نشریه فیزیولوژی محیطی گیاهی، سال دوازدهم، شماره ۴۵، بهار ۱۳۹۶ / صفحات: ۹۴-۸۱

اثر محلول پاشی متانول بر برخی خصوصیات بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی سویا (*Glycine max* L.) تحت تنش خشکی

بهزاد امرایی[1*]، فرزاد پاک‌نژاد[2]، محمدعلی ابراهیمی[3]، حمید سبحانیان[1]

[1]گروه زیست‌شناسی دانشگاه پیام نور، ایران

[2]گروه زراعت دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج، ایران

[3]گروه بیوتکنولوژی دانشگاه پیام نور، ایران

تاریخ دریافت: ۹۵/۱۱/۱٤ تاریخ پذیرش:۹٦/۳/۱۷

چکیده

به‌منظور بررسی اثرمحلول پاشی متانول وتنش خشکی بر برخی صفات بیوشیمیایی سویا (*Glaycine max* L.) آزمایشی گلدانی در محیط مزرعه انجام گرفت. آزمایش به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملا تصادفی با سه تکرار انجام شد. تیمارهای مورد بررسی شامل سه سطح آبیاری نرمال (آبیاری پس از ٤۰ درصد تخلیه رطوبت قابل دسترس خاک)، تنش متوسط (آبیاری پس از ٦۰ درصد تخلیه رطوبت قابل دسترس خاک) و تنش شدید (آبیاری پس از ۷۰ درصد تخلیه رطوبت قابل دسترس خاک) به‌عنوان عامل اصلی و سطوح متانول به صورت محلول پاشی برگی شامل محلول‌های شاهد(محلول پاشی آب بدون مصرف متانول) و محلول‌های ۷، ١٤ و ۲۱ درصد حجمی متانول به عنوان عامل فرعی بود. نتایج تحقیق نشان داد بین سطوح مختلف متانول اختلاف معنی داری در میزان کلروفیل و ترکیبات کاروتنوئیدی، محتوای رطوبت نسبی، ترکیبات فنلی، مقدار پروتئین کل، پرولین و میزان پراکسید هیدروژن برگ در سطح احتمال خطای یک درصد مشاهده شد. با شروع تنش رطوبتی از تنش ملایم تا تنش شدید کاربرد متانول ١٤درصد تاثیر بیشتری بر میزان کلروفیل کل، کلروفیل a، کلروفیل b، داشت. همچنین در شرایط تنش ملایم و تنش شدید با کاربرد بیشترین مقدار از سطح متانول مقدار تولید پراکسید هیدروژن به کمترین میزان رسید و مقدار ترکیبات فنلی با افزایش کاربرد متانول از ۷ به ١٤درصد افزایش یافت. طبق نتایج به‌دست آمده با کاربرد ١٤ درصد متانول افزایش بیشتری در کارایی پرولین در شرایط تنش شدید مشاهده شد. با افزایش کاربرد حجمی متانول از ۷ به ١٤ درصد مقدار آب نسبی بیشتر در گیاه در شرایط تنش حفظ شد. در مورد پروتئین با شدت یافتن تنش خشکی، تاثیر کاربرد متانول ١٤درصد در مقایسه با متانول ۲۱ درصد به یک میزان بود. بنابراین با توجه به نتایج به دست آمده می توان نتیجه گرفت که متانول مقاومت گیاه در برابر تنش خشکی را بهبود بخشید.

واژه‌های کلیدی: پراکسید هیدروژن، پروتئین کل، پرولین، ترکیبات فنلی، تنش خشکی، متانول، محتوای رطوبت نسبی

*نویسنده مسئول: amraeib@yahoo.com

مقدمه

تنش خشکی، به عنوان یکی از مهم‌ترین تنش‌ها در گیاهان زراعی مناطق گرم و خشک، از جمله عوامل برهم زننده تعادل فرآیندهای فیزیولوژیک در گیاهان زراعی است (Ober, 2001; Lu et al., 2002). تنش خشکی سبب تولید گونه‌های اکسیژن فعال در گیاهان شده و عدم حضور مکانیسم محافظتی جهت حذف آن‌ها، سبب تخریب لیپیدها، پروتئین‌ها و اسیدهای نوکلئیک در گیاهان (Ahmed et al., 2002) و همچنین تجزیه کلروفیل (Flexas and Medrano, 2008) و یا کاهش مقدار رنگدانه‌های کلروفیل a، b می‌گردد که به‌دنبال آن به کاهش توانایی فتوسنتز منجر خواهد شد (Ort, 2001) می‌شود. بعضی گیاهان با تولید ترکیبات آنتی اکسیدانی نظیر ترکیبات فنلی و کاروتنوئیدها از ساختارهای سلولی خود در برابر رادیکال‌های تولید شده در شرایط تنش محافظت می‌کنند (Bettaieb et al., 2010). برخی دیگر نیز با تجمع اسمولیت‌ها (Ashraf and Iram, 2005) مانند تجمع پرولین (Bates et al., 1973) منجر به سازگاری در گیاهان می‌شوند. اما گیاهانی که در شرایط تنش خشکی به‌دلیل دارا بودن مکانیزم‌های اجتناب مناسب با تنش کمتری مواجه می‌شوند از ظرفیت آنتی اکسیدانی کمتری نیز برخوردار می‌باشند. بنابراین امروزه در گیاهان مقاوم به خشکی برای دستیابی به افزایش عملکرد اتخاذ راهکارهای کاهنده اثر تنش بسیار مورد توجه بوده است (Hsiao et al., 2000). در چنین شرایطی یافتن راهی برای کاهش تعرق و جلوگیری از کاهش تثبیت دی اکسیدکربن و کاهش تنفس نوری از مهمترین راهکارها محسوب می‌شود. برای مثال، افزایش دی اکسیدکربن می‌تواند اثر ناشی از تنش خشکی را خنثی کند (Zbiec et al., 1999). یکی از این راهکارها الکل‌ها هستند که با افزایش فعالیت فتوسنتزی گیاه و کاهش تنفس نوری، می‌توانند در رشد گیاهان و تغییر محتوای فیتوشیمیایی گیاهان تأثیر داشته باشد (Khosravi et al., 2012). مشاهدات نشان می‌دهد که کاربرد محلول‌های متانول بر روی قسمت‌های هوایی ناشی از اثر متانول به‌عنوان یک بازدارنده تنفس نوری است (Ramirez et al., 2006) و از سویی جذب CO_2 فتوسنتزی (Kumar and Thomas, 2004) به‌عنوان یکی از راه‌های افزایش رشد که می‌تواند ناشی از افزایش مقدار کلروفیل یا نسبت کلروفیل a/b باشد (Faver and Gerik, 1996) با کنترل روزنه‌ها ارتباط مستقیم دارند (Kumar and Thomas, 2004). مشخص شده است که پس از محلول پاشی متانول بر روی گیاهان فعالیت برخی از ژنهایی که فتوسنتز را تنظیم می‌کنند، توسط متانول تنظیم می گردد و بسته به زمان، افزایش ثابتی در مقدار عوامل تنظیم کننده متابولیسم اسیدهای آمینه و سنتز پروتئین‌ها نظیر ترانس آمینازها و اندوپپتیدازها مشاهده می‌شود (Downie et al., 2004). تحقیقات سال‌های اخیر نشان داده است که رشد و عملکرد گیاهان C3 با محلول پاشی متانول افزایش پیدا می‌کند و متانول به‌عنوان یک منبع کربن برای این گیاهان محسوب می‌شود (Safarazade Vishgahi, 2007). متانول یکی از ساده ترین فرآوردهای گیاهی بوده که توسط گیاهان خصوصا طی رشد برگ‌ها و در اثر دمتیلاسیون پکتین دیواره‌های سلولی آن‌ها تولید می‌شود (Haston and Roje, 2001). پس از تولید این ماده آلی فرار در داخل گیاهان، مقداری از آن از برگ‌ها خارج و وارد لایه مرزی و سپس اتمسفر می‌شود (Mudgett and Clarke, 1993). بخش دیگر آن تبدیل به فرمآلدهید و سپس به اسیدفرمیک و در نهایت به CO_2 تبدیل می‌شود. بررسی‌های انجام شده در مناطق خشک پاکستان نشان داد که محلول پاشی متانول ۳۰ درصد در گیاه پنبه موجب افزایش مقاومت به تنش خشکی و افزایش میزان پرولین در گیاه

می‌شود (Makhdum et al., 2002). باکتری‌های همزیست مانند متیلوتروفیک روی برگ اکثر گیاهان زراعی زندگی می‌کنند که این باکتری‌ها در ازای دریافت متانول که از برگ گیاه خارج می‌شود پیش ماده ساخت بعضی از هورمون‌ها مانند اکسین و سیتوکنین را که نقش مهمی در تسریع روند رشد و فرآیندهای فیزیولوژیکی گیاه به عهده دارند را در اختیار گیاه قرار می‌دهد. به نظر می‌رسد محلول پاشی متانول با افزایش فعالیت باکتری‌های متیلوتروفیک منجر به افزایش تولید هورمون اکسین و سیتوکنین در گیاه می‌شود و از طرف دیگر مشخص شده این هورمون‌ها در افزایش پروتئین سازی در گیاه نفش به سزایی دارند (Ivanova and et al., 2001). در آزمایشی بر روی بادام زمینی گزارش شد که محلول پاشی متانول منجر به افزایش مقدار پروتئین در گیاه شد (Vyshkayy et al., 2008). طبق تحقیقات انجام گرفته محلول پاشی متانول در شرایط تنش خشکی میزان پراکسیدهیدروژن برگ گیاه سیاهدانه را به‌طور معنی‌داری کاهش داد که می‌تواند ناشی از فعال‌تر شدن چرخه کلوین باشد (Mojtaba et al., 2015). متابولیسم متانول منجر به افزایش قندسازی در برگ‌ها می‌شود که این سبب افزایش فشار آماس و افزایش سرعت آسیمیلاسیون و رشد در گیاهان تیمار شده با آن می‌گردد. افزایش محتوای آب نسبی و تورژسانس در بادام زمینی نیز گزارش شده است (Safarazade Vishgahi, 2007). تحقیقات نشان داده است تحت شرایط تنش خشکی با محلول پاشی متانول محتوای کلروفیل در برگ لوبیا افزایش یافته است (Mohammadian et al., 2003). با توجه به این که به نظر می‌رسد متانول با افزایش میزان CO_2 درون سلولی و تثبیت CO_2 در بهبود تحمل به تنش خشکی نقش دارد مطالعه حاضر با هدف بررسی اثر متانول بر سویا رقم ویلیامز در شرایط تنش ملایم و شدید خشکی انجام شد تا برخی پاسخ‌های فیزیولوژی و بیوشیمیایی گیاه با استفاده از این تیمار در مقابله با تنش خشکی ارزیابی شود.

مواد و روش‌ها

طرح و محل اجرای آزمایش: به‌منظور بررسی اثر محلول پاشی متانول بر برخی پاسخ‌های فیزیولوژیکی سویا تحت تنش خشکی آزمایش گلدانی در محیط باز در سال ۱۳۹٤ در مزرعه تحقیقاتی دانشکده آزاد کشاورزی واحد کرج واقع در کرج (ماهدشت) واقع در ۳۵ درجه و ٤٥ دقیقه عرض شمالی و ٥١ درجه و ٦ دقیقه طول شرقی به ارتفاع ۱۳۱۳ متر از سطح دریا به مرحله اجرا درآمد. منطقه ماهدشت دارای اقلیم گرم و نیمه خشک و متوسط بارندگی سالیانه آن ۲۷٦ میلی‌متر است. این آزمایش به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار انجام گرفت. عوامل آزمایش شامل تنش خشکی در سه سطح آبیاری معمولی (آبیاری پس از ٤٠ درصد تخلیه رطوبت قابل دسترس خاک)، تنش متوسط (آبیاری پس از ٦٠ درصد تخلیه رطوبت قابل دسترس خاک) و تنش شدید (آبیاری پس از ۷۰ درصد تخلیه رطوبت قابل دسترس خاک) به عنوان عامل اصلی و تیمار محلول پاشی نیز در چهار سطح شامل محلول‌های شاهد (محلول پاشی آب بدون مصرف متانول) و محلول‌های ۷، ١٤ و ۲۱ درصد حجمی متانول به‌عنوان عامل فرعی بود بودند. رقم مورد استفاده در این آزمایش رقم ویلیامز بود. درصد رطوبت خاک از طریق اندازه گیری درصد وزنی روزانه رطوبت خاک و اضافه نمون آب مصرفی توسط هر گلدان تنظیم شد. جهت انجام این آزمایش از گلدان‌هایی به قطر ۲۲ و ارتفاع ۲۵ سانتی‌متر استفاده شد، که حاوی ۱۰ کیلوگرم از خاک مورد نظر بود. خاک مورد استفاده برای کشت، شامل خاک مزرعه و ماسه به نسبت

مساوی بود که کود اوره بـه میـزان ۰/۲۵ گـرم اوره و کود فسفره از منبع فسفات آمونیوم به میـزان نـیم‌گـرم براساس آزمون خاک بـه هـر گلـدان اضـافه گردیـد. همچنین مقـدار نـیم گـرم اوره بـه ازای هـر گلـدان، به‌صورت سرک در ابتدای رشد سـاقه، بـه خـاک هـر گلدان افزوده شد. قبل از کاشت، بذور بـا قـارچ‌کـش ویتاواکس به میزان یـک در هـزار ضـدعفونی شـدند. کشت بذر در ۲ خرداد صورت گرفت. در هر گلدان ٦ بذر کاشته شد که پس از استقرار گیاهچـه‌هـا بـه سـه گیاهچه در هر گلـدان تنـک شـدند. عمـق کاشـت ٤ سانتی‌متر در نظر گرفته شد. قبل از جوانه‌زنی بـذرها، گلدان‌ها هر ٤٨ ساعت یک بار آبیـاری شـدند. بعـداز ظهور لپه‌ها، گلدان‌ها در جایگـاه خـود در مزرعـه بـر اساس تیمارهای مورد آزمایش مرتب شـدند. در ایـن جایگاه ۱۲ عدد گلدان به صورت ۳ ردیف ٤ تایی (هر ردیف شامل ٤ تیمار محلـول پاشـی متـانول و تیمـار آبیاری و هر ردیـف عمـودی شـامل ۳ تکـرار از هـر تیمار) جای گرفتند. با پدیدار شدن اولین برگ مرکب (اولین بـرگ ۳ برگچـه‌ای) تیمارهـای محلـول پاشـی متانول و آبیاری بر روی گیاه سویا اعمال شد. محلول پاشی در سه مرحله طی فصل رشد گیاه و بـا فواصـل زمانی ۱۰ روز انجام شد. شیوه محلول پاشی بـه ایـن شکل انجام شد که روی همه قسمت‌های بوتـه سـویا قطرات محلول جاری شد. صفات مورد بررسـی یـک روز پس از آخرین محلول پاشی مـورد انـدازه گیـری قرار گرفت. در طول مدت تیمار برای کاهش خطـای آزمایش و نیز همگـن نمـودن شـرایط رویـش بـرای تمامی گیاهان، گلدان‌های هر بلوک بـه‌طـور تصـادفی جابجا شدند.

اندازه‌گیری محتوای فنل کل

برای سنجش ترکیبات فنلی برگ این مراحل طی شد:

توزین نمونه‌های تر و قرار دادن آن‌ها در ۱۰ میلی لیتر اتانول ۸۰ درصد و جوشاندن آن، سانتریفیوژ نمودن نمونه‌ها، افزودن فولن رقیق شده و کربنات سدیم اشباع، سانتریفیوژ کردن وخواندن جذب در طول موج ٦٤٠ نانومتر در مقابل شاهد دستگاه رسم منحنی استاندارد با استفاده از کاتکول ومحاسبه میزان ترکیبات فنلی بر حسب میلی‌گرم در گرم وزن تر (Matta and Giai, 1969).

اندازه‌گیری پرولین

برای تعیین میزان پرولین برگ این مراحل انجام شد:

توزین نمونه‌های تر و همگن سازی آن‌ها در ۱۰ میلی‌لیتر اسید سولفاسالیسیلیک ۳ درصد، سانتریفیوژ کردن نمونه‌ها و اضافه کردن معرف نین هیدرین و اسید استیک خالص به سوپرناتانت، قرار دادن در بن ماری به مدت یک ساعت، افزودن تولوئن، جداسازی محلول بالایی و خواندن جذب آن در طول موج ۵۲۰ نانومتر در مقابل شاهد دستگاه، رسم منحنی استاندارد پرولین و محاسبه میزان پرولین اندام‌های گیاه بر حسب میکرومول بر گرم وزن تر نمونه (Bates et al., 1973).

سنجش پروتئین: به ۱۰۰ میلـی‌لیتـر بـافر تـریس ۰/۵ مولار با PH معادل ٦/۸، ۲ گـرم SDS افـزوده و حـل گردید. ۲۰۰ میکرولیتر از بافر استخراج به نمونه‌هـای تازه برگ در دمای ٤ درجه سانتی گـراد افـزوده شـد. سپس محلول‌ها به‌مدت ۲۰ دقیقه با دور rpm ۱۳۰۰۰ سانتریفیوژ شدند. به ۵ میلی‌لیتر محلول برادفورد، ۱۰۰ میکرولیتر عصاره فوق اضـافه و پـس از ۳۰ دقیقـه در شرایط آزمایشگاه، جذب عصاره فوق در طـول مـوج ۵۹۵ نـانومتر انـدازه‌گیـری و بـا اسـتفاده از منحنـی استاندارد مقدار پروتئین بر حسب میلی‌گـرم بـر گـرم بافـت تـر بـرگ محاسـبه گردیـد. بـا حـل نمـودن ۱ میلی‌گرم پودر سرم آلبـومین گـاووی (BSA) درون ۵

میلی‌لیتر آب مقطر دوبار تقطیر، محلول استاندارد پروتئین تهیه شد(Bradford, 1976).

اندازه‌گیری پراکسید هیدروژن: سنجش پراکسید هیدروژن با استفاده از روش Sagisaka (۱۹۷٦) انجام شد. به این منظور مقدار ۰٫۵ گرم از بافت تر برگ با ۵ میلی‌لیتر اسیدتری کلرواستیک ۱ درصد در حمام یخ کاملاً سائیده و همگن شد. هموژن حاصل به‌مدت ۱۵ دقیقه در ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ گردید. در مرحله بعد، در حمام یخ ۰/۵ میلی‌لیتر از محلول فوق به لوله آزمایش منتقل و به آن ۰/۵ میلی‌لیتر بافر فسفات پتاسیم ۱۰ میلی مولار با PH برابر ۷ و ۱ میلی‌لیتر یدیدپتاسیم ۱ مولار اضافه گردید. در نهایت جذب نمونه‌ها در طول موج ۳۹۰ نانومتر به کمک دستگاه اسپکتروفتومتر تعیین گردید. سپس بر اساس منحنی استاندارد آب اکسیژنه، غلظت پراکسیدهیدروزن در نمونه‌ها بر حسب میکرومول بر گرم وزن تر برگ محاسبه شد.

محتوای نسبی آب برگ: جهت تعیین وضعیت آب در بوته‌های سویا تیمار شده با متانول در شرایط مختلف آبیاری اندازه گیری محتوای رطوبت نسبی برگ یک روز بعد از آخرین محلول پاشی متانول انجام شد. ۰/۵ گرم از جوان‌ترین برگ‌های توسعه یافته هر گیاه جدا شده و سپس نمونه‌ها به مدت ۲٤ ساعت روی آب مقطر شناور شدند. چهار ساعت پس از آب گیری، قطعات برگ بلافاصله وزن شدند تا وزن برگ‌ها در حالت تورزسانس به دست آید. پس از آن که قطعات برگ در آون ۷۰ درجه سانتی گراد به مدت ٤۸ ساعت خشک شدند تا وزن خشک نمونه برگی به دست آید و برای محاسبه محتوای نسبی آب برگ‌ها از رابطه زیر استفاده شد (Gunes et al., 2008).

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

FW= وزن‌تر نمونه برگی، TW= وزن برگ‌ها در حالت تورژسانس و DW= وزن خشک نمونه برگی

سنجش میزان کلروفیل و ترکیبات کاروتنوئیدی: برای سنجش کلروفیل و کاروتنوئیدها از روش (Lichtenthaler, 1992) استفاده شد. ابتدا ۰/۱ گرم برگ با ٤ میلی‌لیتر استن ۸۰ درصد در هاون چینی سائیده شد و سپس محلول حاصل به‌مدت ۵ دقیقه در ۳۰۰۰ دور سانتریفیوژ شده و سپس جذب محلول رویی جهت تعیین میزان کلروفیل و ترکیبات کاروتنوئیدی توسط اسپکتروفتومتر در طول موج‌های ٦٤۷، ٦٦٤ و ٤۷۰ نانومتر قرائت شد. میزان کلروفیل کل، کلروفیل a، b و ترکیبات کاروتنوئیدی از طریق معادله‌های زیر محاسبه گردید:

Chla=12/21(A664)- 2/79(A647)
Chlb= 21/21(A647)- 5/1(A664)
Carotenoide= (1000 A470- 1/8chla- 85/02chlb)/198
chlT= chla+ chlb

تجزیه واریانس داده‌های صفات سویا با استفاده از مدل‌های خطی تعمیم یافته[1] از طریق رویه GLM در محیط نرم‌افزار SAS 9.2 انجام پذیرفت. مقایسه میانگین‌های اثرات ساده فاکتورها و برهمکنش آنها با استفاده از روش حداقل اختلاف معنی‌دار[2] در سطح معنی‌داری ۰/۰۵ انجام شد.

نتایج

تاثیر متانول در شرایط تنش خشکی و بدون تنش خشکی بر رنگیزه‌های فتوسنتزی (کلروفیل کل، کلروفیل a، کلروفیل b و کاروتنوئیدها): بر اساس نتایج تجزیه واریانس اثر متانول در تنش رطوبتی بر میزان کلروفیل کل، کلروفیل a، کلروفیل b، و کارتنوییدها در سطح احتمال خطای ۱ درصد معنی‌دار شد. همچنین برش‌دهی بر همکنش متانول بر تنش

1- Generalized Linear Models
2- Least significant difference (LSD)

رطوبتی نشان داد که در شرایط تنش شدید رطوبتی اثر متانول بر میزان کلروفیل کل، کلروفیل a، کلروفیل b، در سطح احتمال خطای ۱ درصد معنی‌دار بود (P<%1) (جدول ۱). برش‌دهی بر همکنش متانول بر تنش رطوبتی در کاروتنوئیدها نیز نشان داد که اثر متانول بر رنگیزه‌های کاروتنوئیدها فقط در شرایط تنش ملایم و شرایط بدون تنش رطوبتی در سطح احتمال خطای ۱ درصد معنی‌دار است. در مورد رنگیزه فتوسنتزی کاروتنوئیدها در شرایط تنش ملایم محلول پاشی متانول ١٤ درصد تاثیر کمتری نسبت به کاربرد متانول ۲۱ درصد داشت اما در شرایط تنش شدید این تاثیر یکسان بود به‌طوری‌که با افزایش درصد متانول از ١٤ به ۲۱ درصد، مقدار کاروتنوئیدها افزایش نیافت (جدول ۳). نتایج نشان داد که به‌طورکلی با افزایش درصد کاربرد متانول نسبت به شاهد (بدون کاربرد متانول) عملکرد رنگیزه‌های فتوسنتزی کارایی بهتری یافت. در شرایطی که هیچ تنش رطوبتی وجود نداشت کاربرد متانول ١٤ و ۲۱ درصد تاثیر مشابه و از طرفی بیشترین تاثیر را بر میزان کلروفیل کل، کلروفیل b، و کاروتنوئیدها داشت، در مورد کلروفیل a کاربرد متانول ۲۱ درصد، بیشترین تاثیر را در شرایط بدون تنش رطوبتی داشت. به علاوه با شروع تنش رطوبتی از تنش ملایم تا تنش شدید افزایش کاربرد متانول از ١٤ به ۲۱ درصد تاثیر بیشتری بر میزان کلروفیل کل، کلروفیل a، کلروفیل b، نداشت و مقدار این اثر مشابه بود.

جدول ۱: نتایج تجزیه واریانس تاثیر فاکتورهای آزمایشی و برهمکنش آنها بر میزان کلروفیل کل، کلروفیل a و b، کاروتنوئید و آب نسبی

	مجموع				مربعات (ss)	
منبع تغییرات	درجه آزادی	کلروفیل کل	کلروفیل a	کلروفیل b	کاروتنوئید	RWC
تنش رطوبتی	۲	١٤/٧٥**	٧/٢٥ns	٠/٧٢**	٤/١٦**	٥٠٦/٩٦**
متانول	۳	٥٢/٦٢**	٤٤/٢٩**	١/١٢**	٣/٣٦**	٩٠/٩٠**
تنش رطوبتی × متانول	٦	١٤/٠٠**	٩/٨٧*	٠/٥٣**	١/٣٤*	٣٧/٢٩**
خطا	٢٤	١٦/٦٧	١٢/٥٥	٠/٣٥	١/٦٩	٢٥/٨٠
ضریب تغییرات (C.V.)	٧/٦٦		٧/٨٩	٦/٥٤	٦/٧٤	١/٣١
برش دهی برهمکنش تنش رطوبتی × متانول تحت تأثیر سطوح مختلف تنش رطوبتی						
بدون تنش	۳	١٦/٦٤**	١٠/٦٨ns	٠/٥٧**	١/٨٧**	٧٨/٧**
تنش ملایم	۳	٥/٠٨ns	٦/٠٢*	٠/٠٠٧ns	٢/٢٩**	٣٥/٤**
تنش شدید	۳	٤٤/٩٠**	١٢/٤٨**	١/٠٧**	٠/٥٤ns	١٤/٠*

*مقادیر کمتر از ۰/۰۱ و ۰/۰۵ به‌ترتیب نشان‌دهنده تاثیر معنی‌داری در سطه معنی‌داری ۰/۰۱ و ۰/۰۵ می‌باشد.

تاثیر متانول در شرایط تنش خشکی و بدون تنش خشکی بر تولید پراکسید هیدروژن: اثر متانول در شرایط تنش رطوبتی بر تولید پراکسید هیدروژن در سطح احتمال خطای ۱ درصد معنی دار بود (جدول ۲). برهمکنش تنش رطوبتی در متانول نیز در سطوح مختلف تنش رطوبتی از تنش ملایم تا شدید معنی‌دار بود اما در شرایط بدون تنش خشکی کاربرد متانول بر پراکسید هیدروژن معنی دار نشد. بر طبق جدول مقایسه میانگین (جدول ۳) تولید پراکسید هیدروژن بدون کاربرد متانول در بیشترین مقدار است. در شرایط تنش ملایم و تنش شدید با کاربرد بیشترین مقدار از سطح متانول ۲۱ درصد مقدار تولید پراکسید هیدروژن به کمترین میزان رسید (جدول ۳).

جدول ۲: نتایج تجزیه واریانس تاثیر فاکتورهای آزمایشی و برهمکنش آنها بر میزان پروتئین کل، ترکیبات فنل و پراکسیدهیدروژن

مجموع		مربعات (ss)			
منبع تغییرات	درجه آزادی	پروتئین کل	پرولین	ترکیبات فنلی	پراکسید هیدروژن
تنش رطوبتی	۲	۱٤/۰۹**	۱۳۸/۱۹**	۹۵۹/۵**	۱۰/۹۷**
متانول	۳	۱/۳۲**	۲۰/۲۲**	۸۱/۰٦**	۱۲/۹۵**
تنش رطوبتی×متانول	٦	۰/۳۳**	٦/٦۰**	۲۲/۰۱**	۳/۳۳**
خطا	۲٤	۰/۲۳	۲/۲۱	۷/۸٤	۱/٤۰
ضریب تغییرات (C.V.)		۵/۱۹	٦/۹۱	٦/٦۰	٦/٦٤
برش دهی برهمکنش تنش رطوبتی×متانول تحت تأثیر سطوح مختلف تنش رطوبتی					
بدون تنش	۳	۱/۱٦**	۱/۱٦**	۱٦/٦**	۰/۹۲ns
تنش ملایم	۳	۰/۳۳**	۵/۱٤**	٦۲/۷**	۳/۹۳**
تنش شدید	۳	۰/۱٤ns	۲۰/۵۱ns	۲۳/۷**	۱۱/٤٤۲**

*مقادیر کمتر از ۰/۰۱ و۰/۰۵ به‌ترتیب نشان‌دهنده تاثیر معنی‌دار در سطه معنی‌داری ۰/۰۱ و ۰/۰۵ می‌باشد.

جدول ۳: مقایسه میانگین تاثیر تنش رطوبتی در سطوح مختلف محلول پاشی متانول بر برخی صفات سویا‡

		کلروفیل کل (میلی گرم بر گرم وزن تر)	کلروفیل a (میلی گرم بر گرم وزن تر)	کلروفیل b (میلی گرم بر گرم وزن تر)	کاروتنوئیدها (میلی گرم بر گرم وزن تر)	پراکسیدهیدروژن (میکرومول بر گرم وزن تر)
تنش رطوبتی	متانول (درصد)					
بدون تنش	۰	۱۰/۲c	۸/٦b	۱/٦b	۳/۷b	۳/٤a
	۷	۱۰/۹bc	۹/۰b	۱/۸b	٤/٤a	۰/۳b
	۱٤	۱۲/۰ab	۹/۷b	۲/۱a	٤/٦a	۲/۸b
	۲۱	۱۳/۳a	۱۱/۱a	۲/۲a	٤/۷a	۲/۷b
تنش ملایم	۰	۹/۲b	۷/۷b	۱/٦a	۳/٤b	٤/۳a
	۷	۹/۸ab	۸/۲b	۱/٦a	۳/٦b	۳/۳b
	۱٤	۱۰/۲ab	۸/۵ab	۱/٦a	۳/۸b	۳/۵b
	۲۱	۱۱/۰a	۹/٦a	۱/٦a	٤/۵a	۲/۸c
تنش شدید	۰	۸/۳b	٦/۹b	۱/۵b	۳/٤b	۵/۹a
	۷	۹/٦b	۸/۰b	۱/٦b	۳/۳b	٤/۳b
	۱٤	۱۳/۰a	۱۰/٦a	۲/۲a	۳/۸a	۳/۸c
	۲۱	۱۲/٤a	۱۱/۱a	۲/۱a	۳/٦ab	۳/۳d

*میانگین‌های دارای حروف مشترک در هر ستون برای هر سطح تنش خشکی، اختلاف معنی‌داری با یکدیگر ندارند.

تاثیر متانول در شرایط تنش خشکی و بدون تنش خشکی بر مقدار ترکیبات فنلی و پرولین: براساس نتایج تجزیه واریانس اثر متانول در تنش رطوبتی بر میزان فنل کل و پرولین در سطح احتمال خطای ۱ درصد معنی‌دار شد. برش‌دهی تنش رطوبتی نیز نشان داد که متانول در شرایط تنش ملایم بر هر دو صفت معنی دار است اما متانول در شرایط تنش شدید بر پرولین معنی دار نیست (جدول ۲). نتایج نشان داد که

بیشترین مقدار فنل کل در شرایط بدون تنش رطوبتی با کاربرد متانول ۲۱ درصد مشاهده شد ولی افزایش بیشتر درصد متانول حجمی از ١٤ به ۲۱ بر افزایش پرولین بی تاثیر بود. در شرایط تنش ملایم و تنش شدید مقدار فنل کل با افزایش کاربرد متانول از ۷ به ١٤ درصد افزایش یافت و با کاربرد بیشترین درصد حجمی متانول (۲۱ درصد) در شرایط تنش شدید خشکی مقدار فنل کل نسبت به کمترین مقدار از کاربرد متانول یعنی ۷ درصد تغییری نکرد. در این شرایط کاربرد متانول ١٤ درصد حجمی بیشترین تاثیر بر مقدار فنل کل را داشت. در مورد پرولین در شرایط تنش ملایم کاربرد بیشتر متانول موثرتر بود ولی در شرایط تنش شدید با کاربرد ١٤درصد متانول افزایش بیشتری در کارایی پرولین مشاهده شد. با کاربرد متانول بیشتر در این شرایط کارایی عملکرد پرولین کمتر شد (جدول ٤).

تاثیر متانول در شرایط تنش خشکی و بدون تنش خشکی بر میزان آب نسبی (RWC): آنالیز واریانس نشاندهنده اثر معنی دار متانول در شرایط تنش رطوبتی بر میزان آب نسبی در سطح احتمال خطای ۱ درصد بود. همچنین برش دهی بر همکنش متانول بر تنش رطوبتی نشان داد که در شرایط بدون تنش، تنش ملایم و همچنین تنش شدید رطوبتی اثر متانول بر میزان آب نسبی معنی‌دار بود. مقایسه میانگین نشان داد که بیشترین مقدار آب نسبی در شرایط بدون تنش رطوبتی با کاربرد حجمی متانول ۲۱ درصد مشاهده شد و در شرایط تنش ملایم و تنش شدید با افزایش کاربرد حجمی متانول از ۷ به ١٤ درصد مقدار آب نسبی بیشتر در گیاه حفظ شد و با کاربرد بیشتر متانول این مقدار تغییری نکرد (جدول ٤).

جدول ٤: مقایسه میانگین تاثیر تنش رطوبتی در سطوح مختلف محلول پاشی متانول بر برخی صفات سویا‡

تنش رطوبتی	متانول (درصد)	پرولین (میکرومول بر گرم وزن تر)	مقدار آب نسبی (٪)	پروتئین (میلی‌گرم بر گرم وزن تر)	ترکیبات فنلی (میکروگرم بر گرم وزن تر)
بدون تنش	۰	۱/۳^{b}	۸۰/۸^{c}	۱/۷^{c}	۱۱/۹^{c}
	۷	۱/٦^{b}	۸۲/۸^{b}	۲/۱^{b}	۱۲/۱^{c}
	١٤	۱/۸^{ab}	۸۳/۸^{b}	۲/٤^{a}	۱۳/۱^{b}
	۲۱	۲/۲^{a}	۸۷/۸^{a}	۲/٥^{a}	١٤/۹^{a}
تنش ملایم	۰	۲/۳^{c}	۷٥/٦^{c}	۱/۱^{c}	١٦/۹^{c}
	۷	۳/۲^{b}	۷۸/۱^{b}	۱/۳^{b}	۱۸/٦^{b}
	١٤	۳/٤^{b}	۸۰/۱^{a}	۱/۳^{b}	۲۱/۸^{a}
	۲۱	٤/۱^{a}	۷۹/٤^{ab}	۱/٥^{a}	۲۲/٥^{a}
تنش شدید	۰	٤/۳^{c}	۷۳/٥^{b}	۰/٥^{c}	۲۳/۷^{c}
	۷	٦/۳^{b}	۷۳/۹^{b}	۰/٦^{bc}	۲٥/۳^{b}
	١٤	۷/۳^{a}	۷٦/۳^{a}	۰/۸^{a}	۲۷/٦^{a}
	۲۱	۷/۷^{a}	۷٤/۹^{ab}	۰/۷^{ab}	۲٥/۹^{b}

‡ میانگین‌های دارای حروف مشترک در هر ستون برای هر سطح تنش خشکی، اختلاف معنی داری با یکدیگر ندارند.

تاثیر متانول در شرایط تنش خشکی و بدون تنش خشکی بر پروتئین کل: آنالیز واریانس نشاندهنده اثر معنی‌دار متانول در شرایط تنش رطوبتی بر پروتئین کل در سطح احتمال خطای ۱ درصد بود. برش‌دهی بر همکنش متانول بر تنش رطوبتی نشان داد که در شرایط بدون تنش، تنش ملایم و همچنین تنش شدید رطوبتی اثر متانول بر میزان پروتئین کل متانول در شرایط تنش شدید خشکی بر این صفت معنی‌دار نیست. مقایسه میانگین نشان داد که که کاربرد متانول ۲۱ درصد در شرایط تنش ملایم بیشترین تاثیر بر میزان پروتئین کل را داشته است و با شدت یافتن تنش خشکی تاثیر کاربرد حجمی متانول ١٤ درصد در مقایسه با کاربرد متانول ۲۱ درصد به یک میزان بود و تفاوتی بر میزان پروتئین کل نداشت (جدول ٤).

بحث

کاروتنوئیدها نقش آنتی‌اکسیدان را در تنش‌های گیاهی بر عهد دارند. در واقع به‌عنوان رنگدانه‌های کمکی در تنش‌های اکسیداتیو اعمال نقش می‌کنند. در بافت‌های فتوسنتزی اختصاصاً وظیفه حفاظت از فتوسیستم‌های نوری را بر عهده دارند و از طریق فروکش کردن سریع وضعیت برانگیخته کلروفیل، حفاظت نوری از آن را انجام می‌دهند (Rasoli, 2011).

تحقیقات نشان داده است کاربرد متانول با کاهش دادن اثرات منفی خشکی بر کارایی رنگیزه‌های فتوسنتزی موثر است زیرا گفته شده کاربرد متانول از طریق کاهش اندازه فتوسیستم I و II، موجب جذب کمتر نور و حفظ سیستم فتوسنتزی از این طریق می‌گردد و این یعنی تخریب کمتر ملکول‌های کلروفیل تحت تنش خشکی (Khafagi and El-Lawendy, 1997). در این آزمایش نیز با کاربرد متانول چه در شرایط بدون تنش و هم در شرایط تنش خشکی، مقدار کلروفیل (کل، a و b) به شکل معنی‌داری افزایش یافت. زیرا تنش خشکی به همراه گرمای زیاد آن، از عوامل بازدارندگی نوری می‌باشند که موجب اختلال در وظایف فتوشیمیایی فتوسیستم II شده و از کارایی مهم ترین فعالیت فیزیولوژیکی گیاه، یعنی فتوسنتز، به شدت می‌کاهد (Ober, 2001; Lu et al., 2002). همچنین در شرایط تنش خشکی، جذب منیزیم و احتمالاً آهن نیز کاهش پیدا می‌کند و این موجب کاهش سنتز ملکول کلروفیل در گیاه می‌گردد (Keles and Oncel, 2004). از طرف دیگر این تنش به افزایش رادیکال‌های آزاد در گیاه منجر می‌شود که این امر نیز باعث پراکسیداسیون و در نتیجه تخریب ملکول‌های کلروفیل می‌گردد (Flexas and Medrano, 2008). مشخص شده است که با محلول پاشی متانول در سطح گیاه، سطح ریشه افزایش می‌یابد و جذب عناصر غذایی به‌ویژه آهن و منیزیم را تحت تأثیر قرار می‌دهد (Hossinzadeh et al., 2015). مطابق تحقیق Nonomura و Benson (۱۹۹۲) یکی از مزیت‌های مهم متانول، جلوگیری و کاهش تنش‌های القاء شده به گیاهان زراعی در اثر انجام تنفس نوری در آنهاست. افزایش میزان کلروفیل گیاه با استفاده از محلول پاشی متانول تحت شرایط تنش خشکی، برای گندم، نخود و لوبیا نیز گزارش شده است (Ramadant Mohammadian et al., 2003; and Omran, 2005). در این تحقیق نیز معنی‌دار شدن متانول بر میزان کلروفیل و کاروتنوئیدها در شرایط خشکی نشان‌دهنده اثر مثبت متانول بر دستگاه فتوسنتزی گیاه سویا و احتمالاً جذب بیشتر کربن فتوسنتزی می‌تواند باشد که البته مشخص شده در تیمار مزرعه‌ای متانول، هنگامی بیشترین تأثیر در افزایش کارکرد دستگاه فتوسنتزی گیاه مشاهده گردید که پاشش برگی متانول در ساعات آفتابی شدید صورت پذیرد (Nonomura and Benson, 1992).

به نظر می‌رسد که متانول کارایی مثبتی در شرایط تنش خشکی بر کاهش تولید پراکسید هیدروژن که در واقع به تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن در قسمت‌های مختلف گیاه منجر می‌شود می‌تواند داشته است. این احتمال وجود دارد که در شرایط تنش خشکی و عدم کاربرد متانول محدودیت دی‌اکسید کربن (CO_2) بیشتر شده باشد. بنابراین می‌توان گفت که با کاهش غلظت دی اکسید کربن کلروپلاستی، تنفس نوری افزایش یافته و در نتیجه تولید پراکسید هیدروژن نیز افزایش یافته است (Yordanov et al., 2003). در این شرایط گیاهان برای جلوگیری از مسیر چرخه الکترون کلروپلاستی گیاهان عالی مسیر تنفس نوری را با تولید مجدد $NADP^+$ به راه می‌اندازد (Shao et al., 2008). به همین دلیل به نظر می‌رسد که با کاربرد متانول تثبیت دی اکسید کربن صورت گرفته و با تولید مجدد $NADP^+$ توسط سیکل کالوین چرخه فتوسنتزی ادامه یافته و تولید پراکسید هیدروژن کاهش می‌یابد. از طرف دیگر تولید پراکسید هیدروژن در گیاه سبب فعال شدن بعضی متابولیت‌های گیاهی و یا هورمون‌ها و آنزیم‌ها می‌شود (Shao et al., 2008) که می‌تواند به‌صورت مانعی برای تولید اکسیژن‌های رادیکال آزاد و جلوگیری از آسیب‌های سلولی باشد که به پایداری گیاه در شرایط تنش کمک کند.

پاسخ به تنش خشکی در سطح سلولی، شامل تنظیمات غشایی، تغییر در معماری دیواره سلولی، تغییر در چرخه‌های و تقسیمات سلولی و نیز تولید و تجمع متابولیت‌های سازگار نظیر پرولین است (Munns and Tester, 2008). مشخص شده که بسیاری از ترکیبات فنلی به‌عنوان آنتی‌اکسیدان عمل می‌کنند و می‌توانند به‌طور مؤثری رادیکال‌های گروه هیدروکسیل و پروکسیل را حذف کنند و از اکسید شدن چربی‌ها ممانعت به عمل آورند (Boscaiu et al., 2010).

بررسی‌های انجام شده نشان داده است که هرگونه تنش بر گیاه، مقدار ترکیبات فنلی را افزایش می‌دهد و وجود چنین ترکیباتی موجب کاهش استقرار میکروارگانیسم‌ها می‌شود (Salisbury and Ross, 1991). به نظر می‌رسد که گیاه در زمان تنش خشکی به علت تضعیف سیستم ایمنی، ترکیبات فنلی را افزایش می‌دهد (Ghorbani and Niakan, 2006). در این تحقیق کاربرد متانول ١٤ درصد تاثیر قابل توجهی بر افزایش میزان فنل کل داشت. به نظر می‌رسد که این حجم از متانول می‌تواند با افزایش ترکیبات آنتی‌اکسیدانی نظیر ترکیبات فنلی پاسخ مناسبی به تنش خشکی باشد به‌طوری‌که گیاه بتواند واکنش‌های دفاعی مناسبی را در برابر حمله میکروارگانیسم‌ها در پیش گیرد.

گزارش شده است تحت شرایط تنش خشکی، تجمع ترکیبات فنلی در گیاهان به میزان مقاومت آنها به خشکی بستگی دارد. همچنین تنش خشکی چه در ارقام مقاوم و چه در ارقام حساس به خشکی لوبیا تا ۱۳ روز پس از اعمال تیمار، تأثیری بر مقدار ترکیبات فنلی و فلاونوئیدها نخواهد گذاشت، اما پس از ۲۱ روز از اعمال تیمار خشکی، مقدار آن در گیاهان تحت شرایط تنش خشکی شدید افزایش ۱۰ واحدی را نشان داد. گیاهان لوبیا رشد یافته تحت شرایط تنش شدید خشکی، افزایش ۲۱ درصدی را در میزان پرولین نشان دادند (Rosales et al., 2011). در تریتیکاله، تنش خشکی باعث افزایش مقدار تولید ترکیبات فنلی در ارقام حساس شد، اما در ارقام مقاوم این تغییرات ناچیز بود این کاهش می‌تواند ناشی از تخریب این ترکیبات در اثر واکنش با ترکیبات اکسیداتیو در شرایط تنش خشکی باشد (Hura et al., 2007).

متانول محلول پاشی شده بر روی برگ توسط آنزیم متانول اکسیداز و با از دست دادن $2\ H^+$ به

فرمات (متانوئیک اسید) تبدیل می‌شود. فرمات در مرحله بعد و توسط آنزیم فرمات دهیدروژناز تبدیل به CO_2 و H^+ می‌شود (Nonomura and Benson, 1992) از طرف دیگر گزارش شده آنزیم پیرولین-5 کربوکسیلات سنتتاز (P5CS) در شرایط اسیدی بیشترین فعالیت را دارد (Yordanov et al., 2003). به نظر می‌رسد متانول با کاهش pH در گیاه منجر به افزایش فعالیت آنزیم پیرولین 5 - کربوکسیلات سنتتاز شده و در نهایت تجمع پرولین در برگ را خواهیم داشت. پرولین علاوه بر شرکت در تنظیم اسمزی، نقش‌های مهمی مانند حفاظت از سیستم‌های غشایی سلول،سمیت زدایی (Puritch and Barker, 1967) و تنظیم اسیدیته سیتوزول را نیز بر عهده دارد (Hare et al., 1998).

یکی از مهم‌ترین تغییرات ناشی از تنش خشکی در گیاهان زراعی، کاهش محتوای رطوبت نسبی برگ می‌باشد. در واقع این شاخص توانمندی گیاهان را در تحمل به تنش خشکی نیز نشان می‌دهد. در شرایط تنش خشکی میزان هدایت روزنه‌ای به‌طور معنی‌داری کاهش می‌یابد (Yordanov et al., 2001). به نظر می‌رسد با شدت یافتن تنش خشکی هدایت‌روزنه‌ای کاهش یافته و قدرت تثبیت کربن نیز کاهش یابد. همچنین احتمال دارد که با محدود شدن هدایت روزنه‌ای مقادیر بیشتر متانول بی‌تاثیر گردد. هر چند که مشخص شده است که متانول باعث افزایش هدایت روزنه‌ای، نیز می‌شود (Makhdum et al., 2002). اما در این تحقیق به نظر می‌رسد مقادیر مشخصی از متانول توانسته بر هدایت روزنه‌ای موثر باشد. Mirakhori و همکاران (۲۰۱۰) نشان دادند که با افزایش درصد متانول محلول پاشی شده تا ۲۱ درصد حجمی، محتوای رطوبت نسبی در گیاه سویا تحت تنش خشکی افزایش می‌یابد ولی در مقادیر بالاتر متانول (۲۸ و ۳۵ درصد حجمی)، محتوای رطوبت نسبی حتی کمتر از تیمار عدم محلول پاشی شده است. Safarazade Vishgahi (۲۰۰۷) نیز در بادام زمینی نتایج مشابهی بدست آوردند.

باکتری‌های همزیست مانند متیلوتروفیک روی برگ اکثر گیاهان زراعی زندگی می کنند که این باکتری‌ها در ازای دریافت متانول که از برگ گیاه خارج می‌شود پیش ماده ساخت بعضی از هورمون‌ها مانند اکسین و سیتوکینین را که نقش مهمی در تسریع روند رشد و فرآیندهای فیزیولوژیکی گیاه به عهده دارند را در اختیار گیاه قرار می‌دهند (Ivanova et al., 2001). به نظر می‌رسد محلول پاشی متانول با افزایش فعالیت باکتری‌های متیلوتروفیک منجر به افزایش تولید هورمون اکسین و سیتوکینین که در افزایش پروتئین سازی در گیاهان نقش بسزایی دارند منجر شده باشد (Ivanova et al., 2001). در آزمایشی بر روی بادام زمینی گزارش شد که محلول پاشی متانول منجر به افزایش مقدار پروتئین در گیاه شد (Vyshkayy et al., 2008). در این مطالعه نیز مقدار پروتئین کل محلول برگی در شرایط تنش افزایش معنی‌داری نسبت به شرایط بدون تنش داشت.

نتیجه‌گیری نهایی

آنچه از نتایج این تحقیق استنباط می‌شود کاربرد متانول در شرایط تنش خشکی موثر بوده و در شرایط تنش شدید کاربرد حجمی متانول ١٤ درصد بر صفات اندازه‌گیری شده در مقایسه با کاربرد متانول ۲۱ درصد حجمی علاوه بر مسائل زیست‌محیطی از نظر اقتصادی نیز می‌تواند مقرون به صرفه‌تر باشد. به‌طورکلی می‌توان نتیجه گرفت در این تحقیق متانول اثر مثبت و موثری بر صفات بیوشیمیایی مورد اندازه‌گیری شده سویا در شرایط تنش خشکی از طریق بهبود صفات فتوسنتزی، افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدانی و کاهش رادیکال‌های آزاد اکسیژن

داشته است که این می‌تواند منجر به افـزایش کـارایی مصرفی آب در شرایط کمبود آب باشد.

References

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.

Armand, N., Amiri, H. and Ismaili, A. (2016). The effect of methanol on photosynthetic parameters of bean (*Phaseolus vulgaris* L.) under water deficit. Photosynthetica. 54: 288-294.

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. 200: 535-546.

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.

Benson, A.A. (1951). Identification of ribulose in $14CO_2$ photosynthetic products. Journal American Chemical Society. 73: 2971-2.

Bettaieb, I., Hamrouni-Sellami, I., Bourgou, S., Limam, F. and Marzouk, B. (2010). Drought effects on polyphenol composition and antioxidant activities in aerial parts of *Salvia officinalis* L. Acta Physiologiae Plantarum. 33(4):1103-1111.

Boscaiu, M., Sanchez, M., Bautista, I., Donat, P., Lidon, A., Llinares, J., Llul, C., Mayoral, O. and Vicente, O. (2010). Phenolic compounds as stress markers in plants from gypsum habitats. Bulletin of University of Agricultural Sciences and Veterinary. 67: 44-49.

Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for quantitation of microgram of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry Quantities. 72: 248-254.

Chaves, M.M. (1991). Effects of water deficits on carbon assimilation. Journal of Experimental Botany. 42: 1-16.

Chaves, M.M. and Oliveira, M.M. (2004). Mechanisms underlying plant resilience to water deficits: Prospects for water-saving agriculture. Journal of Experimental Botany. 55: 2365-2384.

Downie, A., Miyazaki, S., Bohnert, H., John, P., Coleman, J., Parry, M. and Haslam, R. (2004). Expression profiling of the response of Arabidopsis thaliana to methanol stimulation. Phytochemistry. 65: 2305–2316.

Faver, K.L. and Gerik, T.J. (1996). Foliar-applied methanol effects on cotton(*Gossypium hirsutum* L.) gas exchange and growth. Field Crops Research. 47: 227–234.

Flexas, J. and Medrano, H. (2008). Drought-inhibition of photosynthesis in C3- plants: stomatal and nonstomatal limitation revisited. Annals of Botany. 183: 183-189.

Ghorbani, M. and Niakan, M. (2006). The effect of drought stress on soluble sugar, Total protein, proline, phenolic compound, chlorophyll content and rate reductase activity in Soybean (*Glycine max* L.cv.Gorgan3). Materials and Energy. 18(56):537-550

Gunes, A., Inal, A., Adak, M.S., Bagci, E.G., Cicek, N. and Eraslan, F. (2008). Effect of drought stress implemented at pre-or post-anthesis stage some physiological as screening criteria in chickpea cultivars. Russian Journal of Plant Physiology. 55: 59–67.

Haston, A.D. and Roje, S. (2001). One carbon metabolism in higher plants. Annual Reviw of Plant Biology. 52: 119-138.

Hare, P.D., Cress W.A. and Van Standen, J. (1998). Dissecting the rols of osmolyte accumulation during stress. Plant Cell Environment. 21: 535–553.

Hossinzadeh, S.R., Salimi, A., Ganjeali, A. and Ahmadpour, R. (2015). Effects of foliar application of methanol on biochemical characteristics and antioxidant enzyme activity of chickpea (*Cicer arietinum* L.) under drought stress. Plant Physiology and Biochemistry. 31(1):17-30.

Hosseinzadeh, S.R., Cheniany, M. and Salimi, A. (2014). Effects of foliar application of methanol on physiological characteristics of chickpea (*Cicer arietinum* L.) under drought stress. Iranian Journal of Pulses Research. 5(2):71-82.

Hsiao, T.C. (2000). Leaf and root growth in relation to water status. Horticultural Science. 35: 1051-1058.

Hura, T., Grzesiak, S., Hura, K., Thiemt, E., Tokarz, K. and Wedzony, M. (2007). Physiological and biochemical tools useful in drought-tolerance detection in genotypes of winter triticale: Accumulation of ferulic acid. Annals of Botany. 100: 767-775.

Ivanova, E.G., Dornina, N.V., Shepelyakovskaya, A.O., Laman, A.G., Brovko, F.A. and Trotsenko, Y.A. (2001). Faculative and obligate aerobic methylobacteria synthesize cytokinins. Journal of Microbiology. 69: 646-651.

Keles, Y. and Oncel, I. (2004). Growth and solute composition on two wheat species experiencing combined influence of stress conditions. Russian Journal of Plant Physiology. 51: 203-208.

Khafagi, O.M.A. and El-Lawendy, W.I. (1997). Effect of different irrigation intervals on sugar beet growth, plant water relations and photosynethetic pigments. Annals of Agricultural Science Moshtohor. 35: 305-319.

Khosravi, E., Mehrafarin, A., Naghdi Badi, H., Khosravi, M.T. and Hajiaghaee, R. (2012). The phytochemical response of lemon balm (*Melissa officinalis* L.) to methanol and ethanol hydroalcoholic solutions. New York City, International Congress on Natural Products Research (ICNPR). Planta Medthod. 11: 78 (P: 12).

Kumar, R.R. and Thomas, J. (2004). Physiological basis of cultivar characterization in tea (*Camellia* spp.). Journal Plant Crops. 32: 54-7.

Lichtenthaler, H.K. (1992). The Kaustky effect: 60years of chlorophyll fluorescence induction kinetics. Food Crops to Temperature and Water Stress, AVRDC, Shanhua, Taiwan, pp: 389-398.

Lu, Q., Lu, C., Zhang, J. and Kuang, T. (2002). Photosynthesis and chlorophyll a fluorescence during flag leaf senescence of field-grown wheat plants. Journal of Plant Physiology. 159: 1173-1178.

Makhdum, I. M., Nawaz, A., Shabab, M., Ahmad, F. and Illahi, F. (2002). Physiological response of Cotton to methanol foliar application. Pakistan Journal of Research Science. 13: 37-43.

Matta, A.J. and Giai, I. (1969). Accumulation of phenol in tomato plant is affected by different forms of *Fusarium oxysporum*. Planta Medica. 50: 512-513.

Mansourifar, C., Shaban, M., Ghobadi, M. and Sabaghpoor, S.H. (2012). Study of grain filling in chickpea cultivars under drought stress and N fertilizer. Iranian Journal of Field Crops Research. 10(3): 591-602.

Mirakhori, M., Paknejad, F., Ardakani, M.R., Moradi, F., Nazeri, P. and Nasri, M. (2010). Effect of methanol spraying on yield and yield components of soybean (*Glycine max* L.). Agroecology. 2(2): 236-244.

Mirakhori, M., Paknejad, F., Moradi, F., Ardakani, M.R., Nazeri, P. and Esmaeilpor Jahromi, M.E. (2010). Effect of drought stress and methanol on chlorophyll parameters, chlorophyll content and relative water content of Soybean (*Glycine max* L., var. L. 17). Iranian Journal of Field Crops Research. 8(3): 531-541.

Mohammadian, R., Rahimian, H., Moghaddam, M. and Sadeghian, S.Y. (2003). Effect of early drought stress on sugar beets chlorophyll fluorescence. Pakistan Journal of Biological Sciences. 6: 1763-1769.

Mudgett, M.E. and Clarke, S. (1993). Characterization of plant L-isoaspartyl methyltransferases that may be involved in seed survival. Journal of Biochemistry Research. 32: 1100-1111.

Munns, R. and Tester, M. (2008). Mechanisms of salinity tolerance. Annual Review of Plant Biology. 59: 651-681.

Nefedieva, E.E. (2003). The influence of impulse pressure on the phytohormone content, growth and crop productivity of buckwheat plants (*Fagopyrum esculentum* Moench. cv. Aromat). Pacific Journal of Science and Technology. 3:123–135.

Nonomura, A. M., and Benson, A. A. (1992). The path of carbon in photosynthesis: Improved crop yields with methanol. National Academy Science.89-98.

Ober, E. (2001). The search for drought tolerance in sugar beet. British Sugar Beet Review. 69: 40-43.

Ort, D.R. (2001). When there is too much light. Plant Physiology. 125: 29-32.

Puritch, G.S. and Barker, A.V. (1967). Structure and function of tomato leaf chloroplasts during ammonium toxicity. Journal of Plant Physiology. 42: 1229-1238.

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.

Ramirez, I., Dorta, F., Espinoza, V., Jimenez, E., Mercado, A. and Pen, H. (2006). Effects of foliar and root applications of methanol on the growth of arabidopsis, tobacco, and tomato plants. Plant and Soil. 289: 30-44.

Rasoli, F. (2011). Investigate effects of flooding stress on physiological characteristics, yield and yield components in rapeseed (*Brassica napuse*). M.Sc. Thesis, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources. (In Persian)

Rekha, R., Warrier, S., Lalitha, A. and Chellappan, S. (2014). A modified assay of carbonic anhydrase activity in tree species. Biochemistry and Biothechnology Reports. 3(1): 48-55.

Rosales, M.A., Ocampo, E., Rodríguez-Valentín, R., Olvera-Carrillo, Y., Acosta-Gallegos, J. and Covarrubias, A.A. (2012). Physiological analysis of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) cultivars uncovers characteristics related to terminal drought resistance. Plant Physiology and Biochemistry. 56: 24-34.

Safarazade Vishgahi, M.N., Nourmohamadi, G. and Magidi, H. (2007). Effect of methanol on peanut function and yield components. Iranian Journal of Agricultural Science. 38: 88-103.

Sagisaka, S. (1976). The occurrence of peroxide in a perennial plant *Populas gelrica*. Plant Physiology. 57: 308-309.

Salisbury, F.B. and Ross, C.B. (1991). Wadsworth publishing company belton California. Plant Physiology. 2: 316-321.

Shao, H.B., Chu, L.Y., Lu, Z.H. and Kang, C.M. (2008). Primary antioxidant free radical scavenging and redox signalling pathways in higher plant cells. International Journal Biology Science 4: 8-14.

Vyshkayy, M., Noormohammadi, Gh., Majidi, A. and Rabii, B. (2008). Effect of methanol on the growth with methanol function peanuts. Journal of Agricultural Sciences. 1: 102-87. (In Persian).

Yordanov, I., Tsonko, T., Velikova, V., Georgieva , K., Ivanov, P., Tsenov, N. and Petrova, T. (2001). Change in CO_2 assimilation, transpiration and stomatal resistance to different wheat cultivars expressing drought under field conditions. Bulgharestan Journal Plant Physiology. 27: 20-33.

Yordanov, I., Velikova, V. and Tsonev, T. (2003). Plant responses to drought and stress tolerance. Bulgharestan Journal of Plant Physiology. 2: 187-206.

Zbiec, I.I., Karczmarczyk, S. and Koszanski, Z. (1999). Influence of methanol on some cultivated plants. Department of Plant Production and Irrigation. Agricultural University of Szczecin Poland. 73: 217-220.