیط به تعادل رسید مجدداً هدایت الکتریکی محلول اندازه گیری شد (EC2). در پایان با استفاده از فرمول زیر میزان نشت یونی محاسبه شد.

$$100 * (EC_1/EC_2) = \text{نشت یونی}$$

**شاخص پایداری غشاء:** شاخص پایداری غشا نیز با استفاده از پارامترهای به دست آمده از نشت یونی از طریق فرمول زیر محاسبه گردید.

$$100 * (1 - (EC_1/EC_2)) = \text{شاخص پایداری غشا}$$

**رنگیزه های کلروفیل و کاروتنوئید:** برای سنجش مقدار کلروفیل و کاروتنوئید از روش Lichtenthaler (۱۹۸۷) استفاده شد. ۰/۱ گرم از برگ های تازه ی گیاه در هاون چینی حاوی ۱۰ میلی لیتر استون ۸۰ درصد ساییده شد و پس از سانتریفیوژ کردن، جذب آن با دستگاه اسپکتروفوتومتر (SCO-TECH مدل SPUV-26) در طول موج های ۶۴۶/۸، ۶۶۳/۲ و ۴۷۰ نانومتر خوانده شد و در انتها غلظت رنگیزه های گیاهی با استفاده از رابطه های زیر محاسبه شد.

$$\begin{aligned} \text{Chl a} &= (12.25 * A_{663.2} - 2.79 * A_{646.8}) \\ \text{Chl b} &= (21.50 * A_{646.8} - 5.10 * A_{663.2}) \\ \text{Chl a+b} &= (7.15 * A_{663.2} + 18.71 * A_{646.8}) \\ \text{Car} &= [(1000 * A_{470} - 1.82 * \text{Chl a} - 85.02 * \text{Chl b}) / 198] \end{aligned}$$

**پروپولین:** برای اندازه گیری پروپولین از روش Bates و همکاران (۱۹۷۳) استفاده شد. ۰/۰۲ گرم از بافت فریز شده گیاه (ساقه و برگ) در ۱۰ میلی لیتر محلول سه درصد سولفوسالیسیلیک اسید سائیده و عصاره حاصل به مدت ۱۰ دقیقه در ۵۰۰۰ g سانتریفیوژ شد. سپس دو میلی لیتر از مایع رویی را با دو میلی لیتر معرف نین هیدرین و دو میلی لیتر استیک اسید خالص مخلوط کرده و به مدت یک ساعت در دمای ۱۰۰ درجه سانتی گراد حمام آب گرم قرار دادیم. سپس بلافاصله لوله های محتوی مخلوط در حمام یخ سرد گردید. سپس چهار میلی لیتر تولوئن به مخلوط اضافه و لوله ها به خوبی تکان داده شد. با ثابت نگه داشتن لوله ها به مدت ۱۵ تا

خشکی از پلی اتیلن گلیکول (Polyethylene glycol) استفاده شد. مقدار پلی اتیلن گلیکول لازم برای کاهش پتانسیل آب محیط کشت به ۳- و ۶- بار به ترتیب برابر ۱۳۸ و ۱۸۹ گرم در لیتر محلول محاسبه شد.

قبل از کاشت ابتدا بذرهای شنبلیله را به مدت سه دقیقه در محلول هیپو کلرید سدیم ۵ درصد ضدعفونی و بلافاصله سه مرتبه با آب مقطر کاملاً شستشو داده شدند و در گلدان های کاغذی محتوی ماسه شسته شده کشت گردید؛ در مرحله ی پنچ برگی به محیط هیدروپونیک (حاوی محلول غذایی هوگلند) منتقل شدند (برای هوارسانی به ریشه های گیاه از پمپ هوا استفاده شد). بعد از مدت یک هفته تیمارهای اسید سالیسیلیک در چهار غلظت ذکر شده تهیه و هر غلظت به هر کدام از محیط های کشت اضافه گردید. بعد از گذشت ۴۸ ساعت از اعمال تیمار سالیسیلیک اسید، تیمارهای خشکی در سه سطح ذکر شده اعمال گردید. گیاهان به مدت ۲۴ ساعت در محلول غذایی حاوی غلظت های مختلف پلی اتیلن گلیکول نگهداری شدند.

**محتوای نسبی آب برگ (RWC):** به منظور محاسبه ی محتوای نسبی آب، برگ سوم هر گیاهچه جدا و بلافاصله توزین شد (W1). سپس همان برگ ها درون آب مقطر و در تاریکی به مدت پنج ساعت قرار داده شدند و بعد از گذشت این زمان مجدداً برگ ها توزین و به عنوان وزن اشباع ثبت گردیدند (W2). بعد از آن به منظور تعیین وزن خشک برگ ها به مدت ۲۴ ساعت در آون با دمای ۷۰ درجه ی سانتی گراد قرار داده و سپس توزین شدند (W3). در پایان با استفاده از فرمول زیر محتوای نسبی آب برگ محاسبه شد (Turkan et al., 2005).

$$100 * (W_1 - W_2) / (W_2 - W_3) = \text{محتوای نسبی آب برگ}$$

**نشت یونی:** میزان نشت یونی با استفاده از روش kaya و همکاران (۲۰۰۲) انجام شد. در این روش ابتدا ۰/۱ گرم از برگ توزین گردید سپس ۱۰ میلی لیتر آب مقطر به آن اضافه شد و با گذاشتن درب ظروف به مدت ۲۴ ساعت در دمای آزمایشگاه قرار داده شد و سپس هدایت الکتریکی محلول

۲۰ ثانیه دو لایه مجزا تشکیل شد. میزان جذب لایه رنگی فوقانی که حاوی تولوئن و پرولین بود در ۵۲۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر تعیین شد و برای محاسبه مقدار پرولین از منحنی استاندارد پرولین استفاده گردید و نتایج بر حسب میلی گرم بر گرم وزن تر گزارش شد.

**قندهای احیاء کننده:** برای اندازه گیری مقدار قندهای احیاءکننده از روش Somogy (۱۹۵۲) استفاده شد. ۰/۰۲ گرم از اندام هوایی گیاه با ۱۰ میلی لیتر آب مقطر در هاون چینی سائیده و محتوای هاون به بشر کوچکی منتقل و برای حرارت دیدن روی هیتر قرار داده شد. به محض رسیدن به نقطه ی جوش حرارت قطع و محتوای بشر سانتریفیوژ گردید تا عصاره ی گیاهی به دست آید. دو میلی لیتر محلول سولفات مس به دو میلی لیتر از هر یک از عصاره های تهیه شده اضافه و به مدت ۲۰ دقیقه در حمام آب گرم با دمای ۱۰۰ درجه ی سانتی گراد قرار داده شد. بعد از این مرحله انتهای لوله آزمایش رنگ قرمز آجری مشاهده شد. پس از سرد شدن لوله ها، دو میلی لیتر محلول فسفو مولیبدیک اسید به آن ها اضافه و پس از چند لحظه رنگ آبی پدیدار گردید سپس شدت جذب محلول ها در طول موج ۶۰۰ نانومتر (توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر SCO-TECH مدل SPUV-26) تعیین شد و با استفاده از منحنی استاندارد غلظت قندهای احیاء کننده بر حسب میلی گرم بر گرم وزن تر محاسبه گردید.

**آنالیز داده ها:** آزمایش به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۳ تکرار اجرا گردید. تجزیه واریانس و مقایسه میانگین (به روش LSD) در سطح احتمال ۵ درصد انجام شد. برای تجزیه واریانس داده ها و مقایسه میانگین از نرم افزارهای SAS، SPSS و MSTAT-C و برای رسم نمودارها از نرم افزار Excel استفاده گردید.

## نتایج و بحث:

**محتوی نسبی آب برگ:** نتایج تجزیه واریانس داده ها نشان داد که اثر تنش خشکی و اسید سالیسیلیک در سطح یک درصد و اثر متقابل تنش خشکی در اسید سالیسیلیک در سطح پنج

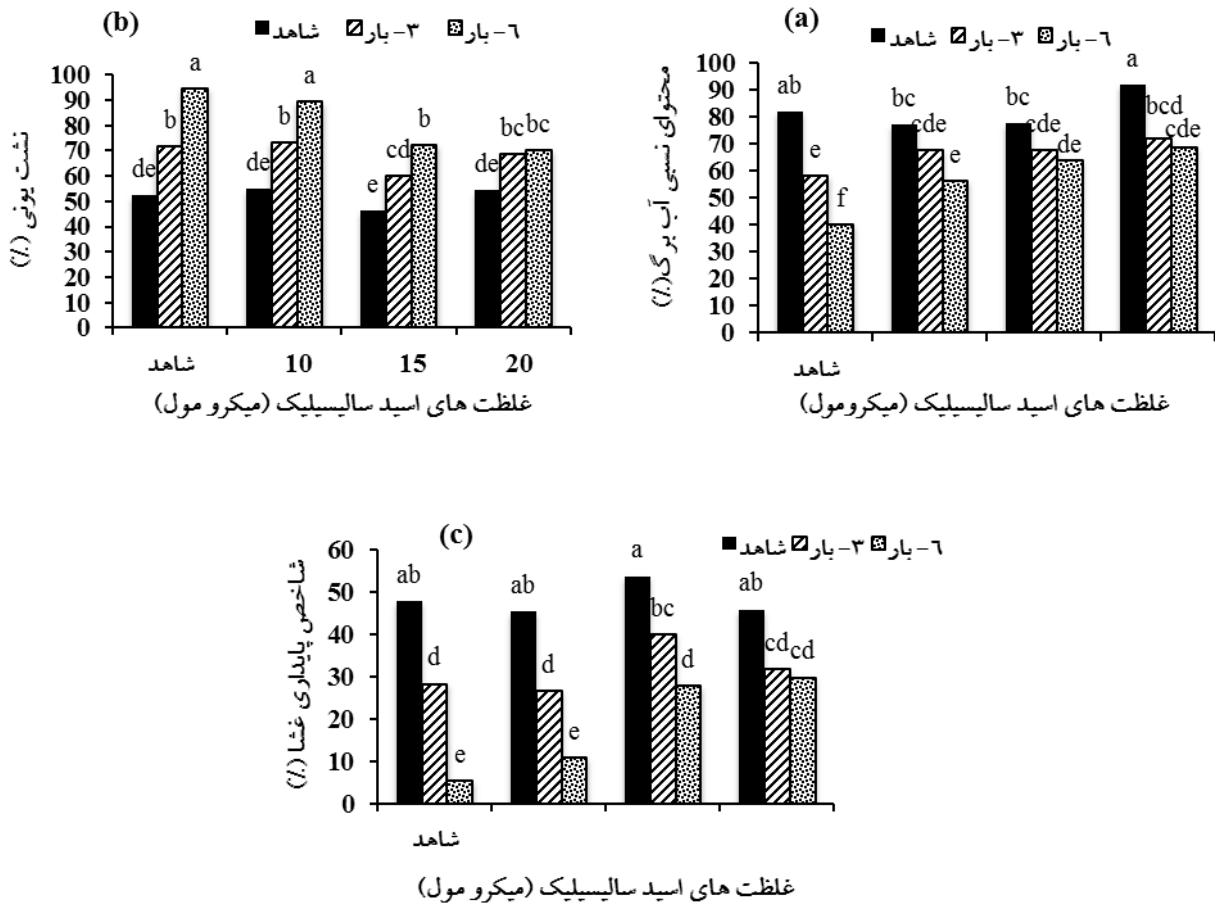
درصد بر محتوای نسبی آب برگ معنی دار است (جدول ۱). بیشترین میزان محتوای نسبی آب از تیمار ۲۰ میکرو مولار و در شرایط بدون تنش خشکی حاصل شد. کمترین میزان محتوای نسبی آب از تیمار بدون اسید سالیسیلیک و از شرایط تنش ۶- بار حاصل شد (شکل ۱ a). افزایش سطح اسید سالیسیلیک (۲۰ میکرو مولار)، سبب افزایش میزان محتوای نسبی آب شده و اثر تنش بر گیاه را کاهش داد (شکل ۱). محتوای نسبی آب یکی از خصوصیات فیزیولوژیکی پاسخ دهنده به تنش خشکی است که همبستگی خوبی با تحمل به خشکی نشان می دهد (Colom and Vazzana, 2003). کاهش پتانسیل آب مانع از تقسیم سلولی، رشد اندام ها، فتوسنتز خالص و سنتز پروتئین می شود و تعادل هورمونی بافت های اساسی گیاه را تغییر می دهد، به خوبی مشخص شده است که طی تنش هایی همچون تنش خشکی محتوای نسبی آب، پتانسیل آب برگ و پتانسیل اسمزی سلول ها کاهش می یابد (Ma et al., 2006). همچنین Anyia و Herzog (۲۰۰۴) نیز گزارش کردند که در اثر تنش خشکی در لوبیا چشم بلبلی محتوای نسبی آب کاهش می یابد. نتایج فوق با یافته های مقدم و همکاران (۱۳۹۰)، خزاعی و همکاران (۱۳۸۴) و Anjum و همکاران (۲۰۱۱) که اظهار نمودند با افزایش تنش محتوای نسبی آب کاهش پیدا می کند مطابقت داشت. Usha و Singh (۲۰۰۳) بیان کردند که گیاهچه های گندم تیمار شده با سالیسیلیک اسید (۳-۱ میلی مول) محتوای رطوبتی بالاتری را در مقایسه با گیاهچه های تیمار نشده در شرایط نرمال و تنش نشان می دهد.

**نشت یونی:** تجزیه واریانس داده ها نشان داد که اثر تنش خشکی و اسید سالیسیلیک در سطح احتمال یک درصد و اثرات متقابل تنش خشکی با سالیسیلیک اسید در سطح احتمال پنج درصد بر میزان نشت یونی معنی دار شد (جدول ۱). میزان نشت یونی در اثر تنش خشکی افزایش معنی داری از خود نشان داد. مطابق شکل b ۱، بیشترین نشت یونی از سطح سوم خشکی (۶- بار) و شاهد اسید سالیسیلیک حاصل شد، که تفاوت معنی داری با سطح سوم تنش خشکی (۶- بار) و سطح

جدول ۱- نتایج تجزیه واریانس اثر تنش خشکی و اسید سالیسیلیک بر صفات مورد بررسی در شنبليله

| منابع تغییر   | درجه آزادی | محتوی نسبی آب | نشت یونی  | شاخص پایداری غشاء | کلروفیل a           | کلروفیل b | a + b           | کاروتنوئید | قندهای احیا           | پرولین              |
|---------------|------------|---------------|-----------|-------------------|---------------------|-----------|-----------------|------------|-----------------------|---------------------|
|               |            | (%)           |           |                   |                     |           | میلی گرم بر گرم |            |                       |                     |
| تنش خشکی      | ۲          | ۱۹۲۰/۸**      | ۲۶۶۳/۱۱** | ۲۶۶۳/۱۱**         | ۶۲/۸۲**             | ۱۲/۹۶**   | ۱۳۲/۸۵**        | ۵/۸۴**     | ۱۰۷/۲۵۷**             | ۱۴۶/۴۲**            |
| اسیدسالیسیلیک | ۳          | ۴۷۵/۶۴**      | ۳۷۸/۲۳**  | ۳۷۸/۲۳**          | ۲/۸۴ <sup>n.s</sup> | ۱/۱۱**    | ۷/۵۰*           | ۰/۲۵**     | ۱۲/۱۰۹ <sup>n.s</sup> | ۸۷/۲۰**             |
| اثر متقابل    | ۶          | ۱۲۱/۸۸*       | ۱۰۶/۷۳*   | ۱۰۶/۷۳*           | ۳/۸۷*               | ۰/۶۳*     | ۷/۰۶*           | ۰/۱۴**     | ۱۰/۸۱۸ <sup>n.s</sup> | ۴/۲۹ <sup>n.s</sup> |
| خطا           | ۲۴         | ۴۹/۴۱         | ۴۰/۹۰     | ۴۰/۹۰             | ۱/۳۸                | ۰/۱۰۸     | ۲/۰۳            | ۰/۰۳۹      | ۱۱/۷۲۶                | ۲/۸۹                |
| ضریب تغییرات  | -          | ۱۰/۲۵         | ۹/۵۱      | ۹/۵۱              | ۱۴/۶۳               | ۱۲/۵۱     | ۱۳/۳۵           | ۱۰/۱۳      | ۲۸/۳۱                 | ۱۳/۵۸               |

\* و \*\* به ترتیب اختلاف معنی دار در سطوح احتمال ۵ و ۱ درصد ns عدم اختلاف معنی دار می باشد.



شکل ۱- نمودار اثر متقابل تنش خشکی و اسیدسالیسیلیک بر محتوای نسبی آب برگ (a)، میزان نشت یونی (b) و شاخص پایداری غشا (c) در شنبليله

اسیدسالیسیلیک و در شرایط بدون تنش (شاهد) حاصل شد (شکل ۱ b). تنش خشکی باعث ایجاد تنش اکسیداتیو در گیاهان در اثر تولید رادیکالهای آزاد اکسیژن در طی فرآیند فتوسنتز و تنفس می گردد (Asada, 1999). این رادیکال های آزاد اکسیژن مستقیماً به پروتئین ها، چربی ها، اسیدهای نوکلئیک و از همه

دوم اسید سالیسیلیک (۱۰ میکرو مولار) نشان نداد. افزایش سطح اسید سالیسیلیک سبب کاهش میزان نشت یونی در شرایط تنش خشکی شد. به طور کلی در شرایط تنش شدید افزایش سطح اسید سالیسیلیک سبب کاهش میزان نشت یونی شده است. کمترین میزان نشت یونی از سطح سوم اسید

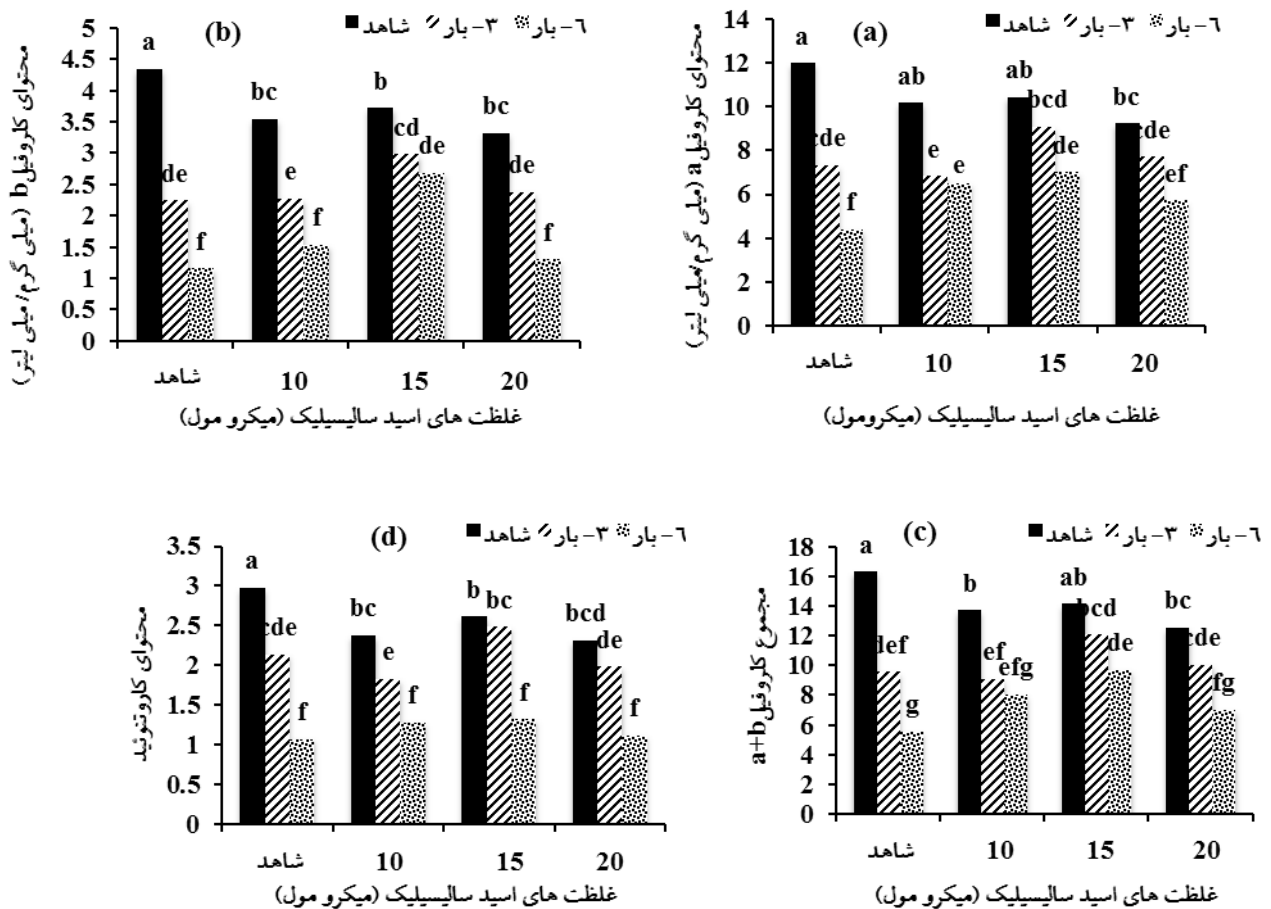
می تواند به یکپارچگی و حفظ غشا تحت شرایط تنش خشکی کمک کند (Nemeth *et al.*, 2002). Stroniski و Bandurska (۲۰۰۵) گزارش کردند در گیاهان جو که قبل از اعمال تنش با سالیسیلیک اسید تیمار شده اند خسارت ناشی از کمبود آب در غشای سلولی برگ ها کاهش یافت.

**رنگیزه های گیاهی (کلروفیل های a, b و a+b):** اثر تنش خشکی بر محتوای کلروفیل a, b و a+b در سطح احتمال یک درصد و اثر اسیدسالیسیلیک و همچنین اثرات متقابل تنش خشکی در سالیسیلیک اسید در سطح احتمال پنج درصد معنی دار شد (جدول ۱). در هر سه صفت اندازه گیری شده (کلروفیل a, b و a+b) بیشترین میزان مربوط به تیمار شاهد خشکی و بدون استفاده از اسید سالیسیلیک بود که تفاوت معنی داری با تیمارهای شاهد خشکی و استفاده از اسید سالیسیلیک ۱۰ و ۱۵ میکرومولار نداشت. نتایج حاکی از این است که تنش خشکی منجر به کاهش معنی دار در رنگیزه های گیاهی (کلروفیل های a, b و a+b) شده است. اما استفاده از اسیدسالیسیلیک با غلظت ۱۵ و ۲۰ میکرومولار در سطوح تنش سبب شد که میزان رنگیزه های گیاهی تأثیر کمتری از تنش بینند (شکل ۲ a, b و c). Antolin و همکاران (۱۹۹۵) اظهار نمودند با افزایش تنش خشکی میزان کلروفیل برگ کاهش می یابد ضمن اینکه افزایش، کاهش و یا عدم تغییر میزان کلروفیل برگ تحت شرایط تنش خشکی با توجه به نوع محصول، مرحله ی رشد، طول دوره ی تنش و شدت تنش خشکی متفاوت است به همین دلیل گزارش ها در مورد تأثیر خشکی بر روی میزان کلروفیل برگ متفاوت است (Araus *et al.*, 1998). دلخوش و همکارانش (۱۳۸۵) در بررسی تنش خشکی بر عملکرد و مقدار کلروفیل ارقام مختلف کلزا نشان دادند که مقدار کلروفیل کل، کلروفیل a و کلروفیل b در ارقام کلزا تحت تیمار تنش کاهش پیدا کرد. همچنین این نتایج با نتایج Kholova و همکاران (۲۰۱۱) و محسن زاده و همکاران (۱۳۸۲) نیز مطابقت داشت.

**کاروتنوئید:** نتایج تجزیه واریانس حاکی از این است که رنگیزه کاروتنوئید تحت تأثیر تنش خشکی، اسیدسالیسیلیک و

مهمتر به غشاء سلولی حمله کرده و سبب مرگ سلولی می شوند. تحقیقات Huang و Fu (۲۰۰۱) نشان داد که تنش خشکی می تواند باعث ناکارآمدی غشای سلولی در برگ شود و به دنبال آن افزایش نفوذپذیری غشا برای الکترولیت ها را سبب گردد. Daneshmand و همکاران (۲۰۰۹) عنوان نمودند که هم شوری و هم خشکی می تواند سبب پراکسیده شدن چربی های غشا و افزایش نشت الکترولیت در گیاهان گردد. در این مطالعه تیمار اسید سالیسیلیک موجب کاهش نشت یونی گردید که خود نشان دهنده افزایش یکپارچگی غشا و کاهش تنش اکسیداتیو در نتیجه تیمار اسید سالیسیلیک بوده است. در مورد نقش سالیسیلیک اسید بر نشت یونی گزارشات متعددی وجود دارد از جمله اینکه سالیسیلیک اسید در غلظت ۰/۱ میلی مولار سبب کاهش نشت یونی در گوجه فرنگی (Singh and Usha, 2003) نسبت به شاهد شد.

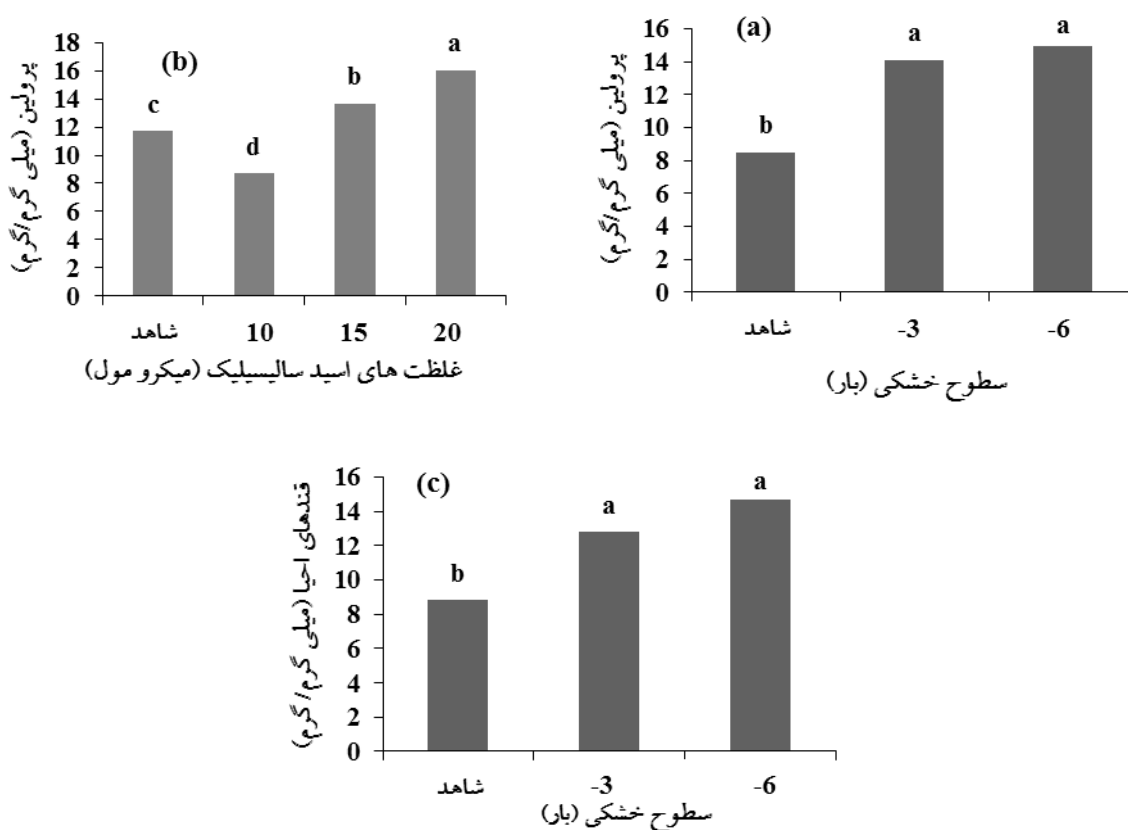
**شاخص پایداری غشا:** تجزیه واریانس داده ها نشان داد، تنش خشکی و اسید سالیسیلیک بر شاخص پایداری غشا در سطح احتمال یک درصد و همچنین اثر متقابل این دو در سطح احتمال پنج درصد معنی دار بود (جدول ۱). بیشترین میزان پایداری از تیمارهایی به دست آمد که فاقد تنش خشکی بوده اند و در بین این تیمارها گروهی که با اسید سالیسیلیک ۱۵ میکرومولار تیمار شده بودند بیشترین مقدار پایداری غشا را نشان دادند (شکل ۱ c). کمترین پایداری غشا مربوط به تنش شدید خشکی (۶- بار) و در شرایط بدون استفاده از اسید سالیسیلیک بود. تنش خشکی منجر به کاهش معنی دار پایداری غشا شد اما از طرفی با افزایش غلظت سالیسیلیک اسید در شرایط تنش میزان پایداری غشا افزایش یافت و توانست اثر تنش خشکی را بر پایداری غشا کاهش دهد (شکل ۱ c). تنش خشکی از تکامل دیواره ممانعت نموده و باعث نشت بیشتر الکترولیتها از دیواره سلولی شده و پایداری غشاء سلولی کاهش می یابد (Shibarrio *et al.*, 1998). به طور کلی کاربرد اسید سالیسیلیک توانست اثرات منفی تنش خشکی را بر پایداری غشا کاهش دهد. کاربرد سالیسیلیک اسید میزان پلی آمین های پوترسین، اسپرمیدین و اسپرمین را در گیاه افزایش می دهد که



شکل ۲- نمودار اثر خشکی و اسید سالیسیلیک بر محتوای کلروفیل a (a)، بر محتوای کلروفیل b (b)، میزان کلروفیل کل (c) و بر محتوای کاروتنوئید (d).

پرویلین در سطح یک درصد معنی دار شد اما نتایج اثر متقابل تنش خشکی در اسید سالیسیلیک بر میزان پرویلین معنی دار نبود (جدول ۱). با توجه به شکل a ۳، بیشترین میزان پرویلین از سطح دوم و سوم تنش حاصل شد. به طوری که تنش سبب افزایش معنی دار پرویلین نسبت به شاهد (عدم تنش) شده است. استفاده از غلظت ۱۵ و ۲۰ میکرومولار اسید سالیسیلیک نسبت به غلظت ۱۰ میکرومولار سبب افزایش معنی دار میزان پرویلین شد که تفاوت معنی داری را نیز با شاهد (عدم استفاده از اسید سالیسیلیک) داشت بنابراین غلظت ۱۰ میکرو مولار اسید سالیسیلیک نسبت به دو غلظت دیگر با کاهش بیشتر میزان پرویلین اثر بیشتری روی تنش خشکی داشت (شکل ۳ b). افزایش غلظت پرویلین، عمومی ترین عکس العملی است که به محض کمبود آب یا کاهش پتانسیل اسمزی نه تنها در گیاهان

هم چنین اثرات متقابل تنش خشکی در اسید سالیسیلیک قرار گرفت و در سطح یک درصد معنی دار شد (جدول ۱). بیشترین میزان کاروتنوئید مربوط به تیمار شاهد خشکی و بدون استفاده از اسید سالیسیلیک (شاهد) و کمترین میزان آن مربوط به تیمار سطح سوم تنش و اسید سالیسیلیک شاهد بوده است (شکل ۲ d). بر طبق نتایج به دست آمده تنش خشکی باعث کاهش میزان کاروتنوئید شد. کاروتنوئیدها انرژی زیادی را از فتوسیستم I به II به صورت گرما یا واکنش هایی بی ضرر دفع کرده و می توانند غشای کلروپلاستی را حفظ نمایند (Juan *et al.*, 2005). افزایش میزان کاروتنوئید در شرایط تنش کم آبی توسط Antolin و همکاران (۱۹۹۵) و Anjum و همکاران (۲۰۱۱) گزارش شده است که با این نتایج مطابق نبود. پرویلین: اثر تنش خشکی و اسید سالیسیلیک بر میزان



شکل ۳- اثر تنش خشکی (a) و اسید سالیسیلیک بر میزان پروتئین (b) و اثر تنش خشکی بر میزان قندهای قابل احیاء (c) در شبلیله. حروف مشابه در هر ستون بیانگر عدم وجود اختلاف معنی دار بر اساس آزمون LSD در سطح ۵ درصد می باشد.

سوم تنش (-۶ بار) بیشترین میزان قند مشاهده شد که نسبت به شاهد افزایش ۳۹ درصدی را نشان داد (شکل ۳ c). در یک مطالعه که به بررسی تأثیر تنش خشکی روی آفتابگردان پرداخته شده بود، این نتیجه حاصل شد که افزایش تنش خشکی موجب افزایش در مقدار قندهای محلول و محتوای پروتئین برگ ها پس از تنش شد (Hamudi *et al.*, 2000). Ahmadi و همکاران (۲۰۰۵) گزارش کردند که قندهای احیاکننده در گیاهان تحت تنش کم آبی، افزایش معنی داری را نسبت به گیاهان شاهد نشان دادند. در یک بررسی که روی کلم صورت گرفت، مشاهده شد با افزایش میزان تنش، مقادیر گلوکز و فروکتوز که جزو قندهای احیاکننده هستند، در ساقه های این گیاه افزایش و مقدار نشاسته، کاهش یافت، در هنگام کاهش پتانسیل آب برگ، تجمع قندهای محلول می تواند در تنظیم اسمزی نقش اساسی را ایفا کند (Sato *et al.*, 2004). نتایج مشابه توسط Damayanthi و همکاران (۲۰۱۰) و Masoudi و همکاران

بلکه در جلبک ها، باکتری ها، بی مهرگان دریایی و پروتوزوآها مشاهده شده است (Chretien and Guillot, 2000). به نظر می رسد پروتئین در بسیاری از گونه های گیاهی و در بسیاری از شرایط تنش از قبیل خشکی، شوری، دما و شدت نور زیاد تجمع می یابد (Claussen, 2005). افزایش پروتئین در گیاه شبلیله در اثر تنش شوری توسط صراحی نویر و همکاران (۱۳۸۹) گزارش شده است. همچنین افزایش پروتئین در برگ های دو رقم توت همراه با افزایش شوری گزارش شده است (Kumar *et al.*, 2003).

**قندهای احیاء:** نتایج تجزیه واریانس داده ها نشان داد اثر تنش خشکی بر میزان قندهای احیاء در سطح احتمال یک درصد معنی دار شد (جدول ۱). اسید سالیسیلیک و همچنین اثر متقابل تنش خشکی و اسید سالیسیلیک بر میزان قندهای احیاء معنی دار نبود. با افزایش سطح تنش (-۶ بار) قندهای قابل احیاء افزایش معنی داری نشان داد به طوری که در سطح



اسید سالیسیلیک نقش مثبتی در کاهش اثرات تنش به خصوص بر روی صفات محتوای نسبی آب، کلروفیل های  $a$ ،  $b$  و  $a+b$  کاروتنوئید، نشت یونی و شاخص پایداری غشا ایفا می کند. به طور کل می توان گفت در بین تیمارهای سالیسیلیک اسید، غلظت های ۱۵ و ۲۰ میکرومولار تاثیر خوبی بر روی القا افزایش تحمل به تنش داشتند.

دانه ذرت در شرایط تنش خشکی در مزرعه، مجله به زراعی نهال و بذر ۲: ۵۵-۴۱.

Ahmadi, M. A., Manuchehri, K. Kh. and Torkzadeh, M. (2005) Effect of type of Brasinoestroid on accumulation of Malon Aldeid, Proline, sugar and photosynthetic pigments in Rapeseed in situation of water stress. *Journal of Biology of Iran* 18: 295-306.

Anjum, S., wang, L., Xiao-yuie, X., Long-chang, W., Muhammad Saleem, F., Chen, M. and Wang, L. (2011) Brassinolide application improves the drought tolerance in maize through modulation of enzymatic antioxidants and leaf gas exchange. *Journal of Agronomy and Crop Science* 197: 177-185.

Antolin, M. Yoller, J. and Sanchez- Diaz, M. (1995) Effects of temporary drought on nitrate-fed and nitrogen-fixing alfalfa plants. *Journal of Plant Science* 107:159-165.

Anyia, A. O. and Herzog, H. (2004) Water use efficiency, leaf area and leaf gas exchange of cowpeas under mid-season drought. *European Journal of Agronomy* 20: 327-339.

Araus, J., Amaro, T. and Sanchez, M. (1998) Chlorophyll fluorensence as a selection criterion for grain yield in durum wheat under Mediterranean conditions. *Journal of Field Crops Research* 55: 209-223.

Araus, J. L., Casadesus, J. and Bort, J. (2001) Recent tools for screening of physiological traits determining yield. In: *Application of physiology in wheat breeding*. (Eds. Reynolds, M. P., Ortiz-Monasterio, J. and McNab, A.). Pp. 59-77. Mexico

Arfan, M., Athar, H. R. and Ashraf, M. (2007) Does exogenous application of salicylic acid through the rooting medium modulate growth and photosynthetic capacity in two differently adapted spring wheat cultivars under salt stress. *Journal of Plant Physiology* 164: 685-694.

Asada, K., (1999) The waterwater cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygens and dissipation of excess photons. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 50: 601-639.

(۲۰۱۱) و همچنین صراحی نوبر و همکاران (۱۳۸۹) گزارش شده است.

### نتیجه گیری:

با توجه به حساسیت نسبی گیاه شنبلیله به تنش خشکی مشخص شد که در این گیاه صفات فیزیولوژیک شدیداً از خشکی تاثیر می پذیرند و در این زمینه کاربرد موادی نظیر

### منابع:

خزاعی، ح، محمد آبادی، ع. و برزوئی، ا. (۱۳۸۴) بررسی صفات مورفولوژیک و فیزیولوژیک انواع ارزن در رژیم های مختلف آبیاری، مجله پژوهش های زراعی ایران ۳: ۳۵-۴۳

دلخوش، ب، شیرانی راد، ا. م، نور محمدی، ق. و درویش، ف. (۱۳۸۵) تاثیر تنش خشکی بر عملکرد و مقدار کلروفیل ارقام کلزا، مجله علمی پژوهشی علوم کشاورزی ۱۲: ۳۶۰-۳۶۷

صراحی نوبر، م، نیکنام، و. و مرادی، ب. (۱۳۸۹) اثر تنش شوری بر محتوای پروتئین، رنگیزه ها، قندها و ترکیبات فنلی در کشت بافت چندگونه از شنبلیله های ایران، مجله علوم دانشگاه تهران ۵۳: ۳۶-۵۹

صمصام شریعت، س. (۱۳۸۲) پرورش و تکثیر گیاهان دارویی. انتشارات مانی.

کریمی، ا. (۱۳۸۰) بررسی اثر ماده ی اصلاحی سوپر جاذب آب بر مصرف آب و رشد گیاه آفتابگردان، مجله ی بیابان ۶: ۹۱-۳۴

محسن زاده، س، فرهی آشتیانی، ص، ملبوبی، م. ع. و قناتی، ف. (۱۳۸۲) اثر تنش خشکی و کلر و کولین کلراید بر رشد و فتوسنتز گیاهچه دو رقم گندم، مجله پژوهش و سازندگی ۱۲: ۵۶-۶۶

مقدم، ن، آروین، م، خواجهویی نژاد، غ. و مقصودی، ع. (۱۳۹۰) اثر اسید سالیسیلیک بر رشد و عملکرد علوفه و

- 54:193-201.
- Kaya, C., Kirnak, H., Higgs, D. and Satali, K. (2002) Supplementary calcium enhances plant growth and fruit yield in strawberry cultivars grown at high (NaCl) salinity. *Science Horticulture* 93, 65-74.
- Kholova, J., Hasan, C. T. M. Khocova, M. and Vadie, V. (2011) Doesa terminal drought tolerace Q TL contribute to differences in ros scavenging enzymes and photosynthetic pigments in pear millet exposed to drought? *Journal of Environmental and Experimental Botany* 71:99-106.
- Kumar, S. G. Reddy, A. M. Sudhakar, C. (2003) NaCl effects on proline metabolism in two high yielding genotypes of mulberry (*Morus alba L.*) with contrasting salt tolerance. *Plant Science* 165:1245-1251.
- Lichtenthaler, H. K. (1987) Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. *Methods in Enzymol, Acta physiology plant* 148: 350-382.
- Ma, Q. Q., Wang, W., LI, Y. H., Li, D. Q. and Zou, Q. (2006) Alleviation of photoinhibition in drought-stressed wheat (*Triticum aestivum*) by foliar applied glycinebetaine. *Journal of Plant Physiology* 163, 165-175.
- Mafakheri, A., Siosemardeh, A., Bahramnejad, B., Struik, P. C. and Sohrabi, E. (2010) Effect of drought stress on yield, prolin and chlorophyll contents in three chickpea cultivars. *Australian Journal Crop Science* 4:580-585.
- Masoudi- Sadaghiani, F., Abdollahi Mandoulakani, B., Zardoshti, M. R., Rasouli Sadaghiani, M. H. and Tavakoli, A. (2011) Response of proline, souluble sugar, photosynthetic pigments and antioxidant enzymes in potato (*Solanum tuberosum L.*) to different irrigation regimes in greenhouse condition. *Australian Journal of Crop Science* 5: 55-60.
- Movahedie Dehnavi, M., Modarese Sanavi, S.A.M., Sorushzadeh, A. and Jalali, M. (2004) Changes of proline, total soluble sugar, chlorophyll (spad) and chlorophyll fluorescence in varieties of autumn Carthamus in effect of drought stress and spray of Zn and Mn. *Journal Desert* 9: 93-110.
- Muller, T., Luttwager, D. and Lentzsch, P. (2010) Recovery from drought stress at the shooting stage in oilseed rape (*Brassica napus L.*) *Journal of agronomy and Crop Science* 196: 81-89
- Nayer, H. (2003) Accumulation of osmolytes and osmotic adjustment in water stressed wheat and maize affected by calcium and its antagonists. *Environmental and Experimental Botany* 50: 253-264
- Nemeth, M., Janda, T., Horvath, E., Paldi, E. and Szalai, G. (2002) Exogenous salicylic acid increase polyamine content but may decreases drought tolerance in maize. *Plant Science*, 162: 569-574.
- Rampino, P., Spano, G., Pataleo, S., Mita, G., Napier, J., Di Fonzo, A. N., Shewry, P. R. and Perrotta, C. (2006) Molecular analysis of a durum wheat stay
- Bajji, M., Kinet, J. and Lutts, S. (2002) The use of the electrolyte leakage method for assessing cell membrane stability as a water stress tolerance test in durum wheat. *Plant Growth Regulation* 36: 61-70.
- Bandurska, H. and stroniski, A. (2005) The effect of salicylic acid on barley respons to water deficit. *Acta Physiologiae Plantarum* 27:379-376.
- Bates, L. S., Waldern, R. P. and Teare, I. D. (1973) Rapid determination of free proline for water stress studies. *Plant and Soil* 39: 205-207.
- Blume, A. and Ebercon, A. (1981) Cell membrane stability as a measure of drought and heat tolerance in wheat. *Crop Science* 27: 1. 43- 47.
- Cheong, Y. H., Kim, K. N. Pandey, G. K., Gupta, R., Grant, J. J. and Luan, S. (2003) CLB1, a calcium sensor that differentially regulates salt, drought, and cold responses in Arabidopsis. *The Plant Cell* 15: 1833- 1845.
- Chretien, D. and Guillot, T. (2000) Lipid and protein changes in jojoba under salt stress. *Physiology Plant* 85:372-380
- Claussen, W. (2005) Proline as a measure of stress in tomato plant. *Plant Science* 168: 241-248.
- Colom, M.R. and Vazzana, C. (2003) Photosynthesis and PSII functionality of drought-resistant and droughtsensitive weeping lovegrass plants. *Environmenetal Experiment Botany* 49, 135-144
- Damayanthi, M. M. N., Mohtti, A. J. and Nissanka, S. P. (2010) Comparison of tolerant ability of mature field grown tea (*Camellia sinensis L.*) cultivars exposed to a drought stress in Passara Area. *Tropical Agriculture Research* 22: 66-75.
- Daneshmand, F. M., Arvin, J. and Kalantari, K. (2009) Effect of Acetylsalicylic Acid (Aspirin) on Salt and Osmotic Stress Tolerance in *Solanum bulbocastanum in vitro* Enzymatic Antioxidants. *American Eurasian Journal of Agricultural & Environmental Sciences* 6:92-99.
- Good, A. and Zaplachinski, S. (1994) The effects of drought on free amino acid accumulation and protein syntesis in Brassica napus. *Physiologia Plantarum* 90: 9-14.
- Hamudi, J., Heydari, R., Nojavan, M. and Zare, S. (2000) Effect of drought stress on biochemical and biological parameters in Sunflower (Rekurd variety). MSc. Thesis. Uromia University, Iran.
- Ho, S., Chao, Y., Tong, W. and Yu, S. (2001) Sugar coordinately and differentially regulates growth and stress-related gene expression via a complex signal transduction network and multiple control mechanisms. *Plant Physiology* 46:281-285
- Huang, B. and Fu, J. (2001) Growth and physiological responses of tall fescue to surface soil drying. *International Turfgrass Society Research Journal* 9:291-296
- Juan, M., Rivero, R. M., Romero, L. and Ruiz, J. M. (2005) Evaluation of some nutritional and biochemical indicators in selecting salt-resistant tomato cultivars. *Environmental Experiment Botany*

- seedlings induced by salicylic acid and salinity. *Plant Science* 164: 317-322.
- Sharma, R. (2004) *Agro-Techniques of Medicinal Plants*. Daya Publishing House, Delhi, 264p.
- Shibario, S. I., Opadhyaya, M. K. and Toivonen, P. M. A. (1998) Influence of pre harvest water stress on post harvest moisture loss of carrots (*Daucus carota* L.). *Journal of Horticultural Science and Biotechnology* 73: 347-352.
- Singh, B. and Usha, K. (2003) Salicylic acid induced physiological and biochemical changes in wheat seedlings under water stress. *Plant Growth Regular* 39: 137-141.
- Somogy, M. (1952) Notes on sugar determination. *Biological Chemistry* 195:19-23
- Turkan, I., Bor, M., Ozdemir, F. and Koca, H. (2005) Differential responses of lipid peroxidation and antioxidants in the leaves of drought - tolerant *P. acutifolius* Gray and drought-sensitive *P. vulgaris* L. subjected to polyethylene glycol mediated water stress. *Plant Science* 168: 223-231.
- Yuan, S. and Lin, H. H. (2008) Role of salicylic acid in plant abiotic stress. *A Journal of Biosciences* 63: 313-320
- green mutant: Expression pattern of photosynthesis-related genes. *Journal of Cereal Science* 43: 160-168.
- Raskin, I. (1992) Role of salicylic acid in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 43: 439-463.
- Newall, C. A., Anderson, L. A. and Phillipson, J. D. (1996) *Herbal Medicines. A Guide for Health-Care Professionals*. 296p.
- Sanches, F.J., Manzanares, M., Andres, E.F., Ternorio, J.L., Ayerbe, L. and De Andres, E.F. (1998) Turgor maintenance, osmotic adjustment and soluble sugar and praline accumulation in 49 pea cultivars in response to water stress. *Field Crop Research* 59: 225-235.
- Sato, F., Yoshioka, H., Fujiwara, T., Higashio, H., Uragami, A. and Tokuda, S. (2004) Physiological response of cabbage pig seedling to water stress during low-temperature storage in darkness. *Journal of Horticultural Science* 101: 349-357.
- Senaranta, T., Teuchell, D., Bumm, E. and Dixon, K. (2002) Acetylsalicylic acid (aspirin) and salicylic acid induce multiple stress tolerance in bean and tomato plants. *Plant Growth Regulation* 30: 157-161.
- Shakirova, M. F., Sakhabutdinova, A. R., Bezrukova, M. V., Fatkhutdinova, R. A. and Fatkhutdinova, D. R. (2003) Changes in the hormonal status of wheat

## Evaluation of salicylic acid effects on some physiological traits of Fenugreek under drought stress

Zahra Tohidi Nejad , Hasan Farahbakhsh \* and Ali Akbar Maghsoudi Moud

Department of Agronomy and Plant Breeding, College of Agriculture, Shahid Bahonar University of Kerman.

(Received: 8 March 2014, Accepted: 15 July 2015)

### Abstract:

To investigate the effects of salicylic acid (0, 10, 15 and 20  $\mu$ M) on some physiological characteristics of Fenugreek (*Trigonella foenum-graecum L.*) under drought stress (0, -3 and -6 Bar) a Factorial experiment based on completely randomized design with three replications was employed in research greenhouse of Shahid Bahonar University of Kerman in 2012 growing season. Results showed that drought stress significantly increased ion leakage, proline and reduced sugar, but decreased other traits (relative water content, membrane stability index, chlorophyll a, b, a+b and carotenoids (ion leakage, Proline and reduced sugar) significantly. Increasing in salicylic acid level ameliorated deleterious effects of drought stress on mentioned traits except proline and reduced sugar and led to increase in relative water content, membrane stability index chlorophyll a, b, a+b and carotenoids under drought stress. Ion leakage also decreased with increasing salicylic acid. All the traits were affected by the interactions except proline and reduced sugar. This implies different response of salicylic acid in different drought stress. Therefore salicylic acid is able to reduce the negative effects of drought stress on this plant..

**Keywords:** Ion leakage, Proline, Reduced sugar, Relative water content.

\*corresponding author, Email: hfarahbakhsh@yahoo.com