

Physiological and biochemical responses of *Hibiscus sabdariffa* to drought stress in the presence of salicylic acid

Marzieh Mirshekari, Alireza Einali*, Jafar Valizadeh

Department of Biology, faculty of science, University of Sistan and Baluchestan, Zahedan, Iran

Abstract

Salicylic acid (SA) is one of the important signal molecules, which modulates plant responses to environmental stress. In the present work, impact of exogenous SA on some physiological and biochemical traits of *Hibiscus sabdariffa* in response to drought stress was studied. *Hibiscus sabdariffa* seedlings were exposed to six drought levels (0, -0.05, -0.1, -0.5, -0.75, and 1 MPa) with two SA concentrations (0 and 500 μ M) in 5 days intervals up to 20 days in a factorial design. During drought stress period, the root and shoot growth, relative water content, pigments content, non-reducing sugar and starch content was significantly decreased. SA treatment cause prevention of the growth reduction and improvement of relative water content. Protein concentration was roughly unchanged during drought stress with SA, while, reducing sugars accumulates and non-reducing sugars and starch significantly decreases. The results show that exogenous SA application on leaves during drought stress can ameliorate detrimental effects of stress through reducing water loss and accumulating reducing sugars, which cause preserving turgor pressure of the cells.

Key words: osmotic modulation, drought stress, *Hibiscus sabdariffa*, salicylic acid, starch

* ainali@science.usb.ac.ir

پاسخ‌های فیزیولوژیک و بیوشیمیایی گیاه چای ترش (*Hibiscus sabdariffa*) به تنش خشکی در حضور هورمون سالیسیلیک اسید

مرضیه میرشکاری، علیرضا عینعلی*، جعفر ولیزاده

گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه سیستان و بلوچستان، زاهدان، ایران

چکیده

سالیسیلیک اسید یکی از مولکول‌های سیگنال مهم تعدیل‌کننده پاسخ‌های گیاهان در برابر تنش‌های محیطی است. در پژوهش حاضر، تاثیر به کار بردن سالیسیلیک اسید به صورت محلول پاشی روی برگ‌های گیاهچه‌های چای ترش (*Hibiscus sabdariffa* L.) در میزان رشد، محتوای نسبی آب برگ‌ها، میزان رنگیزه‌های فتوسنتزی، میزان پروتئین‌ها و تجمع قندهای محلول و نشاسته در پاسخ به تنش خشکی بررسی شده است. گیاهچه‌های *H. sabdariffa* در قالب طرح فاکتوریل، در فواصل زمانی ۵ روزه و به مدت ۲۰ روز در معرض پتانسیل‌های اسمزی صفر، ۰/۰۵، ۰/۱، ۰/۵، ۰/۷۵ و ۱- مگاپاسکال با غلظت‌های صفر و ۵۰۰ میکرومولار سالیسیلیک اسید قرار گرفتند. میزان رشد ریشه‌ها و بخش‌های هوایی، محتوای نسبی آب و میزان رنگیزه‌های فتوسنتزی شامل کلروفیل‌ها و کاروتنوئید و همچنین غلظت نشاسته و قندهای غیراحیایی در تنش خشکی به شدت کاهش پیدا کردند. تیمار با سالیسیلیک اسید ممانعت از کاهش رشد و بهبود محتوای نسبی آب برگ را در مقایسه با گیاهان شاهد سبب می‌شود. تنش خشکی در حضور سالیسیلیک اسید، غلظت پروتئین را زیاد تغییر نمی‌دهد؛ در حالی که کاهش شدید میزان قندهای غیراحیایی و نشاسته را در برگ‌ها و تجمع قندهای احیایی را سبب می‌شود. این نتایج نشان می‌دهد که به کار بردن سالیسیلیک اسید روی برگ‌ها در تنش خشکی می‌تواند آثار زیانبار این تنش را با کاهش اتلاف آب و افزایش قندهای محلول احیایی و در نتیجه، حفظ فشار تورژسانس سلول‌ها برطرف کند.

واژه‌های کلیدی: تعدیل اسمزی، تنش خشکی، چای ترش، سالیسیلیک اسید، نشاسته.

مقدمه

عبارت است از عاملی خارجی که به‌طور نامطلوبی بر

زندگی گیاهان اثر می‌گذارد و می‌تواند بروز پاسخ‌هایی

ویژه را در همهٔ مراتب فیزیولوژیک موجود زنده

گیاهان در شرایط طبیعی و زراعی، پیوسته در

معرض تنش‌های مختلف محیطی قرار دارند. تنش

* نگارنده مسؤول: نشانی پست الکترونیک: ainali@science.usb.ac.ir، شماره تماس: ۰۵۴۳۱۱۳۶۳۳۸

در سلول‌های برگ و در نتیجه، جذب آب از خاک‌های خشک را باعث می‌شود و بدین ترتیب، با حفظ فشار تورژسانس سلول، تبادلات گازی و رشد را در محیط‌های خشک ممکن می‌کند (White *et al.*, 2000). ترکیبات فنلی نیز نقش مهمی در جاروب کردن رادیکال‌های آزاد اکسیژن ایفا و گیاهان را در برابر آثار مخرب این رادیکال‌ها حفظ می‌کنند (Petridis *et al.*, 2012).

سالیسیلیک اسید ترکیب فنلی گیاهی است که شبه‌هورمون در نظر گرفته می‌شود و نقش مهمی در سازکارهای دفاعی در برابر تنش‌های مختلف زیستی و غیرزیستی ایفا می‌کند (Yalpani *et al.*, 1994; Szalai *et al.*, 2000). به کاربردن سالیسیلیک اسید به صورت خارجی، می‌تواند بر بسیاری از فرایندهای فیزیولوژیک و تکوینی از جمله روابط آبی گیاه (Ying *et al.*, 2013)، فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان (Janda *et al.*, 1999; Hayat *et al.*, 2008, Hayat *et al.*, 2010)، رنگیزه‌های فتوسنتزی (Rajasekaran and Blum, 1999) و رشد گیاهان (Sakhabutdinova *et al.*, 2003; Bandurska and cieslak, 2012) اثر بگذارد. این ترکیب می‌تواند آنزیم‌هایی ویژه را در مسیر متابولیک پرولین القا کند و میزان پرولین را در شرایط تنش افزایش دهد (Misra and Saxena, 2009). علاوه بر این، گیاهانی که با سالیسیلیک اسید تیمار می‌شوند، عموماً مقاومت بهتری نسبت به تنش خشکی نشان می‌دهند (Al-Hakimi and Hamada, 2001). اثبات شده است که این مولکول، ماده‌ای ضدتعرق است و با مانعت از باز شدن روزنه‌ها، مقاومت را نسبت به خشکی سبب می‌شود (Larque- Saavedra, 1978).

موجب شود. یکی از مهم‌ترین تنش‌های محیطی، تنش خشکی است که به تنش آبی نیز معروف است. تنش خشکی یکی از مهم‌ترین تهدیدهای محیطی است که به شدت بر تولید و عملکرد گیاهان اثر می‌گذارد (Anjum *et al.*, 2011b). تنش خشکی توقف رشد ریشه و بخش هوایی و همچنین کاهش سطح برگ‌ها و در کل کاهش رشد و نمو گیاه را سبب می‌شود (Anjum *et al.*, 2011a; Zheng *et al.*, 2016). علاوه بر این، تنش خشکی می‌تواند به تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن (ROS) در سلول‌های گیاهی و بروز تنش اکسیداتیو منجر شود (Asada, 2006). سازگاری به تنش‌های محیطی از جمله خشکی تغییراتی را در همه سطوح فیزیولوژیک موجود زنده از سطح آناتومیک و مورفولوژیک تا سطح سلولی، متابولیک و مولکولی موجب می‌شود. تعدیل اسمزی با سنتز و تجمع مواد حل شونده سازگار مانند پرولین و قندهای محلول سازگاری فیزیولوژیک و متابولیک مهمی برای گیاهان برای مقاومت در برابر خشکی در نظر گرفته می‌شود (Morgan, 1984). تجمع اسمولیت‌ها نه تنها می‌تواند به تنظیم اسمزی منجر شود بلکه از ساختار مولکول‌های زیستی و غشاها محافظت می‌کنند (Yancey *et al.*, 1982; Hare *et al.*, 1998). همچنین اسمولیت‌ها جاروب‌کننده‌های رادیکال‌های آزاد هستند و مولکول‌های DNA را از آسیب‌های آن‌ها حفظ می‌کنند (Ashraf and Foolad, 2007). تجمع این ترکیبات همگام با کاهش محتوای آب خاک و افزایش سطوح خشکی، افزایش می‌یابد (Nakayama *et al.*, 2007; Xiang *et al.*, 2007; Ohashi *et al.*, 2009). افزایش و تجمع قندهای محلول، حفظ فشار اسمزی را

از کاشت با محلول غذایی هوگلند به‌طور مرتب آبیاری شدند. اعمال تیمارهای خشکی و سالیسیلیک اسید بر گیاهان در قالب طرح بلوک‌های کاملاً تصادفی به‌صورت فاکتوریل با شش تکرار برای هر تیمار انجام شد. سه روز پیش از اعمال تیمار خشکی، غلظت‌های صفر و ۵۰۰ میکرومولار محلول سالیسیلیک اسید روی برگ‌های گیاهان اسپری شدند. تیمارهای خشکی با کاهش پتانسیل اسمزی محلول‌های غذایی به مقادیر صفر، ۰/۰۵، ۰/۱، ۰/۵، ۰/۷۵ و ۱- مگاپاسکال با پلی اتیلن گلیکول ۶۰۰۰، با تیمارهای سالیسیلیک اسید در فواصل زمانی ۵ روزه و به‌مدت ۲۰ روز بر گیاهان اعمال شد. میزان پلی اتیلن گلیکول ۶۰۰۰ لازم برای کاهش پتانسیل اسمزی محلول‌ها، با رابطه ۱ تعیین شد (Michel and Kaufmann, 1973).

$$\Psi_s = -(1.18 \times 10^{-2}) C - (1.18 \times 10^{-4}) C^2 + (2.67 \times 10^{-4}) CT + (8.39 \times 10^{-7}) C^2T \quad \text{رابطه ۱}$$

در این فرمول، Ψ_s بیان‌کننده پتانسیل اسمزی محلول، C، غلظت پلی اتیلن گلیکول ۶۰۰۰ برحسب گرم در هر کیلوگرم محلول غذایی و T دمای محلول برحسب درجه سانتیگراد است.

گیاهانی که محلول هوگلند معمولی را با پتانسیل اسمزی صفر و غلظت صفر سالیسیلیک اسید دریافت کرده بودند، شاهد در نظر گرفته شدند. پس از این مدت، گیاهان برای بررسی پاسخ‌های فیزیولوژیک و بیوشیمیایی به سطوح مختلف تنش خشکی و تیمار سالیسیلیک اسید، جمع‌آوری و آزمایش شدند. نیمی از نمونه‌های گیاهی برای انجام تحلیل‌های فیزیولوژیک شامل تعیین وزن تر و خشک ریشه‌ها و بخش هوایی و نسبت طول به پهنای برگ استفاده شدند. برگ‌های نیم

تشخیص ارتباط بین تیمار سالیسیلیک اسید و تعدیلات متابولیک، هنگام تنش در گیاهان، ضروری است.

چای ترش (*Hibiscus sabdariffa* L.) گیاهی علفی از خانواده پنیرک (Malvaceae) است. این گیاه علاوه بر مصرف غذایی، به‌دلیل داشتن فیبر و ویژگی‌های دارویی نیز استفاده می‌شود (Da-Costa- Rocha *et al.*, 2014). با وجود مطالعات متعدد درباره تنش خشکی و تاثیر هورمون سالیسیلیک اسید در این گیاه، تاکنون پژوهشی درباره برهم کنش تیمار خشکی با سالیسیلیک اسید در آن، انجام نشده است. تشکیل و تجمع قندهای محلول و انتقال آن‌ها به واکوئل‌های سلول‌های برگ گیاهان در معرض تنش خشکی، در نتیجه برخی برهم کنش‌های متابولیکی انجام می‌شود (Campos *et al.*, 1999). بنابراین، هدف از پژوهش حاضر، تشخیص ارتباط تیمار سالیسیلیک اسید با رشد گیاه چای ترش و تجمع قندهای محلول و نشاسته در آن، بر اثر تنش خشکی است.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی و تیمار خشکی: بذر گیاه *H. sabdariffa* از مرکز تحقیقات کشاورزی استان سیستان و بلوچستان تهیه و در سینی‌های حاوی کوکوپیت به صورت خزانه، در گلخانه کشت شد. پس از سه هفته از کاشت، گیاهچه‌های دارای دو یا سه برگ، همسان‌سازی و به گلدان‌های پلاستیکی یک‌لیتری دارای مقادیر برابر کوکوپیت (یک کیلوگرم) منتقل شدند؛ سپس در دمای 29 ± 1 درجه سانتیگراد و شدت نور ۳۰۰-۲۵۰ میکرومول فوتون بر متر مربع بر ثانیه قرار گرفتند. گیاهچه‌ها تا روز ۳۰ پس

میزان کاروتنوئید کل نیز با روش Lichtenthaler و Buschmann (۲۰۰۱) در طول موج ۴۷۰ نانومتر و با رابطه ۶ اندازه‌گیری شد.

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

رابطه ۶:

استخراج و اندازه‌گیری پروتئین‌های کل: استخراج

پروتئین کل با روش Stone و Gifford (۱۹۹۷)، با تغییراتی انجام شد. در این روش، ۱۰ میلی‌گرم از بقایای بافتی عاری از رنگیزه‌های فتوسنتزی با ۰/۵ میلی‌لیتر بافر نمونه (Laemml, 1970) در میکروتیوب مخلوط شدند. ترکیب بافر نمونه عبارتست از: باز تریس ۰/۰۶ مولار با pH=۶/۸، ۲ درصد سدیم دودسیل سولفات (SDS) و ۱۰ درصد گلیسرول. نمونه‌ها به مدت یک ساعت در بن‌ماری ۹۰ درجه سانتیگراد قرار داده شدند و هر ۱۰ دقیقه به شدت مخلوط شدند؛ سپس نمونه‌ها به مدت ۱۵ دقیقه در ۱۰۰۰۰ g سانتریفیوژ شدند. پس از سانتریفیوژ، فاز بالایی که حاوی همه پروتئین‌های استخراج شده بود برای اندازه‌گیری پروتئین کل به کار رفت. اندازه‌گیری پروتئین کل با روش Markwell و همکاران (۱۹۸۱) با نمونه استاندارد آلبومین انجام شد.

استخراج و اندازه‌گیری قندهای محلول: استخراج

قندهای محلول کل با روش Omokolo و همکاران (۱۹۹۶) انجام شد. بدین منظور، به ۴۰ میلی‌گرم از بقایای بافتی عاری از رنگیزه‌های فتوسنتزی، مقدار ۵ میلی‌لیتر اتانول ۸۰ درصد اضافه شده و به مدت ۱۰ دقیقه در حمام آب گرم با دمای ۷۰ درجه سانتیگراد قرار گرفت. فاز رویی جدا شد و عمل استخراج با اتانول ۸۰ درصد چهار مرتبه دیگر تکرار شد. رسوب باقیمانده، پس از خشک شدن برای اندازه‌گیری نشاسته استفاده شد. عصاره‌های حاصل، با تبخیر اتانول تغلیظ

دیگر نمونه‌ها برای انجام تحلیل‌های بیوشیمیایی استفاده شدند.

تعیین محتوای نسبی آب برگ‌ها: محتوای نسبی

آب برگ (RWC) با روش Whetherley (۱۹۵۰) تعیین شد. مقدار ۰/۵ گرم از بافت برگ‌های جوان از هر تیمار برداشته و وزن تر (FW) آن‌ها اندازه‌گیری شد؛ سپس این نمونه‌ها به مدت ۴ ساعت در آب مقطر قرار داده شد و وزن بافت تورژسانس یافته (Tw) تعیین شد. این نمونه‌ها برای از دست دادن کامل آب در آن با دمای ۷۰ درجه سانتیگراد قرار داده شدند و وزن خشک (DW) آن‌ها نیز اندازه‌گیری شد. در نهایت، محتوای نسبی آب برگ‌ها با رابطه ۲ بر حسب درصد محاسبه شد.

$$\text{RWC (\%)} = (\text{FW} - \text{DW}) / (\text{TW} - \text{DW}) \times 100$$

رابطه ۲:

استخراج و اندازه‌گیری رنگیزه‌های فتوسنتزی:

برای استخراج کلروفیل‌ها و کاروتنوئید کل، مقدار ۱ گرم از بافت برگ در یک هاون سرد با ۱۵ میلی‌لیتر استون ۸۰ درصد ساییده و سپس از کاغذ صافی عبور داده شد. محلول صاف شده برای اندازه‌گیری میزان رنگیزه‌ها به کار رفت. بقایای حاصل از استخراج رنگیزه‌ها، پس از خشک شدن برای اندازه‌گیری کربوهیدرات‌ها و پروتئین استفاده شد. میزان کلروفیل‌ها با روش اسپکتروفتومتری و با رابطه‌های ۳ تا ۵ (Arnon, 1949) اندازه‌گیری شد.

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

رابطه ۳:

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

رابطه ۴:

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

رابطه ۵:

عصاره الکلی تغلیظ‌شده با ۰/۱ میلی لیتر محلول پتاسیم هیدروکسید ۳۰ درصد مخلوط و به مدت ۱۰ دقیقه در حمام آب گرم در دمای ۱۰۰ درجه سانتیگراد قرار داده شد. پس از سرد شدن لوله‌ها، ۳ میلی لیتر معرف آنترون به آن افزوده شد و به مدت ۲۰ دقیقه در حمام آب گرم با دمای ۴۰ درجه سانتیگراد قرار گرفت؛ سپس جذب هر یک از نمونه‌ها در طول موج ۶۲۰ نانومتر خوانده شد. مقدار قندهای غیراحیایی با منحنی استاندارد سوکروز اندازه‌گیری شد.

استخراج و اندازه‌گیری میزان نشاسته: استخراج و اندازه‌گیری نشاسته با روش McCready و همکاران (۱۹۵۰) انجام شد. برای استخراج نشاسته، به بقایای بافتی حاصل از استخراج قندهای محلول، ۰/۲ میلی لیتر آب مقطر اضافه شد و در یخ قرار گرفت و سپس به آن ۰/۲۶ میلی لیتر پر کلریک اسید ۵۲ درصد اضافه و ۱۵ دقیقه در یخ نگهداری شد. مخلوط حاصل پس از افزودن ۰/۴ میلی لیتر آب مقطر به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۱۰۰۰۰g سانتیفیوژ شد. فاز بالایی به لوله آزمایش منتقل و در یخ نگهداری شد. رسوبات باقی مانده نیز با ۰/۱ میلی لیتر آب مقطر و ۰/۱۳ میلی لیتر پر کلریک اسید ۵۲ درصد مجدداً استخراج و پس از سانتیفیوژ، فاز بالایی آن به لوله اول منتقل شد و در نهایت حجم فاز محلول درون لوله آزمایش با آب مقطر به ۲ میلی لیتر رسید و از آن برای اندازه‌گیری نشاسته استفاده شد.

برای اندازه‌گیری نشاسته، ۰/۲ میلی لیتر از عصاره حاوی نشاسته، با ۳ میلی لیتر از معرف آنترون مخلوط شد و به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۱۰۰ درجه سانتیگراد قرار گرفت. پس از سرد شدن لوله‌ها، جذب نمونه‌ها در طول موج ۶۲۰ نانومتر خوانده شد. مقادیر، با نمودار

شد و به حجم مشخصی کاهش یافت. این عصاره‌ها پس از سانتیفیوژ در ۵۰۰۰g به مدت ۱۰ دقیقه برای اندازه‌گیری انواع قندهای محلول شامل قندهای احیایی، غیراحیایی و کل استفاده شدند.

قندهای محلول کل با روش آنترون ارزیابی شدند (McCready et al., 1950). برای اندازه‌گیری قند کل، ۰/۲ میلی لیتر از عصاره تغلیظ‌شده، با ۳ میلی لیتر معرف آنترون (۱۵۰ میلی گرم آنترون در ۱۰۰ میلی لیتر سولفوریک اسید ۱۳ مولار) مخلوط شد و به مدت ۲۰ دقیقه در حمام آب گرم با دمای ۱۰۰ درجه سانتیگراد قرار گرفت. پس از سرد شدن نمونه‌ها، میزان جذب هر یک از آن‌ها در طول موج ۶۲۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. میزان قندهای محلول کل با منحنی استاندارد گلوکز محاسبه شد.

قندهای احیایی با روش Miller (۱۹۵۹) اندازه‌گیری شدند. برای اندازه‌گیری قندهای احیایی، مقدار ۱/۵ میلی لیتر از عصاره تغلیظ‌شده حاوی قندهای محلول، با ۱/۵ میلی لیتر از معرف دی نیترو سالیسیلیک اسید (یک گرم دی نیترو سالیسیلیک اسید، ۰/۲ گرم فنل، ۰/۰۵ گرم سدیم سولفیت و ۱ گرم سدیم هیدروکساید در ۱۰۰ میلی لیتر آب مقطر) مخلوط شد و به مدت ۲۰ دقیقه در حمام آب گرم در دمای ۹۰ درجه سانتیگراد قرار گرفت؛ سپس بلافاصله ۰/۵ میلی لیتر از محلول پتاسیم سدیم تارتارات ۴۰ درصد به آن افزوده و پس از سرد شدن لوله‌ها، جذب نمونه‌ها در طول موج ۵۷۵ نانومتر خوانده شد. مقدار قندهای احیایی با منحنی استاندارد گلوکز اندازه‌گیری شد.

قندهای غیراحیایی با روش Handel (۱۹۶۸) اندازه‌گیری شدند. بدین منظور، مقدار ۰/۱ میلی لیتر از

تنش خشکی در رشد گیاهان و نقش این هورمون در کاهش آثار این تنش در گیاهان است. تیمار سالیسیلیک اسید افزایش چشمگیر را در وزن خشک ریشه هویج هنگام سمیت بور موجب شده است (Eraslan *et al.*, 2007). همچنین بهبود عملکرد گندم نیز در نتیجه تیمار سالیسیلیک اسید در تنش شوری گزارش شده است (Shakirova *et al.*, 2003). به کار بردن سالیسیلیک اسید روی برگ‌های گندم و ذرت، پیچ خوردگی و لوله‌شدن برگ‌ها را هنگام تنش خشکی به تعویق انداخته است (Kadioglu *et al.*, 2011; Saruhan *et al.*, 2012). علاوه بر این، میزان لوله‌شدن برگ در گیاهان ذرت تیمار شده با سالیسیلیک اسید، در مقایسه با شاهد کمتر بوده است (Saruhan *et al.*, 2012). تاثیر مثبت سالیسیلیک اسید در رشد بخش‌های هوایی و ریشه گیاه سویا و سطح برگ گیاه نیشکر نیز پیش‌تر گزارش شده است (Dhaliwal *et al.*, 1997; Gutierrez *et al.*, 1998; Zhou *et al.*, 1999). با افزایش سطح خشکی، کاهش معنی‌داری در محتوای نسبی آب برگ‌ها در هر دو گیاه تیمار شده با سالیسیلیک اسید و شاهد مشاهده می‌شود (شکل ۱). میزان نسبی آب برگ‌ها در گیاهان تیمار شده با سالیسیلیک اسید در مقایسه با گیاهان شاهد در پتانسیل‌های اسمزی منفی تر از -0.5 - مگاپاسکال از نظر آماری بسیار بیشتر است. در حقیقت کاهش کمتری در محتوای نسبی آب برگ‌ها بر اثر پتانسیل‌های اسمزی مختلف مشاهده می‌شود. مشخص شده است که سالیسیلیک اسید انجام یک‌سری پاسخ‌های متابولیک را در گیاهان سبب می‌شود. همچنین بر روابط آبی گیاهان اثر می‌گذارد (Hayat *et al.*, 2010). مطالعات ما نشان داد که به کار بردن سالیسیلیک اسید روی برگ‌های گیاه چای ترش، بر اثر پتانسیل‌های مختلف اسمزی، بهبود

استاندارد گلوکز محاسبه و برای تعیین میزان نشاسته در 0.9 ضرب شد.

تحلیل آماری: همه نتایج به صورت میانگین سه تکرار \pm انحراف معیار (Standard deviation, SD) بیان شدند. وجود تفاوت آماری معنی‌دار بین نمونه‌های شاهد و تیمار شده با سطوح مختلف خشکی و سالیسیلیک اسید در قالب طرح فاکتوریل با تحلیل واریانس (ANOVA) و آزمون دانکن در سطح $0.05/P$ تعیین شد.

نتایج و بحث

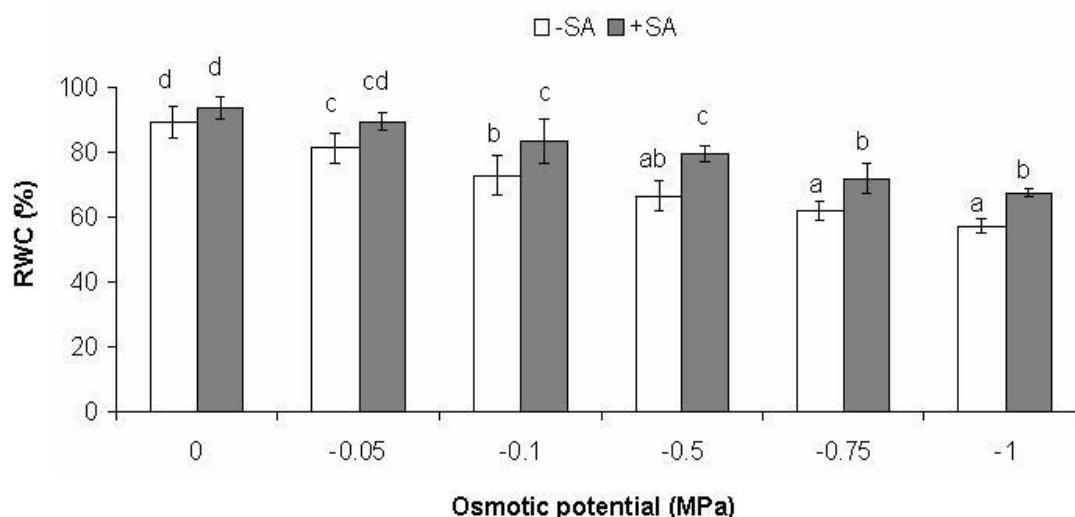
اثر پتانسیل اسمزی و سالیسیلیک اسید بر رشد گیاه و محتوای نسبی آب برگ: به کار بردن سطوح مختلف تنش خشکی با کاهش پتانسیل اسمزی بر گیاه چای ترش، کاهش رشد این گیاه را سبب می‌شود؛ به طوری که همگام با افزایش سطح خشکی (کاهش پتانسیل اسمزی)، وزن تر و خشک بخش‌های هوایی و ریشه و همچنین نسبت طول به پهنای برگ، در مقایسه با گیاهان شاهد به شدت کاهش می‌یابد (جدول ۱). تیمار سالیسیلیک اسید افزایش معنی‌دار در رشد گیاهان را باعث می‌شود. با وجود کاهش رشد همگام با افزایش سطح خشکی در هر دو گیاه تیمار شده یا نشده با سالیسیلیک اسید، کاهش رشد در گیاهان تیمار نشده در مقایسه با گیاهان تیمار شده بسیار شدیدتر است (جدول ۱). وزن تر و خشک ریشه‌ها و بخش‌های هوایی و همچنین نسبت طول به پهنای برگ، متغیرهای مفیدی در تعیین میزان رشد گیاهان به شمار می‌روند. کاهش وزن تر و خشک گیاهان در سطوح مختلف خشکی و افزایش رشد در حضور سالیسیلیک اسید بیان‌کننده تاثیر منفی

همچنین همبستگی قوی بین محتوای آب گیاه و تجمع اسمولیت‌ها در تنش خشکی مشاهده شده است (Farooq *et al.*, 2009). بنابراین، بهبود محتوای نسبی آب برگ با تیمار سالیسیلیک اسید ممکن است در نتیجه تعدیلات اسمزی ناشی از تجمع اسمولیت‌های سازگار در گیاه باشد.

حفظ آب را در برگ‌ها موجب می‌شود. محتوای نسبی آب متغیری مفید برای ارزیابی میزان آب گیاه در نظر گرفته می‌شود (Gonzales and Gonzales-Vilar 2001). تیمار سالیسیلیک اسید افزایش پتانسیل آب و محتوای نسبی آب را در برگ‌های گیاه گوجه‌فرنگی در معرض تنش شوری سبب می‌شود (Tari *et al.*, 2002).

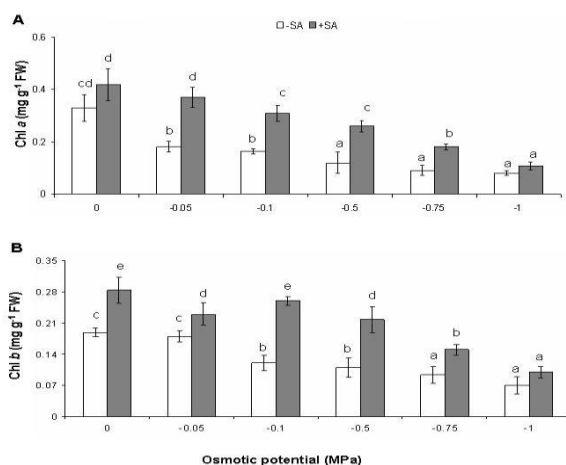
جدول ۱- ویژگی‌های رشد گیاهچه‌های چای ترش در پاسخ به پتانسیل‌های اسمزی مختلف در حالت وجودداشتن یا وجودنداشتن هورمون سالیسیلیک اسید- مقادیر، میانگین سه تکرار \pm انحراف معیار است. حروف غیر مشترک در هر ستون، بیان‌کننده تفاوت معنی‌دار در سطح $P < 0.05$ با استفاده از آزمون دانکن است.

سطوح خشکی (مگاپاسکال)	وزن تر (گرم)	وزن خشک (گرم)		نسبت طول به پهنای برگ		
		بخش هوایی	ریشه	بخش هوایی	ریشه	
0	-SA	2.26 \pm 0.02 ^c	0.70 \pm 0.06 ^c	0.52 \pm 0.06 ^c	0.11 \pm 0.03 ^b	2.38 \pm 0.15 ^c
	+SA	3.35 \pm 0.12 ^f	0.88 \pm 0.07 ^e	0.82 \pm 0.03 ^e	0.26 \pm 0.05 ^d	2.64 \pm 0.75 ^{de}
-0.05	-SA	1.81 \pm 0.10 ^b	0.61 \pm 0.03 ^c	0.47 \pm 0.02 ^c	0.08 \pm 0.02 ^{ab}	2.03 \pm 0.09 ^b
	+SA	2.98 \pm 0.30 ^e	0.79 \pm 0.06 ^d	0.73 \pm 0.03 ^d	0.31 \pm 0.03 ^e	2.09 \pm 0.05 ^b
-0.1	-SA	1.69 \pm 0.05 ^{ab}	0.53 \pm 0.05 ^b	0.36 \pm 0.06 ^b	0.09 \pm 0.02 ^{ab}	2.13 \pm 0.34 ^b
	+SA	2.72 \pm 0.03 ^d	0.72 \pm 0.07 ^{cd}	0.64 \pm 0.06 ^d	0.23 \pm 0.03 ^d	2.49 \pm 0.17 ^d
-0.5	-SA	1.57 \pm 0.05 ^a	0.47 \pm 0.05 ^b	0.32 \pm 0.04 ^{ab}	0.08 \pm 0.02 ^{ab}	1.78 \pm 0.19 ^a
	+SA	2.53 \pm 0.16 ^d	0.71 \pm 0.03 ^{cd}	0.58 \pm 0.07 ^c	0.15 \pm 0.03 ^c	2.00 \pm 0.38 ^b
-0.75	-SA	1.63 \pm 0.06 ^a	0.36 \pm 0.06 ^a	0.35 \pm 0.04 ^b	0.07 \pm 0.01 ^{ab}	2.26 \pm 0.07 ^c
	+SA	2.34 \pm 0.14 ^c	0.76 \pm 0.05 ^{cd}	0.52 \pm 0.10 ^c	0.12 \pm 0.02 ^b	2.77 \pm 0.66 ^e
-1	-SA	1.49 \pm 0.06 ^a	0.28 \pm 0.07 ^a	0.24 \pm 0.03 ^a	0.05 \pm 0.01 ^a	2.05 \pm 0.24 ^b

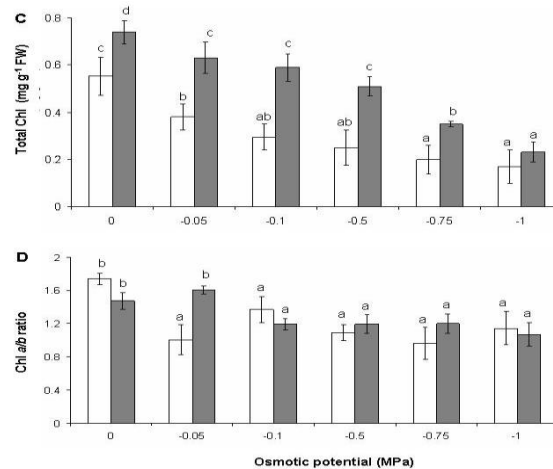


شکل ۱- اثر پتانسیل‌های اسمزی مختلف بر محتوای نسبی آب برگ (RWC) در حالت وجودداشتن یا وجودنداشتن هورمون سالیسیلیک اسید - مقادیر، میانگین سه تکرار \pm انحراف معیار است. حروف غیر مشترک بیان‌کننده تفاوت معنی‌دار در سطح $P < 0.05$ با استفاده از آزمون دانکن است.

نسبت به شاهد کاهش می‌یابد که بیان‌کننده کاهش بیشتر کلروفیل a نسبت به کلروفیل b است (شکل ۲-D). این کاهش کمتر در میزان کلروفیل b، بیان‌کننده این حقیقت است که این کلروفیل برای شکل‌گیری صحیح کمپلکس‌های جمع‌آوری‌کننده نور در کلروپلاست‌های گیاهان عالی و جلبک‌های سبز ضروری است (Eggink *et al.*, 2001, Eggink *et al.*, 2004; Biswal *et al.*, 2012). علاوه بر این، کلروفیل b می‌تواند بیان برخی از پروتئین‌های ویژه غشای تیلاکوئید را تنظیم کند و بدین ترتیب، افزایش اندازه کمپلکس‌های آنتنی و در نتیجه، افزایش در میزان انتقال الکترون را سبب شود (Tanaka *et al.*, 2001; Biswal *et al.*, 2012). تیمار گیاهان با سالیسیلیک اسید بجز در پتانسیل اسمزی ۰/۰۵- مگاپاسکال، تاثیر معنی‌داری بر این نسبت ندارد که می‌تواند نشان‌دهنده تاثیر تقریباً برابر این هورمون بر هر دو کلروفیل a و b باشد. کاهش میزان کلروفیل‌ها در تنش خشکی ممکن است علامت تنش اکسیداتیو و نتیجه اکسیداسیون نوری رنگیزه‌های فتوسنتزی باشد (Anjum *et al.*, 2011b).



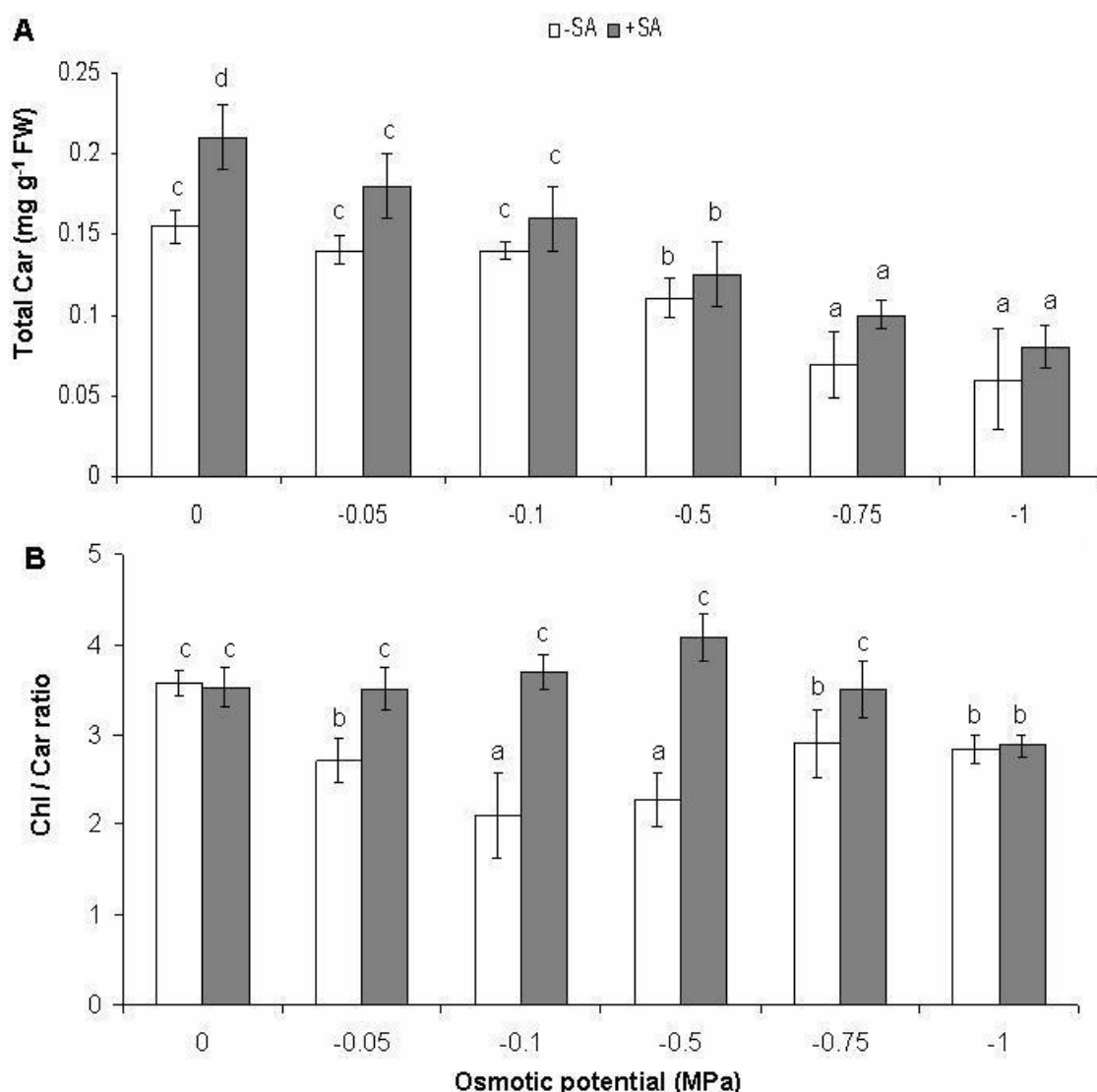
اثر پتانسیل اسمزی و سالیسیلیک اسید بر میزان رنگیزه‌های فتوسنتزی برگ‌ها: میزان کلروفیل a و کلروفیل کل، بلافاصله با اعمال پتانسیل اسمزی، به صورت معنی‌داری کاهش یافت و در پتانسیل‌های کمتر از ۰/۱- و ۰/۰۵- مگاپاسکال به کمترین میزان خود رسید (شکل‌های ۲-A و C). غلظت کلروفیل b در پتانسیل اسمزی کمتر از ۰/۱- مگاپاسکال به طور معنی‌دار نسبت به شاهد کاهش یافت (شکل ۲-B). تیمار سالیسیلیک اسید میزان کلروفیل b و کل را در گیاهانی که در پتانسیل اسمزی صفر رشد کردند به صورت معنی‌دار افزایش داد؛ ولی میزان کلروفیل a از نظر آماری تغییری نکرد. به هر حال تاثیر درخور توجه هورمون سالیسیلیک اسید بر تجمع کلروفیل‌ها هنگام تنش خشکی، در مقایسه با گیاهان شاهد نشان‌دهنده نقش این هورمون در حفظ فعالیت فتوسنتزی، هنگام بروز این تنش است. با وجود این، در پتانسیل اسمزی ۱- مگاپاسکال، تفاوت معنی‌داری در میزان کلروفیل‌ها بین گیاهان تیمار شده با سالیسیلیک اسید و شاهد مشاهده نمی‌شود. نسبت کلروفیل a/b در همه سطوح خشکی



شکل ۲- اثر پتانسیل‌های اسمزی مختلف بر میزان کلروفیل a (A)، کلروفیل b (B)، کلروفیل کل (C) و نسبت کلروفیل a/b (D) در حالت وجود داشتن یا وجود نداشتن هورمون سالیسیلیک اسید- مقادیر، میانگین سه تکرار \pm انحراف معیار است. حروف غیر مشترک بیان‌کننده تفاوت معنی‌دار در سطح $P < 0.05$ با استفاده از آزمون دانکن است.

کاروتنوئید (شکل ۳-۲) هنگام تنش خشکی بیان‌کننده تخریب بیشتر کلروفیل‌ها در برابر کاروتنوئیدها است. افزایش این نسبت بر اثر تیمار با سالیسیلیک اسید در پتانسیل‌های اسمزی مختلف ممکن است به علت افزایش بیشتر کلروفیل در مقایسه با کاروتنوئیدها باشد (شکل ۲-۲ و ۳-۲).

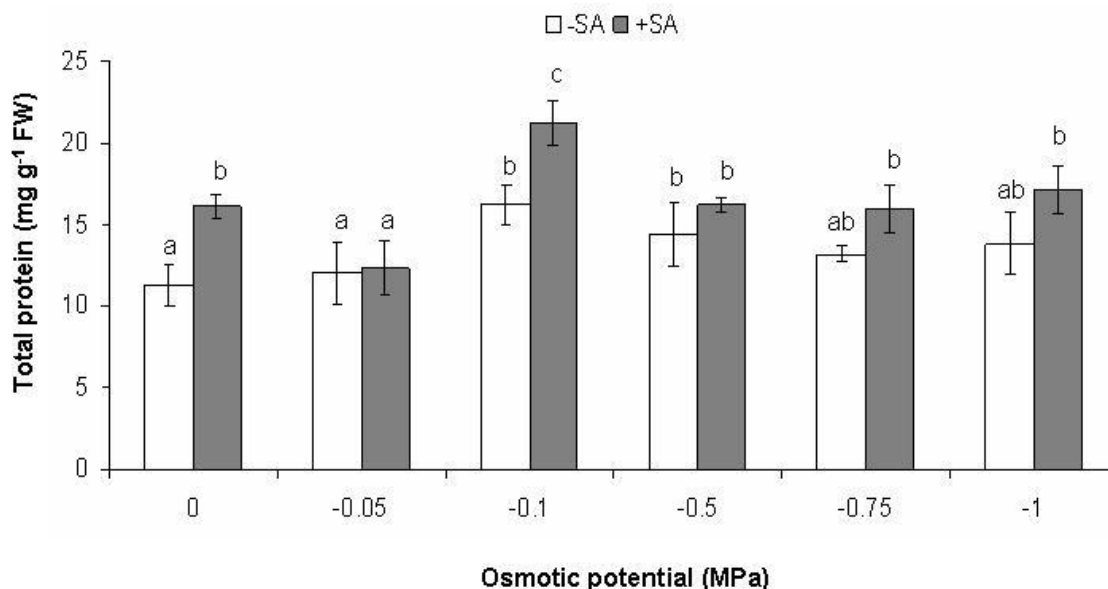
کاهش میزان کاروتنوئیدهای کل در پتانسیل‌های منفی‌تر از -0.5 مگاپاسکال مشاهده می‌شود (شکل ۳-۲). تیمار سالیسیلیک اسید تنها در پتانسیل صفر افزایش کاروتنوئیدها را موجب می‌شود و در سطوح مختلف خشکی، تغییر معنی‌داری از لحاظ آماری بین میزان کاروتنوئیدهای گیاهان تیمار شده و شاهد وجود ندارد. با وجود این، کاهش نسبت کلروفیل به



شکل ۳-۲ اثر پتانسیل‌های اسمزی مختلف بر میزان کاروتنوئید کل (A) و نسبت کلروفیل به کاروتنوئید (B) در حالت وجود داشتن یا وجود نداشتن هورمون سالیسیلیک اسید- مقادیر، میانگین سه تکرار \pm انحراف معیار است. حروف غیر مشترک بیان‌کننده تفاوت معنی‌دار در سطح $P < 0.05$ با استفاده از آزمون دانکن است.

شوری، میزان پروتئین‌های ریشه و بخش‌های هوایی افزایش یافته است (El-Tayeb, 2005). بنابراین، می‌توان نتیجه گرفت که تغییر در غلظت پروتئین‌های گیاه در تنش خشکی به نوع گونه گیاهی و همچنین نوع بافت بستگی دارد. وضعیت نامساعد محیطی می‌تواند بیان پروتئین‌هایی را موسوم به پروتئین‌های تنش القا کند که در محافظت از سلول‌ها در برابر تنش‌های محیطی نقش دارند. بیان این پروتئین‌ها در تنش‌های مختلف محیطی از جمله شوری و خشکی افزایش می‌یابد (Vierling, 1991; Bray, 1993). بنابراین، افزایش غلظت پروتئین‌های برگ گیاه چای ترش در پتانسیل‌های اسمزی منفی تر از -0.1 مگاپاسکال ممکن است به بیان برخی از پروتئین‌ها در تنش خشکی نسبت داده شود.

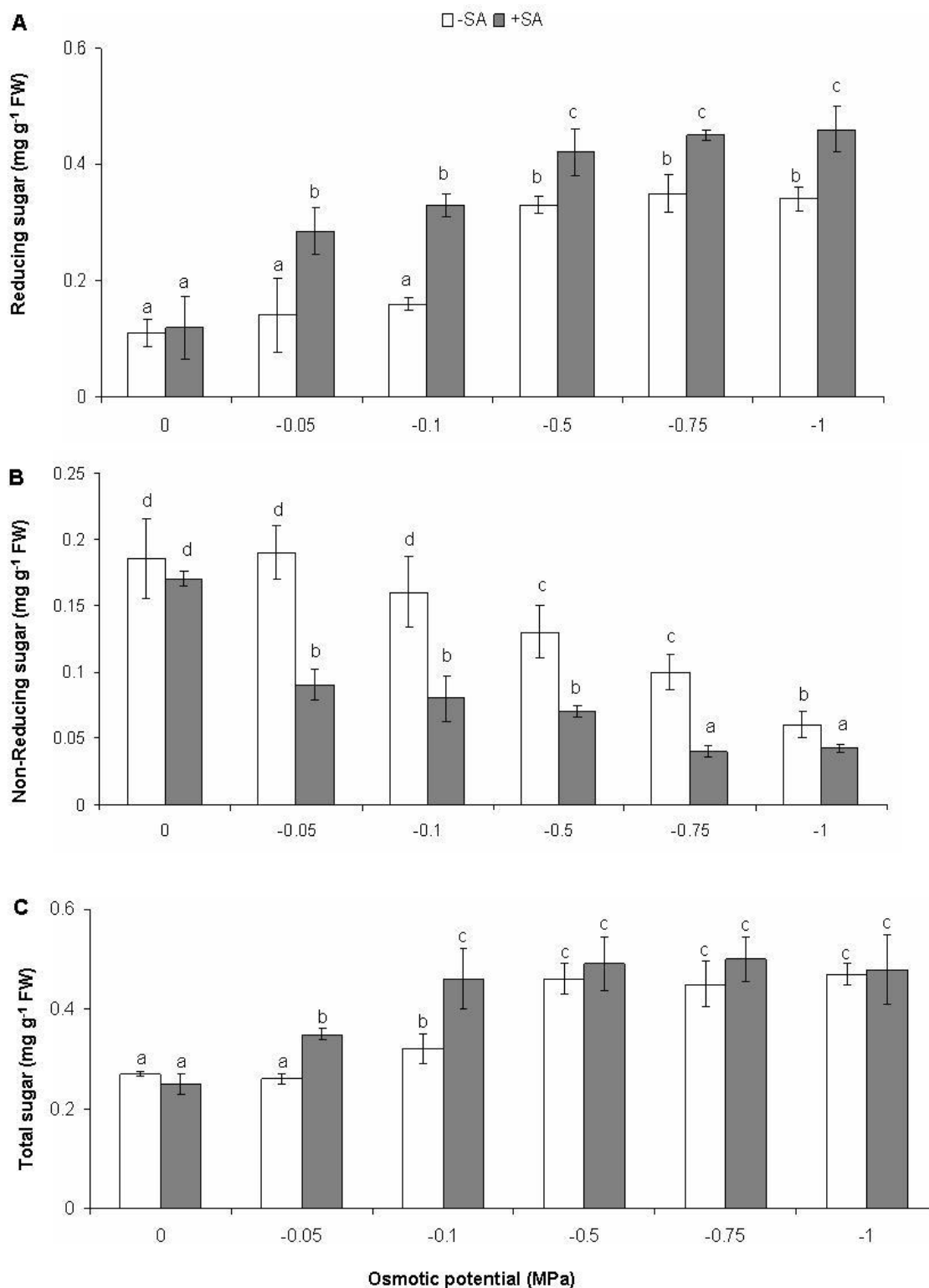
اثر پتانسیل اسمزی و سالیسیلیک اسید بر میزان پروتئین کل: غلظت پروتئین‌های کل در پتانسیل‌های اسمزی منفی تر از -0.1 مگاپاسکال در مقایسه با شاهد به‌طور معنی‌دار افزایش می‌یابد (شکل ۴). تیمار با سالیسیلیک اسید می‌تواند افزایش غلظت پروتئین‌ها را در پتانسیل اسمزی صفر سبب شود. به هر حال، بجز پتانسیل اسمزی -0.1 مگاپاسکال، هیچ تغییر معنی‌داری از نظر آماری در غلظت پروتئین‌های برگ گیاهان تیمار شده با سالیسیلیک اسید در مقایسه با شاهد ایجاد نمی‌شود. گزارش‌های متفاوتی درباره میزان پروتئین‌ها در تنش خشکی ارائه شده است. برای مثال، غلظت پروتئین‌ها در گیاه گندم در تنش خشکی به شدت کاهش یافته است (Singh and Usha, 2003). برعکس، در گونه‌های برنج، افزایش غلظت پروتئین‌ها در تنش خشکی مشاهده شده است (Zulkarnain *et al.*, 2009). همچنین در گیاهچه‌های جو در تنش



شکل ۴- اثر پتانسیل‌های مختلف بر میزان پروتئین کل برگ‌ها در حالت وجود داشتن یا وجود نداشتن هورمون سالیسیلیک اسید - مقادیر، میانگین سه تکرار \pm انحراف معیار است. حروف غیر مشترک بیان‌کننده تفاوت معنی‌دار در سطح $P < 0.05$ با استفاده از آزمون دانکن است.

دارند (Campos *et al.*, 1999). نتیجهٔ تجمع قندهای محلول، در تنش خشکی، کاهش سرعت فتوسنتز است (Goldschmidt and Huber, 1992). در حقیقت، تعدیل اسمزی، سازوکار دفاعی است که با تجمع قندهای محلول در سلول‌ها می‌تواند فشار تورژسانس آن‌ها را حفظ کند (Turner, 1997). در بیشتر گونه‌های گیاهی، کربوهیدرات‌های محلول به ویژه قندهای احیایی، نقش محافظت‌کننده‌های اسمزی را در برابر تنش کم‌آبی ایفا می‌کنند (Li and Li, 2005). مطالعات انجام شده بر برگ‌های گیاه سویا در تنش خشکی نشان داد که غلظت هگزوزها در گیاهان در معرض تنش در مقایسه با شاهد بسیار بیشتر است و میزان سوکروز به شدت کاهش می‌یابد (Liu *et al.*, 2004) که با نتایج ما مطابقت دارد. از سویی، افزایش انواع قندهای احیایی در تنش خشکی در حضور تیمار سالیسیلیک اسید، به حفظ فشار تورژسانس سلول و در نتیجه، سازگاری گیاه به تنش خشکی منجر می‌شود. برخلاف نتایج ما، غلظت قندهای محلول گیاه ذرت در تنش خشکی و در حضور تیمار سالیسیلیک اسید در مقایسه با شاهد کاهش یافت که ممکن است ناشی از متابولیزه شدن قندهای محلول برای تشکیل ساختارهای سلولی جدید، در حضور این هورمون باشد (Khodary, 2004).

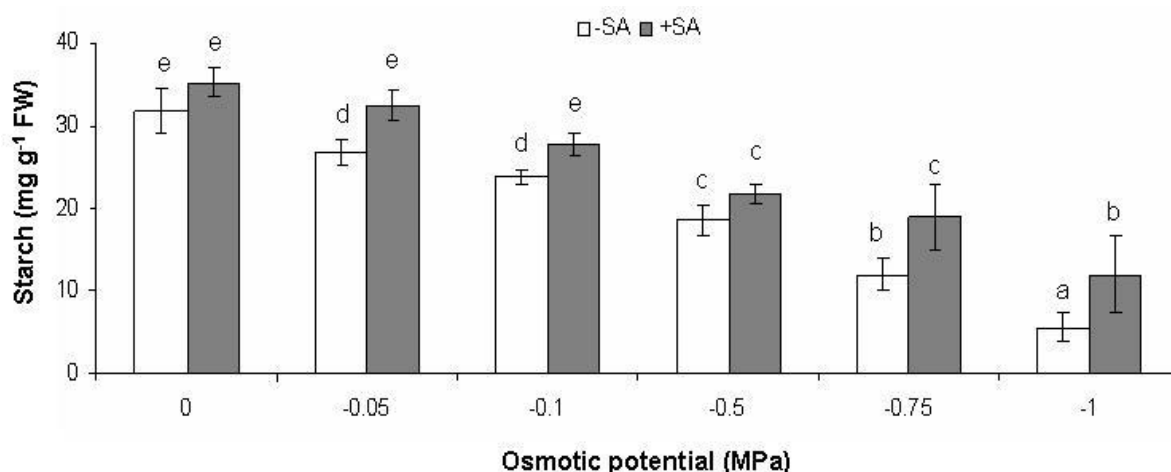
اثر پتانسیل اسمزی و سالیسیلیک اسید بر میزان قندهای محلول و نشاسته: غلظت قندهای محلول شامل قندهای احیایی و کل، همگام با افزایش سطوح تنش خشکی زیاد می‌شود (شکل‌های A-5 و C). برعکس، غلظت قندهای غیراحیایی همگام با افزایش سطوح تنش خشکی کاهش می‌یابد (شکل B-5). افزایش قندهای احیایی و کاهش قندهای غیراحیایی در پتانسیل‌های منفی تر از -0.5 - مگاپاسکال به طور معنی‌دار در مقایسه با شاهد اتفاق می‌افتد (شکل‌های A-5 و B). تیمار سالیسیلیک اسید در پتانسیل اسمزی صفر هیچ تغییری در میزان قندهای محلول ایجاد نمی‌کند. در حالی که، در تنش خشکی در حضور این هورمون، به ترتیب غلظت قندهای احیایی و غیراحیایی به شدت در مقایسه با شاهد افزایش و کاهش می‌یابد. غلظت قندهای غیراحیایی در تنش خشکی در حضور سالیسیلیک اسید، در مقایسه با گیاهان شاهد بسیار کمتر بودند (شکل B-5). به دلیل کاهش غلظت قندهای غیراحیایی و برعکس، افزایش میزان قندهای احیایی در حضور تیمار سالیسیلیک اسید در مقایسه با شاهد، غلظت قندهای محلول کل در پتانسیل‌های اسمزی -0.5 - مگاپاسکال و کمتر تفاوت معنی‌داری با شاهد نداشت (شکل C-5). تجمع قندهای احیایی در گیاهان در معرض تنش خشکی نتیجهٔ یک سری برهم کنش‌های متابولیسمی است که در تشکیل یا انتقال آن‌ها در برگ شرکت



شکل ۵- اثر پتانسیل‌های اسمزی مختلف بر میزان قندهای احیایی (A)، قندهای غیراحیایی (B) و قند کل (C) برگ‌ها در حالت وجودداشتن یا وجودنداشتن هورمون سالیسیلیک اسید - مقادیر، میانگین سه تکرار \pm انحراف معیار است. حروف غیر مشترک بیان‌کننده تفاوت معنی‌دار در سطح $P < 0.05$ با استفاده از آزمون دانکن است.

برگ‌ها و افزایش تجمع قندهای احیایی را باعث شود (Keller and Ludlow, 1993). تغییر در غلظت نشاسته برگ‌ها ممکن است نشان‌دهنده تغییر در نسبت منبع به مخزن باشد. درحقیقت در تنش خشکی به دلیل کاهش نسبت منبع به مخزن، بخش‌بندی کربن بین سوکروز و نشاسته تغییر می‌کند و صادرات سوکروز افزایش می‌یابد و در نتیجه، غلظت نشاسته در برگ‌ها کاهش می‌یابد (Goldschmidt and Huber, 1992; Bruening and Egli, 2000). بنابراین، کاهش پتانسیل اسمزی و تیمار سالیسیلیک اسید احتمالاً با تغییر در نسبت منبع به مخزن از یک سو و با افزایش فعالیت آنزیم‌های تجزیه‌کننده نشاسته و سوکروز از سوی دیگر، کاهش میزان نشاسته و سوکروز را در برگ و افزایش قندهای احیایی را باعث می‌شود. با توجه به بیشتر بودن غلظت قندهای احیایی و برعکس، کمتر بودن غلظت نشاسته و قندهای غیر احیایی در حضور سالیسیلیک اسید، نتیجه می‌گیریم که این هورمون نقش بسیار موثری در مقاومت به تنش خشکی ایفا می‌کند.

برخلاف قندهای احیایی، میزان نشاسته برگ‌ها مانند قندهای غیر احیایی، همگام با کاهش پتانسیل اسمزی در حالت وجود داشتن یا وجود نداشتن سالیسیلیک اسید به شدت کاهش می‌یابد (شکل ۶). این کاهش در غلظت نشاسته و قندهای غیر احیایی، با افزایش میزان قندهای احیایی هنگام تنش کاملاً مرتبط است و ممکن است به دلیل تجزیه نشاسته و قندهای غیر احیایی مانند سوکروز در تنش خشکی و تولید قندهای احیایی باشد. کاهش میزان نشاسته و قندهای غیر احیایی برگ مانند سوکروز در تنش خشکی، در گیاهان دیگری از جمله سویا (Huber *et al.*, 1984) و سایر گونه‌های خانواده Fabaceae (Keller and Ludlow, 1993) نیز گزارش شده است که ممکن است به دلیل کاهش سرعت فتوسنتز یا افزایش سرعت تجزیه سوکروز و نشاسته باشد. همچنین در برگ‌های نوعی لوبیا، افزایش فعالیت آنزیم‌های تجزیه‌کننده نشاسته (مانند آمیلاز) و سوکروز (مانند اینورتاز اسیدی و سوکروز سنتاز) مشاهده شده است که می‌تواند کاهش نشاسته و سوکروز را در



شکل ۶- اثر پتانسیل‌های اسمزی مختلف بر میزان نشاسته برگ‌ها در حالت وجود داشتن یا وجود نداشتن هورمون سالیسیلیک اسید - مقادیر، میانگین سه تکرار \pm انحراف معیار است. حروف غیر مشترک بیان‌کننده تفاوت معنی‌دار در سطح $P < 0.05$ با استفاده از آزمون دانکن است.

جمع‌بندی

احیاکننده با تجزیه قندهای غیراحیایی و نشاسته القا کند. بنابراین، این هورمون می‌تواند نقش بسیار موثری در کاهش آثار تنش خشکی در گیاه چای ترش ایفا کند.

نتایج حاصل از این بررسی نشان می‌دهد که اعمال تنش خشکی با کاهش پتانسیل اسمزی محیط، بر گیاه *H. sabdariffa* می‌تواند کاهش شدید رشد، محتوای نسبی آب برگ و غلظت رنگیزه‌های فتوسنتزی را سبب شود. به کار بردن محلول سالیسیلیک اسید روی برگ‌ها آثار مخرب تنش خشکی را می‌تواند کاهش دهد و تحمل این گیاه را به تنش با افزایش میزان کاروتنوئیدها و کلروفیل و همچنین تجمع قندهای

سپاسگزاری

در اینجا از معاونت پژوهشی دانشگاه سیستان و بلوچستان برای حمایت مالی از پایان‌نامه کارشناسی ارشد خانم مرضیه میرشکاری سپاسگزاری می‌شود.

منابع

- Al-Hakimi, A. M. A. and Hamada, A. M. (2001) Counteraction of salinity stress on wheat plants by grain soaking in ascorbic acid, thiamin or sodium salicylate. *Biologia Plantarum* 44: 253–261.
- Anjum, S. A., Xie, X. Y., Farooq, M., Wang, L. C., Xue, L. L., Shahbaz, M. and Salhab, J. (2011a) Effect of exogenous methyl jasmonate on growth, gas exchange and chlorophyll contents of soybean subjected to drought. *African Journal of Biotechnology* 10: 9640–9646.
- Anjum, S. A., Xie, X. Y., Wang, L. C., Saleem, M. F., Man, C. and Lei, W. (2011b) Morphological, physiological and biochemical responses of plants to drought stress. *African Journal of Agricultural Research* 6: 2026–2032.
- Arnon, D. (1949) Copper enzymes in isolated chloroplasts: polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiology* 24: 1–15.
- Asada, K. (2006) Production and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts and their functions. *Plant Physiology* 141: 391–396.
- Ashraf, M. and Foolad, M. A. (2007) Improving plant abiotic-stress resistance by exogenous application of osmoprotectants glycine betaine and proline. *Environmental and Experimental Botany* 59: 206–216.
- Bandurska, H. and Cieslak, M. (2012) The interactive effect of water deficit and UV-B radiation on salicylic acid accumulation in barley roots and leaves. *Environmental and Experimental Botany* 94: 9–18.
- Biswal, A. K., Pattanayak, G. K., Pandey, S. S., Leelavathi, S., Reddy, V. S. and Govindjee Tripaty, B. C. (2012) Light intensity-dependent modulation of chlorophyll b biosynthesis and photosynthesis by overexpression of chlorophyllide a oxygenase in tobacco. *Plant Physiology* 159: 433–449.
- Bray, E. A. (1993) Molecular responses to water deficit. *Plant Physiology* 103: 1035-1040
- Bruening, W. P. and Egli, D. B. (2000) Leaf starch accumulation and seed set at phloem-isolated nodes in soybean. *Field Crops Research* 68: 113–120.

- Campos, P. S., Ramalho, J. C., Lauriano, J. A., Silva, M. J. and do Ceu Matos, M. (1999) Effects of drought on photosynthetic performance and water relations of four *Vigna* genotypes. *Photosynthetica* 36: 79-87.
- Chang, C. C., Yang, M. H., Wen, H. M. and Chern, J. C. (2002) Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. *Journal of Food and Drug Analysis* 10: 178-182.
- Da-Costa-Rocha, I., Bonnlaender, B., Sievers, H., Pischel, I. and Heinrich, M. (2014) *Hibiscus sabdariffa* L. A phytochemical and pharmacological review. *Food Chemistry* 165: 424-443.
- Dhaliwal, R. K., Malik, C. P., Gosal, S. S. and Dhaliwal, L. S. (1997) Studies on hardening of micropropagated sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) plantlet. II. Leaf parameters and biochemical estimations. *Annals of Biology Ludhiana* 13: 15-20.
- Eggink, L. L., Lobrutto, R., Brune, D. C., Brusslan, J., Yamasato, A., Tanaka, A. and Hooper, J. K. (2004) Synthesis of chlorophyll b: localization of chlorophyllide a oxygenase and discovery of a stable radical in the catalytic subunit. *BMC Plant Biology* 4: 5-21.
- Eggink, L.L., Park, H. and Hooper, J.K. (2001) The role of chlorophyll b in photosynthesis: hypothesis. *BMC Plant Biology* 1: 2-9.
- El-Tayeb, M. A. (2005) Response of barley grains to the interactive effect of salinity and salicylic acid. *Plant Growth Regulation* 45: 215-224.
- Eraslan, F., Inal, A., Gunes, A. and Alpaslan, M. (2007) Impact of exogenous salicylic acid on the growth, antioxidant activity and physiology of carrot plants subjected to combined salinity and boron toxicity. *Scientia Horticulturae* 113: 120-128
- Farooq, M., Basra, S. M. A., Wahid, A., Ahmad, N. and Saleem, B. A. (2009) Improving the drought tolerance in rice (*Oryza sativa* L.) by exogenous application of salicylic acid. *Journal of Agronomy and Crop Science* 195: 237-246.
- Goldschmidt, E. E. and Huber, S. C. (1992) Regulation of photosynthesis by end-product accumulation in leaves of plants storing starch, sucrose, and hexose sugars. *Plant Physiology* 99: 1443-1448.
- Gonzales, L. and Gonzales-Vilar, M. (2001) Determination of relative water content. In: *Handbook of plant ecophysiology techniques* (Ed. Reigosa, M. J.) 207-212. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- Gutierrez-Coronado, M. A., Trejo-Lopez, C. and Larque-Saavedra, A. (1998) Effects of salicylic acid on the growth of roots and shoots in soybean. *Plant Physiology and Biochemistry* 36: 563-565.
- Handel, E. V. (1968) Direct microdetermination of sucrose. *Analytical Biochemistry* 22: 280-283.
- Hare, P. D., Cress, W. A. and Van Staden, J. (1998) Dissecting the roles of osmolyte accumulation during stress. *Plant Cell and Environment* 21: 535-553.
- Hayat, S., Hasan, S. A., Fariduddin, Q. and Ahmad, A. (2008) Growth of tomato (*Lycopersicon esculentum*) in response to salicylic acid under water stress. *Journal of Plant Interaction* 3: 297-304.
- Hayat, Q., Hayat, S., Irfan, M. and Ahmad, A. (2010) Effect of exogenous salicylic acid under changing environment: a review. *Environmental and Experimental Botany* 68: 14-25.
- Huber, S. C., Rogers, H. H. and Mowry, F. L. (1984) Effects of water stress on photosynthesis and carbon partitioning in soybean (*Glycine max* [L.] Merr.) plants grown in the field at different CO₂ levels. *Plant Physiology* 76: 244-249.

- Janda, T., Szalai, G., Tari, I. and Paldi, E. (1999) Hydroponic treatment with salicylic acid decreases the effects of chilling injury in maize (*Zea mays* L.) plants. *Planta* 208: 175–180.
- Kadioglu, A., Saruhan, N., Saglam, A., Terzi, R. and Acet, T. (2011) Exogenous salicylic acid alleviates effects of long term drought stress and delays leaf rolling by inducing antioxidant system. *Plant Growth Regulation* 64: 27–37.
- Keller, F. and Ludlow, M. M. (1993) Carbohydrate metabolism in drought-stressed leaves of pigeonpea (*Cajanus cajan*). *Journal of Experimental Botany* 44: 1351–1359.
- Khodary, S. E. A (2004) Effect of salicylic acid on the growth, photosynthesis, and carbohydrate metabolism in salt stressed maize plants. *International Journal of Agriculture and Biology* 6: 5-8.
- Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
- Larque-Saavedra, A. (1978) The antitranspirant effect of acetylsalicylic acid on *Phaseolus vulgaris*. *Physiologia Plantarum* 43: 126–128.
- Li, T. H. and Li, S. H. (2005) Leaf responses of micropropagated apple plants to water stress: nonstructural carbohydrate composition and regulatory role of metabolic enzymes. *Tree Physiology* 25: 495-504.
- Lichtenthaler, H. K. and Buschmann, C. (2001) Chlorophylls and carotenoids: measurement and characterization by UV-VIS spectroscopy. *Current Protocols in Food Analytical Chemistry* F4.3.1–F4.3.8.
- Liu, F., Jensena, C. J. and Andersen, M. N. (2004) Drought stress effect on carbohydrate concentration in soybean leaves and pods during early reproductive development: its implication in altering pod set. *Field Crops Research* 86: 1–13.
- Markwell, M. A. K., Hass, S. M., Tolbert, N. E. and Bieber, L. L. (1981) Protein determination in membrane and lipoprotein samples: manual and automated procedures. *Methods in Enzymology* 72: 296–303.
- McCready, R. M., Guggolz, J., Silveira, V. and Owens, H. S. (1950) Determination of starch and amylose in vegetables. *Analytical Chemistry* 22: 1156–1158.
- Michel, B. E. and Kaufmann, M. R. (1973) The osmotic potential of polyethylene glycol 6000. *Plant Physiology* 51: 914-916.
- Miller, G. L. (1959) Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars. *Analytical Chemistry* 31: 426–428.
- Misra, N. and Saxena, P. (2009) Effect of salicylic acid on proline metabolism in lentil grown under salinity stress. *Plant Science* 177: 181–189.
- Morgan, J. M. (1984) Osmoregulation and water stress in higher plants. *Annual Review of Plant Physiology* 25: 299–319.
- Nakayama, N., Saneoka, H., Moghaieb, R. E. A., Premachandra, G. S. and Fujita, K. (2007) Response of growth, photosynthetic gas exchange, translocation of ¹³C-labelled photosynthate and N accumulation in two soybean (*Glycine max* L. Merrill) cultivars to drought stress. *International Journal of Agriculture and Biology* 9: 669-674.
- Ohashi, Y., Nakayama, N., Saneoka, H., Mohapatra, P. K. and Fujita, K. (2009) Differences in the responses of stem diameter and pod thickness to drought stress during the grain filling stage in soybean plants. *Acta Physiologiae Plantarum* 31: 271-277.

- Omokolo, N. D., Tsala, N. G. and Djocgoue, P. F. (1996) Changes in carbohydrate, amino acid and phenol content in cocoa pods from three clones after infection with *Phytophthora megakarya* Bra. et Grif. *Annals of Botany* 77: 153-158.
- Petridis, A., Therios, I., Samouris, G. and Tananaki, C. (2012) Salinity-induced changes in phenolic compounds in leaves and roots of four olive cultivars (*Olea europaea* L.) and their relationship to antioxidant activity. *Environmental and Experimental Botany* 79: 37-43.
- Rajasekaran, L. R. and Blum, T. J. (1999) New plant growth regulators protect photosynthesis and enhance growth under drought of jack pine seedlings. *Journal of Plant Growth Regulation* 18: 175-181.
- Sakhabutdinova, A. R., Fatkhutdinova, D. R., Bezrukova, M. V. and Shakiova, F. M. (2003) Salicylic acid prevents the damaging action of stress factors on wheat plants. *Bulgarian Journal of Plant Physiology* 29: 314-319.
- Saruhan, N., Saglam, A. and Kadioglu, A. (2012) Salicylic acid pretreatment induces drought tolerance and delays leaf rolling by inducing antioxidant systems in maize genotypes. *Acta Physiologiae Plantarum* 34: 97-106.
- Shakirova, F. M., Sakhabutdinova, A. R., Bezrukova, M. R., Fatkhutdinova, R. A. and Fatkhutdinova, D. R. (2003) Changes in the hormonal status of wheat seedlings induced by salicylic acid and salinity. *Plant Science* 164: 317-322.
- Singh, B. and Usha, K. (2003) Salicylic acid induced physiological and biochemical changes in wheat seedlings under water stress. *Plant Growth Regulation* 39: 137-141.
- Stone, S. L. and Gifford, D. J. (1997) Structural and biochemical changes in loblolly pine (*Pinus taeda* L.) seeds during germination and early seedling growth: I. Storage protein reserves. *International Journal of Plant Science* 158: 727-737.
- Szalai, G., Tari, I., Janda, T., Pestenacz, A. and Paldi, E. (2000) Effects of cold acclimation and salicylic acid on changes in ACC and MACC contents in maize during chilling. *Biologia Plantarum* 43: 637-640.
- Tanaka, R., Koshino, Y., Sawa, S., Ishiguro, S., Okada, K. and Tanaka, A. (2001) Overexpression of chlorophyllide a oxygenase (CAO) enlarges the antenna size of photosystem II in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* 26: 365-373.
- Tari, I., Csiszar, J., Szalai, G., Horvath, F., Pecsvaradi, A., Kiss, G., Szepesi, A., Szabo, M. and Erdei, L. (2002) Acclimation of tomato plants to salinity stress after a salicylic acid pre-treatment. *Proceedings of the seventh Hungarian congress plant physiology. Acta Biologia Szeged* 46: 55-56.
- Turner, N. C. (1997) Further progress in crop water relations. *Advances in Agronomy* 58: 293-338.
- Vierling, V. (1991) The roles of heat shock proteins in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 42: 579-620.
- Whetherley, P. E. (1950) Studies in the water relations of cotton plants. I. The field measurement of water deficit in leaves. *New Phytologist* 49: 81-87.
- White, D. A., Turner, N. C. and Galbraith, J. H. (2000) Leaf water relations and stomatal behavior of four allopathic eucalyptus species planted in Mediterranean southwestern Australia. *Tree Physiology* 20: 1157-1165.
- Xiang, Y., Huang, Y. and Xiong, L. (2007) Characterization of stress-responsive *CIPK* genes in rice for stress tolerance improvement. *Plant Physiology* 144: 1416-1428.

- Yalpani, N., Enyedi, A. J., Leon, J. and Raskin, I. (1994) Ultraviolet light and ozone stimulate accumulation of salicylic acid and pathogenesis related proteins and virus resistance in tobacco. *Planta* 193: 373–376.
- Yancey, P. H., Clark, M. E., Hand, S. C., Bowlus, R. D. and Somero, G. N. (1982) Living with water stress: evolution of osmolyte systems. *Science* 217: 1214–1222.
- Ying, Y., Yue, Y., Huang, X., Wang, H., Mei, L., Yu, W. and Wu, J. (2013) Salicylic acid induces physiological and biochemical changes in three red bayberry (*Myrica rubra*) genotypes under water stress. *Plant Growth Regulation* 71: 181–189.
- Zheng, M., Tao, Y., Hussain, S., Jiang, Q., Peng, S., Huang, J., Cui, K. and Nie, L. (2016) Seed priming in dry direct-seeded rice: consequences for emergence, seedling growth and associated metabolic events under drought stress. *Plant Growth Regulation* 78: 167-178.
- Zhou, X. M., Mackeuzie, A. F., Madramootoo, C. A. and Smith, D. L. J. (1999) Effects of stem-injected plant growth regulators, with or without sucrose, on grain production, biomass and photosynthetic activity of field-grown corn plants. *Journal of Agronomy and Crop Science* 183: 103–110.
- Zulkarnain, W. M., Ismail, M. R., Ashrafuzzaman, M., Saud, H. M. and Haroun, I. C. (2009) Rice growth and yield under rain shelter house as influenced by different water regimes. *International Journal of Agriculture and Biology*. 11: 566-570.