نشریهٔ پژوهش‌های حبوبات ایران
جلد۷ شمارهٔ۲، صفحهٔ ۲۱۴-۲۰۲، نیمهٔ دوم ۱۳۹۵

Iranian Journal of Pulses Research
Vol. 7, No. 2, 2016, p. 202-214
DOI: 10.22067/ijpr.v7i2.47507

ارزیابی تأثیر محلول‌پاشی متانول بر برخی شاخص‌های مورفولوژیکی، فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی عدس (*Lens culinaris* Medik) تحت شرایط تنش کم‌آبی

راهله احمدپور[1*]، نظام آرمند[2]، سعیدرضا حسین‌زاده[2] و مهدی رژه[3]

۱- مربی گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه صنعتی خاتم الانبیاء بهبهان، ایران
۲- استادیار گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه صنعتی خاتم الانبیاء بهبهان، ایران
۳- کارمند دانشکده علوم پایه، دانشگاه صنعتی خاتم الانبیاء بهبهان، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۰۳/۲۴
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۰۵/۲۷

چکیده

متانول نقش مؤثری در کاهش اثرات منفی تنش کم‌آبی در گیاهان سه‌کربنه دارد. در این راستا مطالعه‌ای با هدف اثر محلول‌پاشی متانول بر شاخص‌های مورفولوژیکی، فیزیولوژیکی و بیوشمیایی گیاه عدس (رقم گچساران) به‌منظور بهبود اثرات تنش کم‌آبی در دانشگاه صنعتی خاتم‌الانبیاء بهبهان در سال ۱۳۹۳ انجام شد. آزمایش به‌صورت فاکتوریل و در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه‌تکرار در شرایط گلخانه‌ای انجام شد. دو عامل مورد آزمایش عبارت بودند از: تنش کم‌آبی شامل تنش شدید (۲۵درصد ظرفیت زراعی)، تنش ملایم (۵۰ درصد ظرفیت زراعی) و بدون تنش (۱۰۰درصد ظرفیت زراعی) و محلول پاشی متانول با چهار سطح، شاهد، ۲۰، ۲۵ و ۳۰درصد حجمی. محلول پاشی متانول سه‌بار طی فصل رشد گیاه (گیاهچه‌ای، گلدهی و غلاف‌دهی) و با فواصل ۱۰روز صورت گرفت. نتایج نشان‌داد که استفاده از متانول در شرایط بدون تنش و تنش ملایم منجر به افزایش معنی‌دار صفات مورفولوژیکی شد. تحت شرایط تنش کم‌آبی شدید، متانول فقط در افزایش معنی‌دار ارتفاع بوته، وزن خشک اندام هوایی و سطح برگ نقش داشت. بررسی صفات فیزیولوژیکی نشان‌داد که متانول بر غلظت عناصر برگی (سدیم، پتاسیم و کلسیم) تأثیر معنی داری نداشت، اما در تمامی سطوح تنش کم‌آبی منجر به افزایش معنی‌دار محتوای نسبی آب و پایداری غشای سلول شد. در مورد صفات بیوشیمیایی، نتایج نشان‌داد که کاربرد متانول تأثیر معنی‌داری بر فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت برگی نداشت، اما تحت شرایط تنش ملایم و شدید، محتوای پروتئین و پرولین را افزایش داد. با توجه به نتایج این مطالعه، استفاده از متانول به‌صورت محلول‌پاشی برگی در جهت کاهش اثرات منفی تنش کمبود آب در گیاه عدس توصیه می‌شود.

واژه‌های کلیدی: تنش خشکی، حبوبات، فعالیت آنتی‌اکسیدانتی، صفات مورفوفیزیولوژیکی

مقدمه

عدس گیاهی است دیپلوییید، یک‌ساله با شاخ‌وبرگ زیاد و انشعابات فراوان ساقه که به‌صورت بوته‌ای رشد می‌کند (Oweis *et al*., 2005). این گیاه یکی از مهم‌ترین حبوبات بوده و نقش بسزایی در تغذیه و سلامت انسان دارد، به‌طوری‌که دانه‌های عدس سرشار از منابع پروتئینی، مواد مغذی (پتاسیم، فسفر، آهن و روی)، ویتامین‌ها و همچنین اسیدآمینه‌های لوسین و تریپتوفان برای تغذیه انسان می‌باشند (Erskine *et al*., 2009). در ایران عدس پس از نخود و لوبیا در بین حبوبات از اهمیت خاصی برخوردار است و به‌دلیل حساسیت زیاد به تنش‌های مختلف، دارای عملکرد بسیار پایین است (Parsa & Bagheri, 2008; Khamadi *et al*., 2008). یکی از مهم‌ترین مشکلات تولید محصولات زراعی در مناطق خشک و نیمه‌خشک مشکل کمبود آب و نزولات جوی است (Oweis *et al*., 2005). پژوهشگران متعددی گزارش کردند که تنش کم‌آبی در گیاهان مختلف منجر به کاهش شاخص‌های مورفولوژیکی (ارتفاع بوته، وزن خشک برگ و ساقه، تعداد برگ، سطح برگ) و فیزیولوژیکی (فتوسنتز خالص، غلظت CO_2 درون سلولی، پایداری غشاء، محتوای آب نسبی و غلظت برخی عناصر برگی) می‌شود (Porsa *et al*., 2001; Zaferanieh *et al*., 2010; Ganjeali *et al*., 2011; Hosseinzadeh *et al*., 2015). بستن روزنه‌ها به‌منظور کاهش تعرق، اولین مکانیسم مقاومتی گیاهان به تنش کم‌آبی است، اما از اثرات منفی این پاسخ در گیاهان، کاهش ورود CO_2 به سلول‌های برگی و کاهش فتوسنتز است (Rahbarian *et al*., 2011). به‌نظر می‌رسد که استفاده از موادی که بتواند منجر به افزایش

[*] **نویسنده مسئول:** استان خوزستان، شهرستان بهبهان، ابتدای جاده دیلم، دانشگاه صنعتی خاتم‌الأنبیاء، دانشکده علوم، گروه زیست‌شناسی
تلفن همراه: ۰۹۳۳۵۹۱۲۲۷۱، ahmadpour_tmu@yahoo.com

CO_2 برگی شود، بتواند برخی از اثرات منفی تنش کم آبی را جبران کند (Hosseinzadeh *et al*., 2014). یکی از راهکارهای افزایش غلظت CO_2 درون برگی در گیاهان استفاده از متانول می‌باشد (Nadeali *et al*., 2010). متانول ماده کاملاً شناخته‌شده برای گیاهان می باشد، زیرا این ماده یکی از ساده‌ترین فرآورده‌های گیاهی است که توسط گیاهان خصوصاً طی رشد برگ‌ها و در اثر دمتیلاسیون پکتین در دیواره‌های سلولی آن‌ها تولید می‌شود. گیاهان می‌توانند متانول محلول‌پاشی‌شده بر روی برگ‌ها را به‌راحتی جذب کرده و آن را به عنوان منبع کربنی اضافه بر کربن اتمسفر مورد استفاده قرار دهند (Ehyaei *et al*., 2010). مطالعات بر روی نخود، لوبیا، چغندر قند و کلزا نشان داد که کاربرد برگی متانول منجر به افزایش معنی دار خصوصیات مورفولوژیکی در مقایسه با سطوح عدم‌کاربرد متانول می‌گردد (Zebic *et al*., 2003; Safarzade Vishkaei *et al*., 2008; Ehyaei *et al*., 2010). محتوای نسبی آب می تواند به‌عنوان شاخص مناسبی جهت ارزیابی میزان تحمل گیاهان به تنش خشکی، مورد استفاده قرار گیرد (Yordanov *et al*., 2003). گزارش‌هایی وجود دارد که نشان می‌دهد محلول‌پاشی متانول با افزایش فتوسنتز و قندسازی در برگ ها سبب کاهش نیاز آبی گیاهان در شرایط کمبود آب می‌شود (Safarzade Vishkaei *et al*., 2008). با افزایش تنش کم آبی، گیاهان با تجمع مواد محلول در سلول، پتانسیل آبی خود را کاهش می دهند. این مواد محلول شامل قند های محلول، سوربیتول، بتائین، اسیدهای آلی، اسیدهای‌آمینه، پرولین وگلایسین و یون‌هایی مانند پتاسیم و کلسیم می‌شوند (Hu & Schmidhalter, 2005). کمبود پتاسیم در گیاهان منجر به کاهش فعالیت روبیسکو، هدایت‌روزنه‌ای و افزایش گونه‌های فعال اکسیژن می‌گردد و در نهایت باعث کاهش فتوسنتز می‌شود (Cakmak, 2005). تجمع پرولین و پروتئین‌های محلول از نشانگرهای مهم مقاومت به تنش خشکی در باکتری‌ها، جلبک‌ها و گیاهان عالی به‌حساب می‌آید (Ashraf & Iram, 2005). تنش کم‌آبی شدید سبب تولید گونه های اکسیژن فعال در گیاهان شده و عدم‌حضور مکانیسم محافظتی جهت حذف آن ها، سبب تخریب لیپیدها، پروتئین‌ها و اسیدهای نوکلئیک می‌گردد. از این رو سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانتی سبب محافظت از لیپیدها، پروتئین‌ها و نوکلئیک اسیدها در مقابل اثرات تخریبی گونه های اکسیژن فعال می‌شود (Ahmed *et al*., 2002).

باتوجه به‌این‌که یکی از مشکلات عمده کشاورزی در ایران کمبود آب بوده و مهم‌ترین اثر تنش کمبود آب کاهش معنی‌دار شاخص‌های مورفولوژیکی و فیزیولوژیکی در گیاهان است، هدف از انجام این تحقیق پاسخ به‌این سوال بود که آیا محلول‌پاشی متانول در کاهش اثرات منفی ناشی از تنش کم آبی در گیاه عدس مؤثر است؟

مواد و روش‌ها

این آزمایش به صورت فاکتوریل و در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار در شرایط گلخانه‌ای در دانشگاه صنعتی خاتم‌الانبیاء بهبهان انجام شد. تیمارهای موردبررسی در آزمایش عبارت بودند از: محلول پاشی متانول در چهار سطح شاهد (بدون محلول پاشی)، ۲۰، ۲۵ و ۳۰درصد حجمی و تنش کم‌آبی در سه‌سطح بدون تنش (۱۰۰درصد ظرفیت زراعی)، تنش ملایم (۵۰درصد ظرفیت زراعی) و تنش شدید (۲۵درصد ظرفیت زراعی). تیمارهای مورد بررسی بر اساس آزمایش های مقدماتی و نتایج تحقیقات سایر محققان انتخاب شد. بذرهای عدس (رقم گچساران) به‌مدت ۲۴ساعت در آب خیسانده شده و سپس در چهار قسمت از گلدان کشت شدند. گلدان‌ها در اتاقک رشد در شرایط کنترل‌شده با درجه‌حرارت روز و شب به‌ترتیب ۲۵ و ۲۰درجه سانتی‌گراد و ۱۲/۵ساعت روشنایی و ۱۱/۵ساعت تاریکی قرار گرفتند. به منظور اعمال تنش خشکی ابتدا یک گلدان که دارای ۲۵۰۰گرم خاک بود در داخل آون در درجه حرارت ۸۰درجه سانتی گراد قرار داده‌شد و پس از ۴۸ساعت توزین شد و وزن خاک خشک تعیین شد. سپس در گلدانی دیگر ریخته‌شده و به‌آرامی و تا حد اشباع، آب به خاک خشک‌شده اضافه گردید و پس از خارج‌شدن کامل آب ثقلی، گلدان توزین شد و پس از کسر وزن گلدان و خاک خشک مقدار آب نگهداری‌شده در ظرفیت زراعی تعیین شد و تیمارهای مختلف بر این اساس محاسبه شدند. آبیاری گلدان‌ها به‌مدت دو هفته تا سبزشدن بذرهای عدس انجام شد. پس از این زمان، گلدان ها مطابق تیمار های آزمایشی (سطوح مختلف تنش کم‌آبی) هر دو روز یک‌بار آبیاری شدند. کاربرد محلول آبی متانول به‌صورت محلول‌پاشی بر روی برگ‌ها و سه‌بار در طی فصل رویشی گیاه با فواصل ۱۰روزه انجام شد. اولین محلول‌پاشی در مرحله گیاهچه‌ای (چهارهفته پس از کاشت) و محلول پاشی های بعدی، به‌ترتیب در مراحل گلدهی و غلافدهی انجام شد. محلول‌پاشی تا زمان جاری‌شدن قطره های محلول روی برگ ادامه یافت (برای هر گلدان حدوداً ۶۷سی‌سی استفاده شد). اندازه‌گیری صفات یک‌روز بعد از محلول‌پاشی سوم (در مرحله غلاف‌دهی) انجام گرفت.

صفات مورفولوژیکی

به منظور سنجش صفات رشدی، بخش هوایی از ریشه گیاه تفکیک شد. صفات رشدی شامل ارتفاع بوته، تعداد غلاف، تعداد برگ، سطح برگ، وزن خشک برگ و اندام هوایی اندازه‌گیری شدند. برای تعیین وزن خشک، نمونه‌ها به‌مدت ۴۸ساعت در آون ۷۲درجه سانتی‌گراد خشک شدند و سپس وزن آن ها با ترازوی AND مدل GT-300 ساخت کشور آلمان با دقت ۰/۰۰۱گرم تعیین شد.

صفات فیزیولوژیکی

به منظور تعیین محتوای آب نسبی موجود در برگ، مقدار معینی از برگ دوم گیاهان برداشت شده و به‌مدت ۴۸ساعت در آب‌مقطر غوطه‌ور شدند. سپس برگ‌ها از آب خارج و سطح آن‌ها با دستمال کاغذی خشک شد و مجدداً وزن آن‌ها اندازه‌گیری گردید. در مرحله بعد، برگ‌ها در آون ۷۰درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۴۸ساعت خشک شدند و وزن آن‌ها نیز محاسبه شد. محتوای آب نسبی با استفاده از معادلهٔ۱ محاسبه شد:

معادلهٔ (۱)

$$RWC = [\,(FW - DW) / (TW - DW)\,] * 100$$

در این معادله، RWC محتوای نسبی آب، FW وزن تَر برگ، DW وزن خشک برگ و TW وزن برگ در حالت تورژسانس کامل است (Bian & Jiang, 2008). برای تعیین شاخص پایداری غشاءی سلولی، ۰/۱گرم از برگ دوم گیاهان برداشت شده و داخل دو گروه لوله آزمایش، حاوی ۱۰میلی‌لیتر آب‌مقطر گذاشته شدند. یک گروه از لوله‌ها به‌مدت ۳۰دقیقه در بن‌ماری ۴۰درجه سانتی‌گراد و گروه دیگر به‌مدت ۱۰دقیقه در بن‌ماری ۱۰۰درجه سانتی گراد قرار گرفتند. پس از کاهش دمای لوله‌ها تا حد دمای محیط، هدایت‌الکتریکی نمونه ها به‌وسیله دستگاه سنجش هدایت‌الکتریکی (Model RS232, AZ Instrument Corp, Taiwan) اندازه‌گیری و سپس شاخص پایداری غشاء از معادله (۲) مطابق روش (Sairam & Saxena, 2001) به‌دست آمد:

=شاخص پایداری غشاء

(هدایت‌الکتریکی آب در دمای۱۰۰°C/ هدایت‌الکتریکی آب در دمای۴۰°C)-۱

اندازه‌گیری میزان عناصر موجود در بافت برگ، به‌وسیله دستگاه فلیم‌فتومتر (Sherwood Scientific, Cambridge, United Kingdom) انجام شد (Chapman & Patt, 1982). بدین‌صورت که در ارلن ۱۰۰میلی‌لیتری، ۰/۰۵گرم پودر حاصل از برگ خشک‌شده هر تیمار، به‌طور جداگانه با سه‌میلی‌لیتر اسیدنیتریک غلیظ مخلوط شدند. سپس به‌مدت ۷۲-۴۸ساعت در محیط آزمایشگاه قرار گرفتند. در نهایت ارلن‌ها در زیر هود و بر روی کوره دمایی به آرامی حرارت داده شدند. تصاعد دود سفید و بی‌رنگ شدن محلول اسیدی، نشانه پایان عمل هضم بود. حجم محلول باقیمانده با آب‌مقطر به ۵۰میلی‌لیتر رسید. سپس غلظت سدیم، پتاسیم و کلسیم با استفاده از منحنی استاندارد بر حسب گرم در صد گرم وزن خشک بافت برگ محاسبه شد.

صفات بیوشیمیایی

برای استخراج و سنجش پروتئین و پرولین به‌ترتیب از روش Lowry (1951) و Bates *et al*, (1973) استفاده شد. مقدار پرولین بر اساس میکرومول در گرم وزن تَر نمونه گیاهی مطابق فرمول زیر محاسبه شد.

= میکرومول پرولین در گرم وزن تَر

$$\left(\frac{\mu g\ \ prolin}{ml} \times \frac{ml\ \ toloen}{115.5\left(\frac{\mu g}{\mu mol}\right)}\right) / \frac{gr\ \ sample}{5}$$

فعالیت آنزیم پراکسیداز به‌روش Holy (1972) اندازه‌گیری شد. منحنی جذب نوری نمونه‌ها با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر (Model SPEKOL 2000, Analyticjena, Germany) هر ۳۰ثانیه به‌مدت سه‌دقیقه در طول‌موج ۵۳۰نانومتر رسم شد و در نهایت فعالیت ویژه آنزیم بر حسب تغییرات واحد آنزیم در دقیقه به‌ازاء هر میلی‌گرم پروتئین محاسبه شد. برای اندازه گیری میزان فعالیت آنزیم کاتالاز از روش Candlee & Scandalios (1984) استفاده شد. در این روش منحنی تغییرات جذب در طول‌موج ۲۴۰نانومتر به‌مدت سه-چهار دقیقه بررسی شد. فعالیت آنزیم برحسب تغییرات واحد در دقیقه به‌ازای هر میلی‌گرم پروتئین محاسبه شد. سنجش فعالیت آنزیم سوپراُکسیددیسموتاز با استفاده از روش Beauchamp & Fridovich (1971) انجام شد. تجزیه آماری داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار MSTAT-C انجام شد و برای مقایسه میانگین ها از آزمون چنددامنه دانکن ($p \leq 0.05$) استفاده شد.

نتایج و بحث

برهمکنش کاربرد متانول و تنش کم آبی بر پارامترهای مورفولوژیکی

نتایج مقایسه میانگین داده‌ها نشان‌داد که در شرایط بدون تنش و تنش شدید، کاربرد برگی متانول در کلیه سطوح در مقایسه با شاهد افزایش معنی‌داری بر ارتفاع بوته داشت. در شرایط تنش ملایم، کاربرد ۲۵ و ۳۰ درصد حجمی متانول در

مقایسه با عدم استفاده از آن موجب افزایش معنی‌داری (به‌ترتیب هشت‌درصد و ۹درصد) در ارتفاع گیاه شد (جدول ۱). از مهم‌ترین اثرات تنش کم‌آبی در گیاهان کاهش رشد اندام هوایی و ارتفاع گیاه است که دلیل اصلی آن کاهش ترشح هورمون های رشد و افزایش مواد بازدارنده رشد گزارش شده است (Bayoumi *et al*., 2008). کاهش ارتفاع گیاه در شرایط تنش کم‌آبی در سایر گیاهان از جمله نخودفرنگی (Games *et al*., 2005)، نخود (Ganjeali *et al*., 2011) و عدس (Salehi *et al*., 2006) نیز گزارش شده است. متیلوتروفیک باکتری‌هایی هستند که به‌صورت همزیست در برگ‌های بسیاری از گیاهان زراعی مشاهده شده و نقش بارزی در افزایش رشد گیاهان زراعی دارند (Ivanova *et al*., 2001). این باکتری‌ها در محیط‌های حاوی کربن تجمع کرده و از متانول موجود که به‌صورت طبیعی در برگ‌های گیاهان ساخته‌شده استفاده می‌کنند. متانول در برگ‌های گیاهان از فرایند دمتیلاسیون پکتین در دیواره سلول‌های برگی تولید می‌شود (Madhaiyan *et al*., 2006). نقش اصلی باکتری‌های مذکور این است که در ازای دریافت متانول از برگ پیش‌سازهای هورمون‌های گیاهی سیتوکینین و اکسین را در اختیار گیاه قرار می‌دهند (Abanda *et al*., 2006). در مطالعه بر روی کتان و نخود گزارش شده است که کاربرد برگی متانول با افزایش سیتوکینین و افزایش تقسیم سلولی و در نهایت تحریک رشد موجب افزایش ارتفاع گیاهان تیمارشده می‌گردد (Makhdum *et al*., 2002; Hosseinzadeh *et al*., 2014).

جدول ۱- مقایسه میانگین صفات مورفولوژیکی عدس تحت تأثیر سطوح مختلف کاربرد متانول و تنش کمبود آب

Table 1. Comparison of morphological traits of lentil under different levels of methanol application and water deficit stress

تیمارها/ متانول Treatments/Methanol	وزن خشک برگ Leaf dry weight (g/plant)	تعداد برگ در گیاه Leaf number per plant	سطح برگ Leaf area (cm^2)	تعداد غلاف Number of pod	وزن خشک اندام هوایی Shoot dry weight (mg/plant)	ارتفاع بوته Plant height (cm)
بدون تنش کم‌آبی (۱۰۰درصد ظرفیت زراعی)Non stress (100% field capacity)						
شاهد Control	0.263 f	39.33 bcd	785.6 c	5 cde	1.213 b	31.87 b
20%	0.306 ab	41.33 abc	943.6 ab	7.3 a	1.533 a	34.83 a
25%	0.316 a	44.33 a	996.3 a	7 ab	1.557 a	36.27 a
30%	0.296 de	42 ab	897.2 b	6 abc	1.520 a	34.77 a
تنش کم‌آبی ملایم (۷۵درصد ظرفیت زراعی)Moderate water stress (75% field capacity)						
شاهد Control	0.210 f	31.53 fg	660.4 fg	4.3 de	0.916 d	26.97 d
20%	0.230 e	35.67 def	701.3 def	5.6 bcd	1.137 bc	28.77 cd
25%	0.246 de	37 cde	753.9 cde	6 abc	1.270 b	29.17 c
30%	0.241 de	35.67 def	767.4 cd	4.6 cde	1.183 bc	29.70 c
تنش کم‌آبی شدید (۲۵درصد ظرفیت زراعی) Severe water stress (25% field capacity)						
شاهد Control	0.173 h	30.33 g	600.2 g	2.6 f	0.703 e	21.27 f
20%	0.193 fg	31.67 fg	657.5 fg	3.6 ef	0.923 d	23.33 e
25%	0.196 fg	32.71 efg	684.4 ef	4 ef	1.013 cd	23.67 e
30%	0.190 gh	32.67 efg	650.7 fg	4 ef	1.020 cd	24.63 e

در هر ستون میانگین‌هایی که حداقل دارای یک حرف مشترک می‌باشند، مطابق آزمون چنددامنه‌ای دانکن ($p \leq 0.05$) اختلاف معنی‌داری ندارند.

The means with one same letter in each column are not significantly differences at $P \leq 0.05$ according to Duncan's test.

نتایج نشان داد که در شرایط بدون تنش، تیمار با متانول در سطوح ۲۰ و ۲۵درصد حجمی به‌طور معنی‌داری تعداد غلاف در بوته را در مقایسه با سطح شاهد به ترتیب ۳۱درصد و ۲۸درصد افزایش داد. در شرایط تنش ملایم، تیمار ۲۵درصد حجمی متانول در مقایسه با تیمار شاهد موجب افزایش معنی داری (۲۸درصد) تعداد غلاف شد، اما تفاوت معنی داری با دیگر تیمارهای متانول نداشت. در شرایط تنش شدید از نظر این صفت اختلاف معنی‌داری بین تیمارهای مختلف متانول وجود نداشت (جدول۱). گزارش شده است که تنش کم‌آبی منجر به کاهش اجزای عملکردی نظیر تعداد غلاف در بوته در حبوبات می‌شود (Parsa & Bagheri, 2008) که با نتایج این مطالعه منطبق می باشد. غلافدهی معمولاً تحت تأثیر شرایط محیطی به‌ویژه کمبود آب قابل‌دسترس در خاک قرار می‌گیرد، بنابراین شرایط محیطی می تواند سهم غلاف‌ها از عملکرد نهایی را تغییر دهد (Parsa & Bagheri, 2008). در مطالعه انجام شده بر روی نخود بیشترین تعداد غلاف در تیمار ۲۰ و ۳۰درصد متانول مشاهده شد که مهم‌ترین دلیل آن را آسیمیلاسیون بیشتر کربن و افزایش فتوسنتز بیان کردند

(Ehyaei *et al*., 2010). متانول بعد از محلول‌پاشی از طریق آنزیم متانول‌اکسیداز تبدیل به فرمالدهید و سپس تبدیل به فرمات (متانوئیک اسید) می شود. فرمات در مرحله بعد توسط آنزیم فرمات‌دهیدروژناز تبدیل به CO_2 شده و باعث افزایش CO_2 درون‌سلولی در گیاه می‌شود. بنابراین متانول به‌عنوان یک منبع کربن می تواند در افزایش فتوسنتز خالص نقش داشته باشد (Hosseinzadeh *et al*., 2014). مقایسه میانگین داده ها در ارتباط با خصوصیات برگی نشان داد که در شرایط بدون تنش کم آبی و تنش ملایم بیشترین تعداد برگ در تیمار با ۲۵درصد متانول حاصل شد که در مقایسه با تیمارهای شاهد به‌ترتیب ۱۱درصد و ۱۵درصد افزایش داشت. در شرایط تنش شدید، تیمارهای مختلف کاربرد متانول از نظر تعداد برگ با یکدیگر تفاوت معنی‌داری نداشتند (جدول ۱). تحت شرایط بدون تنش، کاربرد برگی متانول در تمامی سطوح شاخص سطح برگ را در گیاه به‌صورت معنی‌داری افزایش داد. در شرایط تنش کم آبی ملایم و شدید مشاهده شد که تیمار ۲۵درصد حجمی در مقایسه با تیمارهای شاهد شاخص سطح برگ را ۱۲درصد افزایش داد (جدول ۱). معلوم شده است که کمبود آب قابل‌دسترس در بستر کشت گیاهان، تأثیر مستقیمی بر کاهش سطح و تعداد برگ‌ها دارد (Ganjeali & Nezami, 2008). در این مطالعه نیز تنش کم‌آبی ملایم و شدید در مقایسه با شرایط بدون تنش سطح و تعداد برگ را کاهش داد. محلول پاشی متانول از طریق اثر بر روی سرعت تولید اتیلن، پیری برگ ها را به تعویق انداخته و سبب فعالیت فتوسنتزی بیشتر برگ‌ها شده و در نتیجه سبب افزایش سطح و تعداد برگ می‌شود (Ivanova *et al*., 2001). کاربرد متانول به‌صورت محلول‌پاشی برگی علاوه‌بر افزایش فشار آماس سلول‌های برگی که به رشد و توسعه برگ ها کمک می کند، در فعال شدن آنزیم پکتین‌متیل‌استراز نقش اساسی دارد. ثابت شده است که افزایش فرآیند دمتیلاسیون پکتین توسط آنزیم متیل‌استراز منجر به افزایش یون کلسیم در سلول های برگی و در نهایت بزرگ‌شدن برگ‌ها می‌شود (Ramirez *et al*., 2006). مقایسه میانگین‌ها در اثرات متقابل متانول و کم‌آبی نشان‌داد که تیمارهای متانول در تمامی شرایط تنش منجر به افزایش معنی‌دار وزن خشک اندام هوایی در مقایسه با تیمارهای شاهد شد (جدول ۱).

بر اساس نتایج، وزن خشک برگ در اثر کاربرد برگی متانول افزایش معنی داری در شرایط بدون تنش و تنش ملایم داشت (جدول۱). در شرایط تنش شدید، تیمارهای ۲۰ و ۲۵درصد حجمی افزایش معنی‌داری (به‌ترتیب ۱۰درصدو ۱۲درصد) نسبت به تیمار شاهد داشتند. در شرایط تنش کمبود آب، برگ‌ها کوچک‌تر و تعداد آن‌ها نیز کمتر می‌شود. کاهش تعداد برگ در زمان تنش می‌تواند به‌علت پیری زودرس، به‌منظور کاهش تعرق و رسیدگی زودتر گیاه در شرایط کم‌آبی باشد (Parsa & Bagheri, 2008). محلول‌پاشی متانول بر ظرفیت فتوسنتزی گیاهان و افزایش عملکرد آن ها خصوصاً در شرایط تنش‌های محیطی نقش به‌سزایی دارد، بدین‌صورت که با افزایش میزان CO_2 درون سلولی، آنزیم روبیسکو در جهت فرآیند کربوکسیلاسیون ($RUBP + CO_2$) فعالیت می‌کند و منجر به افزایش میزان قندسازی در برگ می شود. از طرفی با افزایش میزان CO_2 قابل دسترس، میزان تنفس نوری در اثر اکسیژناسیون ($RUBP+O_2$) آنزیم روبیسکو کاهش می یابد (Hosseinzadeh *et al*., 2014).

افزایش وزن خشک برگ و اندام هوایی در اثر کاربرد متانول را می توان به افزایش صفات مورفولوژیکی موردبررسی در این آزمایش از قبیل ارتفاع بوته، تعداد برگ و سطح برگ نسبت داد. در تحقیقی که بر روی دو رقم نخود تحت تنش خشکی صورت گرفت، مشاهده شد که محلول پاشی متانول در سطح ۳۰درصد حجمی بیشترین میزان وزن خشک برگ را نسبت به دیگر سطوح آن داشت (Ehyaei *et al*., 2010). در آزمایشی بر روی چغندرقند، بیشترین ماده خشک هوایی در تیمار ۳۰درصد حجمی متانول گزارش شد (Nadeali *et al*., 2010)

برهم کنش کاربرد متانول و تنش کم آبی بر پارامترهای فیزیولوژیکی

با درنظرگرفتن تمامی سطوح تنش کمبود آب (بدون تنش، ملایم و شدید) استفاده از محلول آبی متانول در تمامی سطوح موردبررسی منجر به افزایش معنی‌دار محتوای نسبی آب در مقایسه با سطوح شاهد شد (جدول۲). نتایج مطالعات پژوهشگران نشان داده است که کاربرد برگی متانول در گیاهانی که با کمبود آب مواجه‌اند، منجر به افزایش رطوبت و محتوای نسبی آب برگ ها می گردد. این محققان دلیل افزایش محتوای آب نسبی در گیاهان تیمارشده با متانول را دوبرابرشدن میزان قند تولیدشده در برگ گیاهان بیان کردند (Nadeali *et al*., 2010, Safarzade Vishkaei *et al*., 2008). متانول بعد از محلول پاشی متابولیزه شده و با افزایش میزان CO_2 درون‌برگی سبب افزایش میزان آماس و تولید کربوهیدرات در برگ ها می‌شود (Hosseinzadeh *et al*., 2014).

نتایج اثرات متقابل متانول و تنش بر پایداری غشاء سلول‌های برگی عدس نشان‌داد که در شرایط بدون تنش کم‌آبی و تنش شدید، تیمارهای متانول به‌صورت معنی‌داری پایداری غشاء سلول را نسبت به سطوح شاهد افزایش دادند. در

شرایط تنش ملایم، تیمار ۲۵درصد حجمی نسبت به تیمار شاهد افزایش معنی دار پنج درصدی داشت. اما افزایش این صفت در تیمارهای ۲۰ و ۳۰ درصد نسبت به تیمار شاهد معنی‌دار نبود (جدول ۲). معلوم شده است که تنش کم‌آبی با کاهش فشار تورگر و افزایش تخریب‌کننده هایی مانند انواع واکنش‌گر اکسیژن، نقش مستقیمی در تخریب غشاءهای سلولی و کاهش رشد دارند (Bayoumi *et al*., 2008). کاهش ضریب پایداری غشاء در شرایط تنش خشکی در سایر گیاهان مانند گندم و زیتون نیز گزارش شده است (Guerfel *et al*., 2008). از مهم‌ترین مزایای کاربرد برگی متانول افزایش جذب آب به واسطه حفظ پتانسیل اسمزی سلول است. در یک مطالعه بر روی خصوصیات ریشه گیاه نخود تحت تأثیر کاربرد برگی متانول مشاهده شد که متانول با افزایش فتوسنتز و تولید کربوهیدرات نقش مهمی در برقراری پتانسیل اسمزی منفی این گیاه دارد و با افزایش میزان جذب آب، اثرات منفی ناشی از کمبود آب را به‌حداقل می‌رساند (Hossinzadeh *et al*., 2012). در مطالعه حاضر می‌توان یکی دیگر از دلایل منفی تر شدن پتانسیل اسمزی در اثر کاربرد متانول را افزایش تنظیم‌کننده های اسمزی از قبیل پرولین و پروتئین محلول برگی ذکر کرد (جدول ۳).

جدول ۲- مقایسه میانگین صفات فیزیولوژیکی عدس تحت تأثیر سطوح مختلف کاربرد متانول و تنش کمبود آب

Table 2. Comparison of physiological traits of lentil under different levels of methanol application and water deficit stress

تیمارها/متانول Treatments/ Methanol	غلظت کلسیم Concentration Ca g $100g^{-1}$ leaf dw	غلظت پتاسیم Concentration K $g100g^{-1}$ leaf dw	غلظت سدیم Concentration Na g $100g^{-1}$ leaf dw	پایداری غشاء سلول Cell membrane stability	محتوای آب نسبی Relative water content (%)
بدون تنش کم‌آبی (۱۰۰درصد ظرفیت زراعی) Non stress (100% field capacity)					
شاهد Control	1.52 a	2.43 a	0.976 d	0.432 bc	0.717 c
20%	1.49 a	2.44 a	0.993 cd	0.502 a	0.747 b
25%	1.52 a	2.49 a	0.991 cd	0.507 a	0.793 a
30%	1.51 a	2.44 a	1.087 c	0.498 a	0.758 b
تنش کم‌آبی ملایم (۷۵درصد ظرفیت زراعی) Moderate water stress (75% field capacity)					
شاهد Control	1.38 b	2.21 b	1.207 b	0.417 c	0.695 d
20%	1.38 b	2.20 b	1.183 b	0.426 bc	0.714 c
25%	1.33 bc	2.20 b	1.203 b	0.438 b	0.713 c
30%	1.37 b	2.17 b	1.200 b	0.421 bc	0.714 c
تنش کم‌آبی شدید (۲۵درصد ظرفیت زراعی) Severe water stress (25% field capacity)					
شاهد Control	1.21 d	2.08 b	1.397 a	0.368 e	0.631 e
20%	1.23 d	2.10 b	1.380 a	0.388 d	0.695 d
25%	1.25 cd	2.08 b	1.353 a	0.392 d	0.691 d
30%	1.22 d	2.06 b	1.387 a	0.385 d	0.683 d

* در هر ستون میانگین‌هایی که حداقل دارای یک حرف مشترک می‌باشند، مطابق آزمون چنددامنه‌ای دانکن ($p \leq 0.05$) اختلاف معنی‌داری ندارند.

The means with one same letter in each column are not significantly differences at $P \leq 0.05$ according to Duncan's test.

مقایسه میانگین داده های مربوط به غلظت پتاسیم و کلسیم برگی نشان داد که در کلیه سطوح تنش کم‌آبی، تیمارهای متانول در مقایسه با تیمارهای شاهد موجب بروز اختلاف معنی‌داری بر این صفت نشدند، اما تنش کم‌آبی ملایم و شدید منجر به کاهش معنی‌دار غلظت‌های پتاسیم و کلسیم نسبت به‌شرایط بدون تنش شد (جدول ۲). نتایج اثرات متقابل متانول و تنش بر غلظت سدیم برگی نشان‌داد که تنش کم‌آبی شدید منجر به افزایش معنی دار غلظت سدیم برگی در مقایسه با شرایط بدون تنش و تنش ملایم شد. در شرایط بدون تنش، غلظت سدیم برگی در تیمار ۳۰ درصد متانول نسبت به تیمار شاهد ۱۰درصد افزایش معنی‌داری داشت، اما در شرایط تنش ملایم و شدید، تیمارهای متانول موجب ایجاد تفاوت معنی‌داری بر غلظت این عنصر در برگ‌ها نشدند (جدول ۲). به‌نظر محققان جذب مواد غذایی از خاک با وضعیت آب موجود در خاک ارتباط مستقیم دارد، به طوری که با کاهش رطوبت خاک جریان انتشاری موادغذایی از خاک به سطح ریشه‌ها کاهش می یابد که این کاهش به‌دلیل محدودشدن سرعت تعرق، آسیب‌رساندن به انتقال فعال و کاهش قابلیت نفوذ غشایی است که در نهایت منجر به کاهش انتقال موادغذایی به اندام‌های هوایی می‌شود (Arndt *et al*., 2001). از مهم‌ترین دلایل دیگر تنش کم‌آبی بر روند جذب برخی عناصر از قبیل پتاسیم و کلسیم، کاهش تحرک این عناصر در خاک است (Khoshbakht *et al*., 2014). Osuagwu *et al*, (2010) گزارش کردند که تنش خشکی میزان عناصر پتاسیم و کلسیم

را در برگ‌های گیاه *Ocimum gratissimum* کاهش داد که علت آن را حرکت عناصر مذکور از برگ ها به ریشه بیان کردند، زیراکه در این شرایط این دو عنصر به‌عنوان محافظت‌کننده‌های اسمزی عمل می‌کنند. در این مطالعه نیز میزان پتاسیم و کلسیم تحت تنش کم‌آبی شدید نسبت به‌شرایط بدون تنش و تنش ملایم کاهش معنی داری داشت (جدول ۳). سدیم از جمله کاتیون‌های قابل‌حل در خاک‌های مناطق خشک و نیمه‌خشک است. اغلب گیاهان به غلظت بالای سدیم حساس‌اند، زیرا پایداری یون‌های داخل سلول را برهم می‌زند و منجر به عملکرد ضعیف غشاء و اختلال در واکنش‌های متابولیکی می‌شود (Hu & Schmidhalter, 2005) . تجمع یون سدیم در برگ و سمیت ناشی از تجمع این یون باعث کاهش فتوسنتز، تولید ماده خشک و عملکرد می شود. مطالعات نشان می‌دهد که در هنگام تنش خشکی، میزان سدیم در ریشه و برگ افزایش می یابد و برای جلوگیری از سمیت آن، گیاه سعی در خروج و یا به‌واکوئل‌فرستادن آن دارد (Tester & Davenport, 2003). نتایج این مطالعه نیز افزایش غلظت سدیم برگی را در اثر تنش کم‌آبی اثبات می‌کند.

برهمکنش کاربرد متانول و تنش کم آبی بر پارامترهای بیوشیمیایی

محتوای پرولین برگی در اثر تیمارهای مختلف کاربرد متانول در مقایسه با تیمارهای شاهد در هر دو شرایط تنش کم‌آبی ملایم و شدید، افزایش معنی‌داری داشت، ولی در شرایط بدون تنش کم آبی اختلاف بین تیمارهای مختلف مصرف متانول با یکدیگر از نظر آماری معنی‌دار نبود (جدول۳). افزایش پرولین در شرایط تنش کمبود آب، علاوه بر حفظ ساختار غشاء، ایجاد سازگاری اسمزی و حفظ ساختار آنزیم ها در سلول، نقش مهمی در محافظت از ماکرومولکول‌های مهم از قبیل نوکلئیک‌اسیدها و پروتئین‌ها دارد (Tewfik, 2008). به‌دلیل خاصیت هیدروفیلی پرولین، این مولکول ممکن است جایگزین مولکول‌های آب در اطراف نوکلئیک‌اسیدها، پروتئین‌ها و مولکول‌های غشایی گردد و از این طریق اثر یون‌های تخریب‌کننده برای ترکیبات را کاهش داده و بدین‌وسیله محافظت از این ترکیبات و ساختار غشاء را انجام دهد (Bayoumi *et al*., 2008). مطالعات متعددی افزایش پرولین را در گیاهان تحت تنش خشکی گزارش کردند (Najaphy *et al*., 2010; Rahbarian *et al*., 2012) . نتایج اکثر مطالعات انجام‌شده در زمینه تأثیر متانول بر گیاهان نشان داده است که متانول محلول‌پاشی‌شده بر روی برگ‌ها توسط آنزیم متانول‌اکسیداز و با ازدست‌دادن $2H^+$ تبدیل به فرمات (متانوئیک اسید) می شود. فرمات در مرحله بعد توسط آنزیم فرمات‌دهیدروژناز تبدیل به CO_2وH^+ می‌شود (Zebic *et al*., 2003; Ramandant & Omran, 2005; Hosseinzadeh *et al*., 2014). از طرف دیگر گزارش شده است که آنزیم بیوسنتز کننده پرولین تحت عنوان پیرولین ۵-کربوکسیلات سنتتاز (P5CS) در شرایط اسیدی بیشترین فعالیت را دارد (Yordanov *et al*., 2003). احتمالاً متانول با آزادکردن H^+ در اسیدی کردن محیط و افزایش فعالیت این آنزیم نقش داشته باشد.

بررسی محتوای پروتئین محلول برگی نشان داد که در شرایط بدون تنش کم‌آبی، تیمارهای متانول اختلاف معنی‌داری باهم نداشتند، اما در شرایط تنش ملایم، محتوای پروتئین محلول برگی در تیمار ۲۵درصد متانول در مقایسه با تیمار شاهد افزایش معنی داری (۸/۵درصد) داشت. در شرایط تنش شدید نیز محتوای پروتئین محلول برگی در تیمارهای متانول در مقایسه با تیمار شاهد افزایش معنی‌داری داشت (جدول ۳). در شرایط بروز تنش های غیرزنده از قبیل خشکی، شوری، گرما و سرما، بیان یک سری از پروتئین ها در گیاه افزایش می یابد که این پروتئین‌ها در ایجاد سازگاری با شرایط تنش ایفای نقش کرده و علاوه‌بر آن، در شرایط تنش شوری و خشکی در سازگاری اسمزی گیاه نیز نقش دارند (Ashraf & Harris, 2004). دریک آزمایش، تنش کمبود آب غلظت پرولین و پروتئین‌های محلول را در برگ‌های نخود افزایش داد، به‌طوری‌که غلظت پروتئین‌های محلول در برگ‌ها تا ۴۳درصد در مقایسه با تیمار شاهد افزایش داشت (Najaphy *et al*., 2010). Madhaiyan *et al*., (2006) گزارش کردند که باکتری‌های متیلوتروف موجود در برگ گیاهان با مصرف متانول به‌عنوان ماده مغذی قادر به تولید اکسین و سیتوکینین در برگ شدند و با توجه به‌این‌که این هورمون‌ها در افزایش پروتئین سازی نقش مهمی دارند، بنابراین این محققان بیان کردند که ارتباط مستقیمی بین محلول پاشی متانول و افزایش پروتئین سازی در گیاهان وجود دارد. در آزمایشی بر روی سویا و بادام‌زمینی گزارش شد که محلول‌پاشی متانول منجر به افزایش مقدار پروتئین در گیاه شد (Safarzade Vishkaei *et al*., 2008; Mirakhori *et al*., 2010)

نتایج مقایسه میانگین‌داده‌ها در برهمکنش متانول و تنش نشان داد که فعالیت آنزیم پراکسیداز در تیمار ۲۵درصد متانول تحت شرایط بدون تنش کم‌آبی کاهش معنی‌داری (۶درصد) در مقایسه با تیمار شاهد داشت. در شرایط تنش ملایم و شدید، تیمارهای متانول با تیمارهای شاهد، اختلاف معنی‌داری نداشتند (جدول ۳). فعالیت آنزیم

سوپراکسیددیسموتاز و کاتالاز تحت اثر تنش کم‌آبی شدید افزایش معنی‌داری در مقایسه با شرایط بدون تنش داشت، اما در تمامی سطوح تنش کم آبی، تیمارهای متانول نسبت به تیمارهای شاهد اختلاف معنی‌داری نداشتند (جدول ۳). پراکسیدهیدروژن و سوپراُکسیدهیدروژن اولین ترکیبات تولیدشده در شرایط تنش کم‌آبی هستند. آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت از قبیل پراکسیداز، سوپراُکسیددیسموتاز و کاتالاز اولین سد دفاعی در برابر آن‌ها می‌باشند، بنابراین افزایش فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدانت تحت تنش خشکی منطقی است (Gunes *et al*., 2006). سوپراُکسیددیسموتاز از مهم‌ترین پالایش‌کننده‌های سوپراُکسید است. در نتیجهٔ فعالیت این آنزیم، سوپر اُکسید به پراکسید هیدروژن و اکسیژن تبدیل می‌شود. سپس پراکسیدهیدروژن تولیدشده به‌وسیله پراکسیدازها پالایش می‌گردد (Eraslan *et al*., 2007). افزایش فعالیت پراکسیداز تحت تنش آب نشان‌دهنده شکل گیری بخش زیادی H_2O_2 در طول تنش آبی است (Helal & Samir, 2008). در مطالعه بر روی ژنوتیپ‌های نخود مشاهده شد که تنش خشکی منجر به افزایش معنی دار فعالیت پراکسیداز و سوپراکسیددیسموتاز در مقایسه با تیمار بدون تنش شد (Rahbarian *et al*., 2012). در مطالعه‌ای که بر روی ذرت انجام گرفت، گزارش شد که افزایش فعالیت کاتالاز، سبب افزایش پتانسیل دفاعی گیاه در مقابل تنش خشکی شده و میزان تحمل آن را به تنش خشکی بهبود می‌بخشد (Helal & Samir, 2008). یک حالت از تشکیل گونه‌های واکنش‌گر اکسیژن بسته‌شدن روزنه به‌عنوان یک پاسخ به تنش کم آبی و در نتیجه کاهش غلظت CO_2 در مزوفیل برگ و در نتیجه تجمع NADPH است. در این حالت اکسیژن به‌عنوان یک پذیرنده جایگزین الکترون‌ها عمل می‌کند که منجر به تشکیل رادیکال‌های سوپراُکسید می‌شود (Yordanov *et al*., 2003). متانول با تبدیل به CO_2 سبب افزایش غلظت CO_2 درون سلول های برگی شده و با انجام عمل فتوسنتز و ماده‌سازی بیشتر منجر به مصرف NADPH تولیدشده در زنجیره انتقال الکترون می شود. بدین ترتیب از تجمع آن در کلروپلاست سلول‌های برگی و تشکیل سوپراُکسید جلوگیری می‌شود. کاهش معنی‌دار آنزیم پراکسیداز در شرایط بدون تنش کم‌آبی را می‌توان به افزایش بیشتر فتوسنتز و کاهش تجمع NADPH نسبت داد.

جدول ۳- مقایسه میانگین صفات بیوشیمیایی عدس تحت تأثیر سطوح مختلف کاربرد متانول و تنش کمبود آب

Table 3. Comparison of biochemical characteristics of lentil under different levels of methanol application and water deficit stress

تیمارها/متانول Treatments/ Methanol	فعالیت سوپراکسید دیسموتاز SOD Activity Unit μg^{-1} Protein	فعالیت کاتالاز CAT Activity Unit μg^{-1} Protein	فعالیت پراکسیداز POX Activity Unit μg^{-1} Protein	محتوای پروتئین Protein content (mg g^{-1}DW)	پرولین Prolin ($\mu mol\ g^{-1}FW$)
بدون تنش کم‌آبی (۱۰۰درصد ظرفیت زراعی) Non stress (100% field capacity)					
شاهد Control	7.147 ef	0.221 bc	0.312 d	1.437 e	1.13 f
20%	6.590 ef	0.208 c	0.313 d	1.530 de	1.40 ef
25%	6.417 f	0.212 bc	0.293 e	1.510 e	1.36 ef
30%	7.317 e	0.209 c	0.305 de	1.543 de	1.26 ef
تنش کم‌آبی ملایم (۷۵درصد ظرفیت زراعی) Moderate water stress (75% field capacity)					
شاهد Control	8.633 bcd	0.230 ab	0.373 c	1.577 cde	1.63 e
20%	8.303 cd	0.229 ab	0.368 c	1.700 bc	3.06 bc
25%	8.127 d	0.228 ab	0.364 c	1.723 b	2.90 cd
30%	8.350 cd	0.229 ab	0.371 c	1.710 bc	2.66 cd
تنش کم‌آبی شدید (۲۵درصد ظرفیت زراعی) evere water stress (25% field capacity)					
شاهد Control	9.903 a	0.245 a	0.418 a	1.660 bcd	2.60 d
20%	9.447 ab	0.244 a	0.413 ab	2.110 a	3.46 ab
25%	9.273 ab	0.240 a	0.405 ab	2.113 a	3.53 a
30%	9.317 ab	0.247 a	0.414 ab	2.020 a	3.33 ab

* در هر ستون میانگین‌هایی که حداقل دارای یک حرف مشترک می‌باشند، مطابق آزمون چنددامنه‌ای دانکن ($p \leq 0.05$) اختلاف معنی‌داری ندارند.

The means with one same letter in each column are not significantly differences at $P \leq 0.05$ according to Duncan's test.

منابع

1. Abanda, D., Musch, M., Tschiersch, J., and Schawb, M. 2006. Molecular interaction between Methylobacterium extorquens and seedling growth promotion, methanol consumption and localization of the methanol emission site. Journal of Experimental Botany 57(15): 4025-4032.
2. Ahmed, S., Nawata, E., Hosokawa, M., Domae, Y., and Sakuratani, T. 2002. Alterations in photosynthesis and some antioxidant enzymatic activity of mungbean subjected to waterlogging. Journal of Plant Science 163: 117-123.
3. Arndt, S.K.K., Clifford, S.C., Wanek, W., Jones, H.G., and Popp, M. 2001. Physiological and morphological adaptations of the fruit tree *Ziziphus rotundifolia* in response to progressive drought stress. Tree Physiology 21: 705-715.
4. Ashraf, M., and Harris, P.J.C. 2004. Potential biochemical indicators of salinity tolerance in plants. Journal of Plant Science 166: 3-16.
5. Ashraf, M., and Iram, A. 2005. Drought stress induced changes in some organic substances in nodules and other plant parts of two potential legumes differing in salt tolerance. Journal of Flora 20: 535-546.
6. Bates, L.S., Waldern, R.P., and Teare, I.D. 1973. Rapid determination of free proline for water stress studies. Plant Soil Environment 39: 205-207.
7. Bayoumi, T.Y., Eid, M., and Metwali, E.M. 2008. Application of physiological and biochemical indices as a screening technique for drought tolerance in wheat genotypes. African Journal of Biotechnology 7: 2341-2352.
8. Beauchamp, C., and Fridovich, I. 1971. Superoxide dismutase: improved assays and applicable to acryl amide gels. Annual Reviw Biochemistry 44: 276-287.
9. Bian, Sh., and Jiang, Y. 2008. Reactive oxygen species, antioxidant enzyme activities and gene expression patterns in leaves and roots of Kentucky bluegrass in response to drought stress and recovery. Scientia Horticulturae 120: 264-270.
10. Cakmak, I. 2005. The role of potassium in alleviating detrimental effects of abiotic stresses in plants. Journal of Plant Nutrition and Soil Science 168: 521-530.
11. Chandlee, J.M., and Scandalios, J.G. 1984. Analysis of variants affecting the catalase development program in Maize scutellum. Journal of Apply Genetic 69: 71-77.
12. Chapman, H.D., and Pratt, P.F. 1982. Method of Analysis for Soil, Plants and Water. Chapman Publisher: Riverside, CA.
13. Ehyaei, H.R., Parsa, M., Kafi, M., and Nasiri Mahalati, M. 2010. Effect of foliar application of methanol and irrigation regimes on yield and yield components of chickpea cultivars. Iranian Journal of Pulses Research 1: 37-48. (In Persian with English Summary).
14. Eraslan, F., Inal, A., Savasturk, O., and Gunes, A. 2007. Changes in antioxidative system and membrane damage of lettuce in response to salinity and boron toxicity. Journal of Crop and Horticultural Science 114: 5-10.
15. Erskine, W., Muehlbauer, F., Sarker, A., and Sharma, B. 2009. The Lentil Botany, Production and Uses. ISBN 978-1-84593-487-3. 577 pp.
16. Gamze, O., Mehmet Demir, K.A., and Mehmet A.T., 2005. Effects of salt and drought stresses on germination and seedling growth of pea (*Pisum sativum* L.), Turkish Journal of Agriculture and Foresty 29: 237-242.
17. Ganjeali, A., and Nezami, A. 2008. Ecophysiology and Determinatives Yield of Pulses. In: M. Parsa and A. Bagheri (Eds.). Pulses. Jahad-e Daneshgahi Mashhad Press. Iran. p. 500. (In Persian).
18. Ganjeali, A., Porsa, H., and Bagheri, A. 2011. Assessment of Iranian chickpea (*Cicer arietinum* L.) germplasms for drought tolerance. Agriculture Water Management 98: 1477-1484.
19. Guerfel, M., Baccouri, O., Boujnah, D., Cha, W., and Zarrouk, M. 2008. Impacts of water stress on gas exchange, water elations, chlorophyll content and leaf structure in the two main Tunisian olive (*Olea europaea* L.) cultivars. Scientia Horticulturae 1: 1-7.
20. Gunes, A., Cicek, N., Inal, A., Alpaslan, M., Eraslan, F., Guneri E., and Guzelordu, T. 2006. Genotypic response of chickpea (*Cicer arietinum* L.) cultivars to drought stress implemented at pre-and post anthesis stages and its relations with nutrient uptake and efficiency. Plant Soil Environment 52: 868-876.

21. Helal, R.M., and Samir, M. 2008. Comparative response of drought tolerant and drought sensitive maize genotypes to water stress. Australian Journal Crops Science 1: 31-36.
22. Holy, M.C. 1972. Indole acetic acid oxidase: a dual catalytic enzyme. Journal of Plant Physiology 50: 15-18.
23. Hosseinzadeh, S.R., Salimi, A., Ganjeali, A., and Ahmadpour, R. 2014. Effects of foliar application of methanol on photosynthetic characteristics chlorophyll fluorescence and chlorophyll content of chickpea (*Cicer arietinum* L.) under drought stress. Iranian Journal of Plant Biology 5: 115-132. (In Persian with English Summary).
24. Hosseinzadeh, S.R., Amiri, H., and Ismaili A. 2016. Effect of vermicompost fertilizer on photosynthetic characteristics of chickpea (*Cicer arietinum* L.) under drought stress. Photosynthetica 54(1): 87-92.
25. Hossinzadeh, S.R., Salimi, A., Ganjeali, A., and Ahmadpour, R. 2012. Effects of foliar application of methanol on growth and root characteristics of chickpea (*Cicer arietinum* L.) under drought stress. European Journal of Experimental Biology 2 (5): 1697-1702.
26. Hu, Y.C., and Schmidhalter, U. 2005. Drought and salinity: a comparison of their effects on mineral nutrition of plants. Journal of Plant Nutrition and Soil Science 168: 541-549.
27. Ivanova, E.G., Dornina, N.V., and Trotsenko, Y.A. 2001. Aerobic methylobacteria are capable of synthesizing auxins. Microbiology 70: 392-397.
28. Khamadi, N., Nezami, A., and Bagheri, A. 2008. Effect of autumn planting on phenology and morphology of cold hardy Lentils (*Lens culinaris* Medik.) in Mashhad conditions. Environmental Stresses in Agricultural Sciences 2(1): 39-51. (In Persian with English Summary).
29. Khoshbakht, D., Ghorbani, A., and Baninasab, B. 2014. Effects of supplementary potassium nitrate on growth and gas-exchange characteristics of salt-stressed citrus seedlings. Photosynthetica 52: 589-596.
30. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., and Randapp, R.J. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. Journal of Research Chemistry 191: 265-275.
31. Madhaiyan, M., Poonguzhali, S., Sundaram, S.P., and Sa, T.A. 2006. New insight into foliar applied methanol influencing phylloplane methylotrophic dynamics and growth promotion of cotton (*Gossypium hirsutum* L.) and sugarcane (*Saccharum officinarum* L.). Environmental and Experimental Botany 57: 168-176.
32. Makhdum, I.M., Nawaz, A. Shabab, M., Ahmad, F., and Illahi, F. 2002. Physiological response of cotton to methanol foliar application. Journal of Research Science, Bahauddin Zakariya University, Multan, Pakistan 13: 37-43.
33. Mirakhori, M., Paknejad, F., Moradi, F., Nazeri, P., and Nasri, M. 2010. Effects of foliar application of methanol on *Glycine max* L. Journal of Agroecology 2: 236-244. (In Persian with English Summary).
34. Nadali, I., Paknejad, F., Moradi, F., and Vazan, S. 2010. Effect of methanol on yield and some quality characteristics of sugar beet (*Beta vulgaris* L.) cv. Rasoul in drought and non-drought stress conditions. Journal of Seed and Plant Improvement 26: 95-108. (In Persian with English Summary).
35. Najaphy, A., Niari Khamssi, N., Mostafaie, A., and Mirzaee, H. 2010. Effect of progressive water deficit stress on praline accumulation and protein profiles of leaves in chickpea. African Journal of Biotechnology 9: 7033-7036.
36. Osuagwu, G.G.E., Edeoga, H.O., and Osuagwu, A.N. 2010. The influence of water stress (drought) on the mineral and vitamin potential of the leaves of *Ocimum gratissimum* L. Recent Research in Science and Technology 2: 27-33.
37. Oweis, T., Hachum A. and Pala, M. 2005. Lentil production under supplemental irrigation in a Mediterranean environment. Agriculture Water Management 68: 251-265.
38. Parsa, M., and Bagheri, A. 2008. Pulses. Mashhad University Jahad Press. (In Persian).
39. Porsa, H., Bagheri, A., Nezami, A., Mohammadabadi, A.A., and Langari, M. 2001. Evaluation of fall winter planting of chickpea (*Cicer arietinum* L.) in dryland conditions of North Khorasan. Agricultural Sciences and Technology 16: 143-152. (In Persian with English Summary).
40. Rahbarian, R., Khavari-Nejad, R., Ganjeali, A., Bagheri, A.R., and Najafi, F. 2011. Drought stress effects on photosynthesis, chlorophyll fluorescence and water relations in tolerant and susceptible chickpea (*Cicer arietinum* L.) genotypes. Acta Biologica Cracoviensia 53: 47-56.

41. Rahbarian, R., Khavari-Nejad, R., Ganjeali, A., Bagheri, A., Najafi, F., and Roshanfekr, M. 2012. Use of biochemical indices and antioxidant enzymes as a screening technique for drought tolerance in Chickpea genotypes (*Cicer arietinum* L.). African Journal of Agricultural Research 7: 5372-5380.
42. Ramadant, T., and Omran, Y. 2005. The effects of foliar application of methanol on productivity and fruit quality of grapevine cv. flame seedlees. Vitis Journal 44: 11-16.
43. Ramirez, I., Dorta, F., Espinozo, V., Jimenez, E., Mercad, A., and Pen Acortes, H. 2006. Effects of foliar and root applications of methanol on the growth of arabidopsis, tobacco and tomato plants. Journal of Plant Growth and Regulation 25: 30-44.
44. Safarzade Vishgahi, M., Noormohammadi, Gh., Majidi, A., and Rabii, B. 2008. Effect of methanol on the growth function peanuts. Journal of Agricultural Sciences 1: 102-87.
45. Sairam, R.K., and Saxena, D.C. 2001. Oxidative stress and antioxidants in wheat genotypes: possible mechanism of water stress tolerance. Journal of Agronomy and Crop Science 184: 55-61.
46. Salehi, M., Haghnazari, A., and Shekari, F. 2006. The study of morpho-physiological traits of lentil (*Lens culinaris* Medik.) relation with grain yield under normal and drought stress conditions. The 9th Iranian Crop Sciences Congress. p. 27-28. (In Persian with English Summary).
47. Tester, M., and Davenport, R. 2003. Na^+ tolerance and Na^+ transport in higher plants. Annals of Botany 91: 503-527.
48. Tewfik, K.M. 2008. Effect of water stress in addition to potassiom application on mungbean. Australian Journal Basic Apply Science 2: 42-52.
49. Yordanov, I., Velikova, V., and Tsonev, T. 2003. Plant responses to drought and stress tolerance. Bulgharestan Journal of Plant Physiology 2: 187-206.
50. Zaferanieh, M., Nezami, A, Parsa, M., Porsa, H., and Bagheri, A. 2010. Evaluation of fall sowing of cold tolerant chickpea (*Cicer arietinum* L.) germplasms under supplementary irrigation in Mashhad condition: 1- Phenological and morphological characteristics. Iranian Journal of Field Crops Research 7(2): 473-482. (In Persian with English Summary).
51. Zebic, I., Karczmarczyk, S., and Podsiadlo, C. 2003. Response of some cultivated plants to methanol as compared to supplemental irrigation. Electronic Journal of Polish Agricultural Universities 6(1): 1-7.

Iranian Journal of Pulses Research
Vol. 7, No. 2, 2016, p. 202-214

Evaluation of foliar application of Methanol effects on some morphological, physiological and biochemical indices of Lentil (*Lens culinaris* Medik.) under water deficit stress

Ahmadpour*[1], R., Armand, N., Hosseinzadeh, S.R. & Rejeh, M.

Contributions from Department of Biology, Faculty of Sciences, Behbahan Khatam Alanbia University of Technology, Iran

Received: 1 July 2015
Accepted: 29 August 2015

DOI: 10.22067/ijpr.v7i2.47507

Introduction

Lentil (*Lens culinaris* Medik.) is a good source of protein, carbohydrates as well as minerals, vitamins and unsaturated fatty acids as such it plays an important role in the human diet and cultivated worldwide. Water shortage is one of the most important abiotic factors that can limit morphological, physiological, yield, and plant distribution. Legumes such as lentil are highly sensitive to water stress. According to references, increasing the concentration of CO_2 can neutralize the effects of water stress on plants. One of the ways for increasing the concentration of CO_2 in plants is using compounds such as methanol, ethanol, propanol, butanol, and the glycine amino acids, glutamate and aspartate. Methanol is oxidized to formaldehyde and CO_2, and further synthesized into sugars and amino acids, including serine and methionine, in tissues of various C3 plants. In plants, methanol can arise from a number of sources; for example, from pectin de-methylation in cell walls, protein repair pathways and lignin degradation. Metabolism of methanol is less understood in plants. The identity of enzymes that oxidize methanol to formate in plants is unclear yet. However, positive growth effects of methanol have been reported earlier in a variety of C3 plants like wheat, barley, mung bean, chickpea, bean, tomato and cotton. Research has shown that plants respond to water deficit stress by accumulations of soluble materials in cells. Most compatible compounds contain soluble proteins, sorbitol, organic acids, proline content and ions such as K and Ca. K deficiency in plants leads to reduced Rubisco activity, stomatal conductance and an increase of reactive oxygen species (ROS), which ultimately reduces photosynthesis. As water stress is one of the major problems for production in the agricultural in Iran. The aims of this study were to determine: (1) whether foliar application of methanol can be improve the negative effects of water deficit stress in lentil and (2) determine the most effective methanol concentration for foliar application.

Materials and Methods

To evaluate the effects of foliar application of methanol and water deficit stress on morpho-physiological and biochemical characteristics of lentil, a factorial experiment based on completely randomized design with three replications was performed. The treatments included methanol solution at four levels (0, 10, 20 and 30% v/v) and water stress included severe water stress (25% of field capacity), moderate water stress (75% of field capacity) and non-stress (100% of field capacity). Lentil seeds (Ghachsaran cultivar) were sown in a standard petri dish in a germinator chamber. When the seedlings reached a height of 5 cm, they were transplanted at a rate of three seedlings per pot and the pots were placed in a growth chamber. The foliar application of methanol was applied at three

* **Corresponding Author:** ahmadpour@bkayu.ac.ir; Mobile: 09335912271

times during growth season of lentil, with 10 days intervals. The first foliar application of methanol was performed in early seedling stage (4 weeks after planting). Second and third methanol applications were given ten days after first application in flowering and podding stages, respectively. Measurements were taken for the morpho-physiological traits were: plant height, number of leaves, number of pods, leaf area, shoot and leaf dry weights, relative water content (RWC), membrane stability index (MSI) and nutrient concentration of leave (Na,K and Ca). Biochemical traits such as proline content, soluble proteins and antioxidant enzyme activity were measured.

Results and Discussion

All of the morphological traits were mainly affected by severe water stress. Under non-stress and moderate water stress, methanol treatments had significantly increasing of the morphological traits. Methanol treatments induced a significant increase in MSI and RWC comparing with control under all of water stress treatments. Methanol treatments increased proline content and total soluble protein under severe and moderate water stress comparing with control treatments. Foliar application of methanol had no significant effects on concentration of elements (Na, K and Ca) in leaf and also in antioxidant enzyme activity. Plants are easily able to absorb methanol sprayed on leaves then used by the plant as a source of carbon. In comparison with CO_2, methanol is formed of relatively smaller molecules and it is more easily absorbed and used by plants. Therefore, as a carbon source, methanol can play a role in developing CO_2 assimilation and net-photosynthesis. An investigation on flax, reported that spraying a solution of methanol might have stimulated growth and increased height in the treated plants by increasing cytokinin levels and cell division. Coexisting bacteria like methylotrophic live on the leaves of most crops; these bacteria, for receiving methanol that gets out of the plant's leaf, give the construction precursor of some hormones like auxin, cytokinin to the plant in order to accelerate the growth and physiological process. Reports have mentioned that application of methanol on aerial parts of cultivated plants led to a significant increase in the morpho-physiological traits, acceleration of ripeness, reduced effect of water deficit stress and reduced water requirement.

Conclusion

Results of this research indicated that application of methanol has significantly increasing in the lentil morpho-physiological traits, proline content and leaf soluble protein under moderate and severe stress. Concentrations of leaf elements such as K, Ca and Na and antioxidant enzymes activity were not affected by methanol foliar application. Methanol application at 25% (volumetric percentage) were effective than the other treatments. According to the results, using of methanol is recomended to reduce the negative effects of water deficit stress in lentil plant.

Key words: Antioxidant activity, Drought stress, Legumes, Morpho-physiological traits