

تأثیر اسید سالیسیلیک بر تغییرپذیری روزنه و برخی صفات رویشی گیاه همیشه بهار (*Calendula officinalis* L.) در تنش شوری

فاطمه دهقان نیری^۱، وحیدرضا صفاری^{۲*} و علی اکبر مقصودی مود^۳
 ۱. دانشجوی سابق کارشناسی ارشد، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید باهنر کرمان
 ۲ و ۳. دانشیاران پژوهشکده باغبانی، دانشگاه شهید باهنر کرمان
 (تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۶/۱۵ - تاریخ تصویب: ۱۳۹۳/۹/۲۹)

چکیده

شوری یکی از عوامل مهم محیطی است که رشد گیاهان را محدود می‌کند. به منظور بررسی تأثیر اسید سالیسیلیک بر برخی صفات رویشی و تغییرپذیری روزنه گیاه همیشه بهار، آزمایشی به صورت فاکتوریل بر پایه طرح کامل تصادفی با پنج تکرار در گلخانه تحقیقاتی دانشگاه شهید باهنر کرمان در سال ۱۳۹۱ انجام شد. شوری به عنوان عامل اول با پنج سطح ۱، ۳، ۵، ۷ و ۹ میلی‌موس بر سانتی‌متر و اسید سالیسیلیک به عنوان عامل دوم با سه سطح ۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم بر لیتر در نظر گرفته شد. نتایج نشان داد که تنش شوری و اسید سالیسیلیک هر دو سبب کاهش طول و عرض روزنه برگ‌ها شدند. بالاترین سطح شوری، سبب کاهش وزن خشک اندام هوایی، ریشه و محتوای نسبی آب برگ‌ها به ترتیب به مقدار ۵۱، ۵۸ و ۲۴ درصد نسبت به شاهد شد. کاربرد اسید سالیسیلیک موجب بهبود این صفات در همه سطوح شوری شد. در بالاترین سطح شوری کاربرد محلول ۲۰۰ میلی‌گرم بر لیتر اسید سالیسیلیک، به ترتیب موجب افزایش ۲۴ و ۲۸ درصدی وزن خشک اندام هوایی و ریشه و محلول ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر سبب افزایش ۹ درصدی محتوای نسبی آب برگ نسبت به بدون کاربرد آن‌ها شد.

واژه‌های کلیدی: اسید سالیسیلیک، شوری، طول و عرض روزنه، محتوای نسبی آب، وزن خشک.

مقدمه

یکی از عوامل محدودکننده رشد، به‌ویژه در مناطق خشک و نیمه‌خشک، تنش شوری است که می‌تواند رشد و تولید گیاه را به شدت محدود کند (Rahdari & Hoseini, 2011). به گزارش سازمان خواروبار کشاورزی (فائو ۲۰۰۵) نزدیک به ۲۰ درصد زمین‌های جهان و نیز نیمی از اراضی فاریاب تحت تأثیر شوری هستند (Munns, 2005). جوانه‌زنی بذر، رشد دانهال، رشد رویشی، گلدهی و تشکیل میوه از جمله فرآیندهایی هستند که تحت تأثیر شوری آسیب می‌بینند (Rahdari & Hoseini, 2011). شوری آب

خاک به دو دلیل بازدارنده رشد گیاه می‌شود، اول اینکه تأثیر پدیده اسمزی سبب کاهش جذب آب به وسیله گیاه و بنابراین منجر به رشد کمتر گیاه می‌شود (Munns, 2005).

از سوی دیگر به علت تعرق تأثیر سمیت یون عامل شوری همراه جریان شیره خام سبب ورود یون‌های نمک به درون برگ و به‌طور کلی باعث جلوگیری از رشد می‌شود (Munns, 2005). یکی از ویژگی‌هایی که ممکن است رشد و عملکرد گیاه را افزایش دهد نگه‌داشتن تبادل‌های گاز در حد طبیعی است (Maghsoudi & Maghsoudi Moud, 2008).

همچون وزن تر و خشک اندام هوایی و ریشه در شرایط تنش ناشی از سمیت عنصر نیکل شده است (Idrees *et al.*, 2013). اسید سالیسیلیک باعث مقاومت بذر گندم به شوری و خشکی و در گوجه‌فرنگی و باقلا باعث تحمل به تنش سرما و گرما شد (Gunes *et al.*, 2007). پیش تیمار یونجه با اسید سالیسیلیک در تنش شوری باعث بهبود رشد گیاه شده است (Khan *et al.*, 2010). غلظت‌های کم اسید سالیسیلیک (۰/۵-۰/۵mM) تأثیر تنش‌ها را کاهش می‌دهد. کاربرد خارجی اسید سالیسیلیک بر فرآیندهای گوناگونی از جمله جوانه بسته‌تر شدن روزنه‌ها، جذب و انتقال یون‌ها، حفظ یکپارچگی غشا، نورساخت و سرعت رشد گیاه اثرگذار است (Aftab *et al.*, 2011).

گل همیشه بهار (*Calendula officinalis* L.) از خانواده Asteraceae گیاهی یک‌ساله، با گل‌های روشن و زرد است که برای هدف‌های دارویی، غذایی و زینتی استفاده می‌شود (Khalid & Teixeira de silva, 2010). هدف از این پژوهش بررسی تأثیر اسید سالیسیلیک و تنش شوری بر تغییرپذیری یاخته‌های روزنه و برخی صفات رشد گیاه همیشه بهار بود.

مواد و روش‌ها

این آزمایش در سال ۱۳۹۱ در گلخانه تحقیقاتی دانشکده کشاورزی دانشگاه باهنر کرمان در قالب فاکتوریل و به صورت طرح کامل تصادفی با پنج تکرار انجام شد. تیمارهای آزمایش شامل پنج سطح شوری (۱، ۳، ۵، ۷ و ۹ دسی زیمنس بر متر) و سه سطح اسید سالیسیلیک (۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم بر لیتر) بودند. خاک مورد استفاده حاوی خاک آبشویی شده بود. هر گلدان با قطر دهانه ۲۵/۵ سانتی‌متر و ارتفاع ۲۵ سانتی‌متر، با ۲۵۰۰ گرم خاک با عصاره ۱:۱ و هدایت الکتریکی ۱ میلی‌موس بر سانتی‌متر پر شد. این عصاره از مخلوط ۱۰۰ گرم خاک و ۱۰۰ سانتی‌مترمکعب آب مقطر که به مدت ۲۴ ساعت نگهداری شده بودند، تهیه شد. بذرها همیشه بهار در محیط کشت حاوی کوکوپیت و پرلایت کشت شدند تا به مرحله چهار برگی رسیده، سپس به گلدان‌های

اندازه‌گیری محتوی نسبی آب برگ یکی از روش‌های معمول برای تعیین وضعیت آبی گیاه است و از آنجایی که روزنه‌ها تعادل بین جریان خروجی و ورودی برگ را تنظیم می‌کنند، اندازه‌گیری محتوی نسبی آب برگ وضعیت روزنه‌ها را بهتر مشخص می‌کند (Sinclair & Ludlow, 1985). روزنه‌ها دروازه‌های اصلی برای تبادل گاز در برگ‌ها (Ewers & Oren, 2000) و محل ورود گاز کربنیک به گیاه هستند (Condon *et al.*, 2004). یاخته‌های نگهبان، یاخته‌هایی بسیار تخصصی‌اند که بین آن‌ها منافذی به نام روزنه به وجود می‌آید (Zhu *et al.*, 2009). با تغییر در شرایط محیطی یاخته‌های نگهبان می‌توانند به سرعت تغییر شکل داده و سبب باز و بسته شدن روزنه شوند، که به این صورت تبادل‌های گاز و تعرق کنترل می‌شود (Zhu *et al.*, 2009). اندازه روزنه‌ها به‌طور معمول در پاسخ به عامل‌های محیطی و درونی تغییر کرده و این باعث می‌شود مقدار تعرق و گاز کربنیک جذب شده تغییر یابد (Condon *et al.*, 2004). سرعت طبیعی تبادل‌های گازی باعث حفظ سرعت نورساخت (فتوسنتز) و در نتیجه رشد و عملکرد مناسب می‌شود (Maghsoudi & Maghsoudi Moud, 2008). بررسی‌ها نشان داده است که بیش از ۹۵ درصد آب ورودی به گیاه به وسیله تعرق روزنه‌ای از دست می‌رود (Jianwu *et al.*, 2006). برای تولید محصول بیشتر در شرایط خشکی روزنه‌ها باید به اندازه‌ای باز باشند، تا هم جذب گاز کربنیک صورت بگیرد و هم هدر رفت آب با برگ‌ها به کمینه برسد (Ainsworth & Rogers, 2007). اسید سالیسیلیک یک پیام‌آور شیمیایی است که نقش آن در سازوکارهای دفاعی گیاهان به‌خوبی به اثبات رسیده است (Gunes, 2005). نقش اسید سالیسیلیک در تحمل گیاهان به تنش‌های زنده^۱ همچون حمله حشرات و قارچ‌ها و غیرزنده^۲ همچون خشکی، سرما، گرما (Saidi *et al.*, 2013)، شوری (Gunes *et al.*, 2007) و فلزهای سنگین گزارش شده است (Saidi *et al.*, 2013). تیمار گیاه پروانش با اسید سالیسیلیک باعث بهبود صفات رشدی

دستمال کاغذی به مدت چهار ساعت در تاریکی قرار گرفته و به حالت اشباع رسیده و وزن اشباع آن‌ها اندازه‌گیری شد (SW). نمونه‌ها آنگاه درون پاکت‌های کاغذی در دمای ۸۵ درجه سلسیوس به مدت ۲۴ ساعت خشک شده و توزین شدند (DW). محتوای آب نسبی از معادله زیر به دست آمد:

$$\% \text{RWC} = \frac{\text{FW}-\text{DW}}{\text{SW}-\text{DW}} \times 100$$

که در آن RWC: محتوای آب نسبی، FW: وزن تر برگ، DW: وزن خشک برگ و SW: وزن اشباع برگ هستند.

شاخص سبزینه (کلروفیل) به وسیله سبزینه‌سنج دستی (SPAD-502) اندازه‌گیری و ثبت شد. اندازه‌گیری سبزینه در هر گلدان روی دو برگ انجام شد.

داده‌ها برابر مدل آزمایش فاکتوریل در پایه طرح کامل تصادفی توسط نرم‌افزارهای SAS و MSTAT-C تجزیه واریانس شدند. مقایسه میانگین‌ها نیز با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۵ درصد انجام شد. نمودارها با استفاده از نرم‌افزار MS-Excel ترسیم شدند.

نتایج و بحث

نتایج به دست آمده از این پژوهش نشان داد که شوری بر همه صفات اندازه‌گیری شده اثر معنی‌داری داشت. اسید سالیسیلیک نیز در همه صفات اندازه‌گیری شده معنی‌دار بود. اثر متقابل شوری و اسید سالیسیلیک تنها در وزن خشک اندام هوایی، وزن خشک ریشه، طول روزنه روی برگ و محتوای رطوبت نسبی برگ معنی‌دار شد (جدول ۱).

وزن خشک اندام هوایی و ریشه

نتایج به دست آمده نشان داد که تأثیر شوری، اسید سالیسیلیک و تأثیر متقابل آن‌ها بر وزن خشک اندام هوایی و ریشه در سطح ۱ درصد معنی‌دار شد (جدول ۱). افزایش سطوح شوری با کاهش وزن خشک اندام هوایی و ریشه همراه بود. به گونه‌ای که در بیشترین سطح شوری (۹ میلی‌موس بر سانتی‌متر) وزن خشک اندام هوایی و ریشه به ترتیب حدود ۵۱ و ۵۸ درصد نسبت به شاهد کاهش پیدا کرد (شکل‌های ۱ و ۲).

اصلی انتقال داده شدند. در طول دوره رشد گلدان‌ها تنها با آب مقطر آبیاری شدند. برای اعمال شوری مقدار درصد رطوبت در حد ظرفیت زراعی (Fc) خاک حفظ شد (۱۸ درصد). آنگاه مقادیر نمک کلرید سدیم لازم برای تهیه محلول تا هدایت الکتریکی مورد نظر محاسبه و در آب مقطر حل و به گلدان‌ها طی سه مرحله اضافه شد. مقادیر نمک کاربردی برای غلظت‌های ۱، ۳، ۵، ۷ و ۹ میلی‌موس بر سانتی‌متر به ترتیب ۰/۶۴، ۱/۹۲، ۳/۲، ۵/۶ و ۷/۲ گرم بر لیتر بود.

محلول پاشی اسید سالیسیلیک با غلظت ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم بر لیتر، یک هفته پس از تیمار شوری (Bayat et al., 2012) در اوایل صبح، روی اندام هوایی انجام شده و پس از ده روز بار دیگر تکرار شد. در پایان، حدود شصت روز پس از انتقال نشا، بوته‌ها با دقت از گلدان‌ها خارج و خاک اطراف ریشه‌ها شسته و سپس به آزمایشگاه انتقال داده شدند. پس از جدا کردن اندام هوایی و ریشه آن‌ها، به مدت ۴۸ ساعت در آون در دمای ۷۰ درجه سلسیوس خشک و وزن خشک آن‌ها ثبت شد.

برای اندازه‌گیری طول و عرض روزنه‌ها و عرض یاخته‌های نگهبان، بیست روز پس از محلول‌پاشی نمونه‌برداری از روپوست (اپیدرم) بوته‌های در حال رشد انجام شد. نمونه‌های برگ‌گی از موقعیت یکسان در هر گیاه انتخاب و لایه‌ای نازک از لاک شفاف که با استون رقیق شده بود روی سطح آن‌ها کشیده شد، این لایه پس از خشک شدن، با استفاده از نوارچسب شفاف از برگ جدا و روی لام قرار داده شد. این کار موجب شد که تصویر روپوست برگ روی چسب نواری انتقال یابد. اسلاید آماده شده توسط میکروسکوپ نوری با بزرگنمایی $40 \times 10 \times X$ مشاهده شد. برای اندازه‌گیری طول روزنه‌ها از یک عدسی چشمی مجهز به میکرومتر استفاده شده و اندازه روزنه‌ها در مساحت 0.234 mm^2 از سطح برگ اندازه‌گیری شد.

برای اندازه‌گیری محتوای آب نسبی (RWC)، یک قطعه ۴ سانتی‌متر مربع از برگ هر بوته را جدا و بی‌درنگ توسط ترازوی دیجیتال (LIBRORAEL-40SM) و با دقت ۰/۰۰۱ گرم توزین (FW) شده و سپس در پتری دیش حاوی آب مقطر بین دو لایه

جدول ۱. تجزیه واریانس صفات مختلف بوته‌های همیشه بهار رشد یافته تحت تأثیر سطوح مختلف شوری

Table 1. Analysis of variance of different traits of calendula plants grown under different levels of salinity

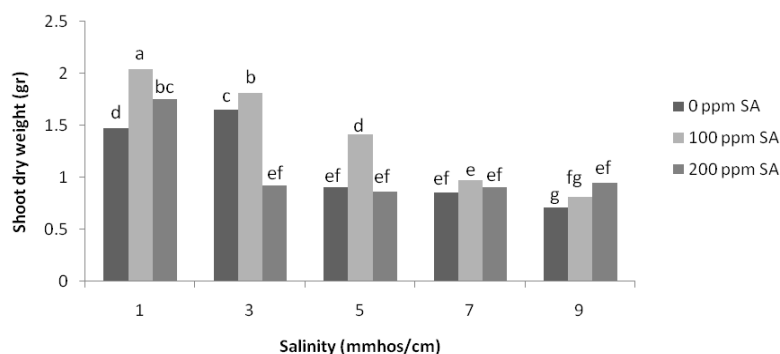
| SOV | df | RWC | Width of guard cells under leaves | Width of stomata under leaves | Length of stomata under leaves | Width of guard cells on leaves | Width of stomata on leaves | Length of tomata on leaves | Root dry weight | Shoot dry weight |
|---------------------------|----|-----------|-----------------------------------|-------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|----------------------------|----------------------------|-----------------|------------------|
| Salinity | 4 | 1029.54** | 0.67** | 7.6** | 19.43** | 4.5** | 2.63** | 13.32** | 2.33** | 4.7** |
| Salicylic acid | 2 | 437.79** | 2.86** | 2.46** | 4.92** | 0.82* | 2** | 3.88** | 0.84** | 2.75** |
| Salinity × Salicylic acid | 8 | 22.65* | 0.06 ^{ns} | 0.11 ^{ns} | 0.11 ^{ns} | 0.05 ^{ns} | 0.32 ^{ns} | 0.48* | 0.31** | 0.51** |
| Error | 60 | 14.04 | 0.01 | 0.21 | 0.34 | 0.17 | 0.18 | 0.21 | 0.01 | 0.05 |
| CV | - | 5.23 | 14.99 | 19.02 | 8.21 | 20 | 16.25 | 7.06 | 10.99 | 15.24 |

ns و **: غیر معنی‌دار، معنی‌دار در سطح ۵ درصد و معنی‌دار در سطح ۱ درصد.

ns, * and ** non significant, significant at 5% and significant at 1% , respectively.

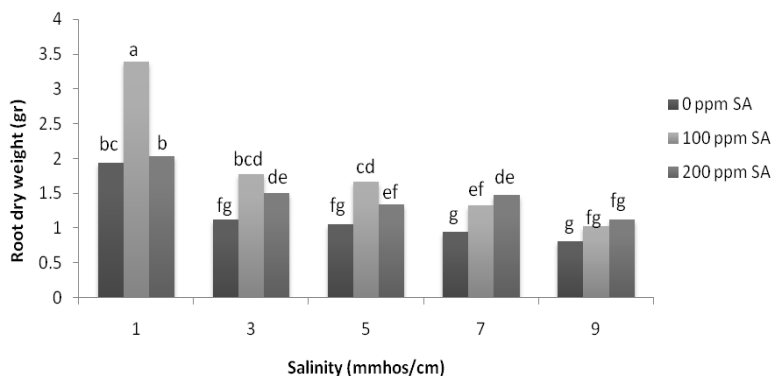
می‌یابد (Wang *et al.*, 2001). کاربرد اسید سالیسیلیک به صورت محلول پاشی سبب افزایش وزن خشک اندام هوایی و ریشه شد. کاربرد غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر اسید سالیسیلیک همراه با بیشترین غلظت شوری به ترتیب سبب افزایش ۱۲ و ۲۱ درصدی وزن خشک اندام هوایی و ریشه نسبت به شاهد شد. غلظت ۲۰۰ میلی‌گرم بر لیتر اسید سالیسیلیک نیز سبب افزایش وزن خشک اندام هوایی و ریشه به ترتیب حدود ۲۴ و ۲۸ درصد نسبت به شاهد شد (شکل‌های ۱ و ۲).

یکی از شاخص‌های رشد گیاه نسبت ریشه به اندام هوایی است که گیاهان به طور معمول این نسبت را در یک سطح معین ثابت نگه می‌دارند. شوری باعث کاهش رشد اندام هوایی و ریشه می‌شود. در بیشتر موارد رشد اندام هوایی نسبت به ریشه افزایش می‌یابد (Wang *et al.*, 2001). نتایج به دست آمده از این پژوهش نیز نشان داد که وزن خشک ریشه در مقایسه با وزن خشک اندام هوایی کاهش بیشتری داشته است. به نظر می‌رسد در اثر شوری فرآورده‌های کربن‌گیری به اندام هوایی کاهش



شکل ۱. مقایسه میانگین وزن خشک اندام هوایی در برهمکنش تأثیر شوری و اسید سالیسیلیک

Figure 1. Mean Comparison of interaction effects of salinity and salicylic acid on shoot dry weight



شکل ۲. مقایسه میانگین وزن خشک ریشه در برهمکنش تأثیر شوری و اسید سالیسیلیک

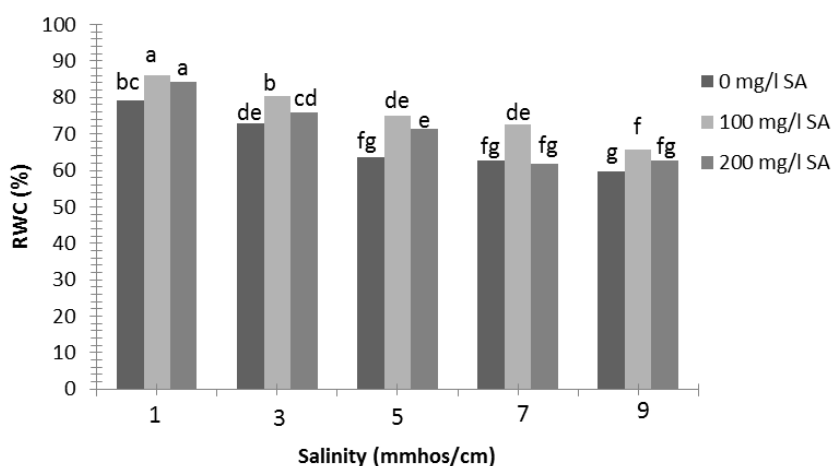
Figure 2. Mean Comparison of interaction effects of salinity and salicylic acid on root dry weight

همچنین کاربرد محلول پاشی برگ ۲۰۰ میکرومولار اسید سالیسیلیک رشد گل آفتابگردان را بهبود بخشید و تأثیر شوری را کاهش داد (Noreen & Ashraf, 2008). در ارزیابی غلظت ۰/۱-۰/۳ میلی مولار محلول پاشی اسید سالیسیلیک در شرایط شوری نیز سبب بهبود صفات رویشی شد (Enteshari & Sharifian, 2012).

محتوای نسبی آب برگ

نتایج به دست آمده از این پژوهش نشان داد که تأثیر ساده شوری و اسید سالیسیلیک در سطح ۱ درصد بر محتوای نسبی آب معنی دار بود و تأثیر متقابل شوری و اسید سالیسیلیک در سطح ۵ درصد معنی دار شد (جدول ۱). در بالاترین سطح شوری محتوای نسبی آب ۲۴ درصد نسبت به شاهد کاهش یافت (شکل ۳). کاربرد اسید سالیسیلیک سبب بهبود محتوای نسبی آب شد. به طوری که در بیشترین غلظت شوری کاربرد غلظت ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی گرم بر لیتر اسید سالیسیلیک سبب افزایش محتوای نسبی آب به ترتیب حدود ۹ و ۴ درصد نسبت به شاهد شد (شکل ۳).

بیشترین وزن خشک اندام هوایی ۲/۰۴ گرم بود که در شوری ۱ میلی موس بر سانتی متر برابر با کاربرد ۱۰۰ میلی گرم بر لیتر اسید سالیسیلیک دیده شد و کمترین مقدار وزن خشک اندام هوایی در شوری ۹ میلی موس بر سانتی متر و بدون کاربرد اسید سالیسیلیک، ۰/۷۱ گرم مشاهده شد (شکل ۱). بیشترین وزن خشک ریشه در شوری ۱ میلی موس بر سانتی متر با کاربرد ۱۰۰ میلی گرم بر لیتر اسید سالیسیلیک، ۳/۳۹ گرم و کمترین وزن خشک ریشه در شوری ۹ میلی موس بر سانتی متر و بدون کاربرد اسید سالیسیلیک، ۰/۸۱ گرم بود (شکل ۲). این نتایج با داده‌های Bayat *et al.* (2012) در گیاه همیشه بهار و تنش شوری با غلظت ۲۰۰-۱۰۰ میلی مولار و کاربرد اسید سالیسیلیک به صورت محلول پاشی با غلظت ۱-۲ میلی مولار همخوانی داشت. بهبود صفات رویشی تحت شرایط شوری با تیمار اسید سالیسیلیک در ریحان (Fatemi & Aboutalebi, 2012)، در گیاه یونجه (Palma *et al.*, 2013)، ماش (Khan *et al.*, 2010) و در گیاه درمنه نیز گزارش شده است (Aftab *et al.*, 2011).



شکل ۳. مقایسه میانگین محتوای نسبی آب برگ در برهمکنش تأثیر متقابل شوری و اسید سالیسیلیک

Figure 3. Mean Comparison of interaction effects of salinity and salicylic acid on Relative water content (RWC)

کاربرد غلظت ۱۰۰ میلی گرم بر لیتر اسید سالیسیلیک ۸۶/۰۲ بود که با غلظت ۲۰۰ میلی گرم بر لیتر اسید سالیسیلیک از لحاظ آماری تفاوت معنی داری نداشت (شکل ۳). با توجه به اینکه یکی از آثار تنش شوری جلوگیری از جذب آب و ایجاد تنش خشکی است،

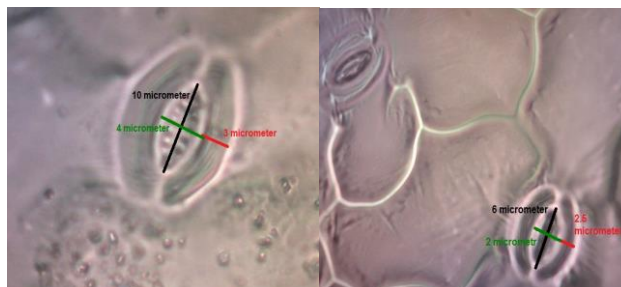
تأثیر متقابل شوری و اسید سالیسیلیک نیز به گونه‌ای بود که کمترین درصد محتوای نسبی در شوری ۹ میلی موس بر سانتی متر و بدون استفاده از اسید سالیسیلیک ۵۹/۶۷ بود و بیشترین درصد محتوای نسبی آب در شوری ۱ میلی موس بر سانتی متر و با

سالیسیلیک، سبب بهبود محتوای آب نسبی در دانه‌های ذرت، هم در شرایط شوری و هم در گیاهان بدون اعمال شوری شد. همچنین تأثیر مثبت اسید سالیسیلیک در گندم (Agarawal *et al.*, 2005)، جو (El-Tayeb, 2005) در تنش شوری گزارش شده است.

صفات روزنه‌ای

نتایج به‌دست‌آمده از تجزیه واریانس نشان داد که تأثیر ساده شوری و اسید سالیسیلیک بر طول و عرض روزنه روی برگ، طول و عرض روزنه زیر برگ و عرض یاخته نگیهان رو و زیر برگ معنی‌دار شد (جدول ۱).

می‌توان علت کاهش محتوای رطوبت نسبی را کاهش پتانسیل آب برگ و کاهش جذب آب از ریشه‌ها در شرایط خشک دانست (Colom & Vazzana, 2003). افزایش محتوای نسبی آب توسط اسید سالیسیلیک و مشتقات آن می‌تواند به دلیل نقش اسید سالیسیلیک در افزایش توان سامانه دفاعی پاداکسندگی (آنتی‌اکسیدانی)، کاهش تنش اکسایشی (اکسیداتیو)، افزایش همبستگی و پایداری غشا و تعدیل و تنظیم اسمزی از راه افزایش مقدار پتاسیم به‌عنوان یون بسیار مهم در حفظ فشار آماس (تورژانس) یاخته‌ای باشد (Bandurska & Stroinski, 2005; Korkmaz *et al.*, 2007). کاربرد اسید



شکل ۴. تصویر روزنه در سطح زیر برگ در بوته‌های همیشه بهار در معرض شوری ۱ میلی‌موس بر سانتی‌متر (چپ) و در شوری ۹ میلی‌موس بر سانتی‌متر (راست)

Figure 4. Image of stomata in calendula plant under leaves exposed to salinity of 1 mmhos/cm (left) and 9 mmhos/cm (right)

جدول ۲. مقادیر میانگین صفات مربوط به روزنه‌های برگ گیاه همیشه بهار در شرایط متفاوت تنش شوری

Table 2. The mean values of traits related to calendula plant leaves stomata in different conditions of salinity

| Salt Concentration (mmhos/cm) | width of guard cells under leaves (μm) | width of stomata under leaves (μm) | Length of stomata under leaves (μm) | width of guard cells on leaves (μm) | width of stomata on leaves (μm) | Length of stomata on leaves (μm) |
|-------------------------------|---|---|--|--|--|---|
| 1 | 2.33 ^{a*} | 3.3 ^a | 8.83 ^a | 2.56 ^a | 3.1 ^a | 7.4 ^a |
| 3 | 2.3 ^a | 3.06 ^a | 7.56 ^b | 2.53 ^a | 2.8 ^a | 7.16 ^a |
| 5 | 1.2 ^a | 2.16 ^b | 7.13 ^c | 2.16 ^b | 2.8 ^a | 6.8 ^b |
| 7 | 1.2 ^a | 1.2 ^b | 6.63 ^d | 1.63 ^c | 2.4 ^b | 5.66 ^c |
| 9 | 1.8 ^b | 1.6 ^c | 5.76 ^e | 1.33 ^c | 2 ^c | 5.26 ^d |

* وجود حروف همسان پس از مقادیر میانگین در هر ستون نشان می‌دهد که تیمارها اختلاف معنی‌داری در سطح ۵ درصد ندارند.

* Similar letters after the mean values in each column indicate that treatments no significant differences in level of 5%.

عرض یاخته نگیهان رو و زیر برگ نیز با افزایش سطوح شوری کاهش پیدا کرد. باز و بسته شدن منافذ روزنه به‌واسطه فشار آماس و تغییر حجم یاخته‌های نگیهان صورت می‌گیرد، که در طی تجمع مواد فعال اسموتیک، روزنه‌ها باز و هنگام کم شدن این مواد روزنه‌ها بسته می‌شوند (Xue *et al.*, 2008). تنش شوری به دلیل بر هم زدن تعادل سوخت‌وسازی (متابولیکی)، کمبود مواد کانی و تنش اسمزی سبب بسته شدن روزنه‌ها می‌شود (Pardia & Dos, 2005). تغییرات زیادی در

تأثیر متقابل شوری و اسید سالیسیلیک تنها روی طول روزنه روی برگ در سطح ۵ درصد معنی‌دار شد. طول و عرض روزنه رو و زیر برگ با افزایش سطوح شوری کاهش پیدا کرد. طول و عرض روزنه روی برگ در بیشترین سطح شوری (۹ میلی‌موس بر سانتی‌متر) به ترتیب ۲۸ و ۳۵ درصد نسبت به شاهد کاهش پیدا کرد (جدول ۲). طول و عرض روزنه زیر برگ نیز در بیشترین سطح شوری (۹ میلی‌موس بر سانتی‌متر) به ترتیب ۳۴ و ۵۱ درصد کاهش پیدا کرد.

پژوهش‌های چندی نشان دادند که اسید سالیسیلیک سبب بسته شدن منافذی که از دو یاخته نگهبان، واقع در روپوست برگ تشکیل شده است، می‌شود و به‌نوبه خود باعث کاهش از دست رفتن آب از راه جریان تعرق می‌شود (Dong *et al.*, 2001). تأثیر متقابل شوری و اسید سالیسیلیک بر طول روزنه روی برگ نشان داد که بیشترین طول روزنه روی برگ ۸/۳ میکرومتر در شوری ۱ میلی‌موس بر سانتی‌متر و کمترین مقدار آن ۵/۱ میکرومتر در شوری ۹ میلی‌موس بر سانتی‌متر با کاربرد غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر اسید سالیسیلیک بود (شکل ۵). اسید سالیسیلیک با بهبود بخشیدن نگهداری آب و افزایش بسته شدن روزنه‌ها سبب مقاومت به تنش اسمزی ناشی از شوری می‌شود (Miura & Tada, 2014). هنگامی که گیاه در شرایط تنش خشکی قرار می‌گیرد، روزنه‌ها بسته می‌شوند، بسته شدن روزنه‌ها در شرایط خشکی توسط اسید آسبزیک صورت می‌گیرد. به‌نظر می‌رسد نقش اسید آسبزیک در جلوگیری از باز بودن روزنه‌ها به دلیل افزایش نفوذپذیری غشای پلاسمایی یاخته نگهبان به کلسیم است. کلسیم پس از ورود به یاخته نگهبان به‌عنوان پیام‌آور ثانویه سبب تنظیم ورود و خروج یون‌ها و کم کردن فشار آماس یاخته نگهبان و بسته شدن روزنه‌ها می‌شود (Lee, 1998). اسید سالیسیلیک با تأثیر روی ورود و خروج یون و افزایش نفوذپذیری غشا بر بسته شدن روزنه‌ها اثر می‌گذارد (Lee, 1998). تأثیر اسید سالیسیلیک خارجی به عامل‌های مختلفی از جمله گونه گیاهی، مرحله نمو گیاه، روش کاربرد، غلظت مورداستفاده و سطح اسید سالیسیلیک درون گیاه بستگی دارد. غلظت‌های اسید سالیسیلیک سبب ایجاد تنش اکسایشی می‌شود که گیاه قادر به برطرف کردن آن نبوده و منجر به مرگ گیاه می‌شود (Horvath *et al.*, 2007).

ریخت (مرفولوژی) و آناتومی گیاهانی که در خاک شور رشد می‌کنند ایجاد می‌شود. سطوح شوری بالا سبب تغییرپذیری در شاخص روزنه، ضخامت برگ، شمار روزنه، عرض روزنه (Cavusoglu *et al.*, 2008) و کاهش طول و بسته شدن روزنه‌ها می‌شود (Ren & Wang, 2010). Lee (1998) گزارش کرد محلول پاشی برگساره‌ای اسید سالیسیلیک در گیاه کاملینا (*Commelina communis*) سبب بسته شدن روزنه‌ها شد. در گیاه خیار نیز غلظت‌های متفاوت اسید سالیسیلیک سبب کاهش منافذ روزنه و هدایت روزنه‌ای شد (Hao *et al.*, 2011).

در این پژوهش عرض یاخته نگهبان رو و زیر برگ نیز در بیشترین سطح شوری (۹ میلی‌موس بر سانتی‌متر) به ترتیب حدود ۴۸ و ۲۲ درصد نسبت به شاهد کاهش پیدا کرد (جدول ۲). در گزارش‌های دیگر نیز غلظت ۱۰۰ میلی‌مولار NaCl باعث کاهش طول و عرض روزنه در لوبیا شد (Kaymakanova *et al.*, 2009). بسته شدن روزنه‌ها در شرایط شوری در رزماری (Kiarostami *et al.*, 2010) و تاج خروس (*Amaranthus tricolor* L.) (Ren & Wang, 2010) نیز گزارش شده است. نتایج این پژوهش نشان داد که کاربرد اسید سالیسیلیک باعث کاهش طول و عرض روزنه رو و زیر برگ و عرض یاخته نگهبان رو و زیر برگ شد. کاربرد غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر اسید سالیسیلیک، طول و عرض روزنه روی برگ و طول و عرض روزنه زیر برگ را به ترتیب ۱۱، ۱۶، ۲۱ و ۲۱ درصد نسبت به شاهد کاهش داد (جدول ۳). عرض یاخته نگهبان رو و زیر برگ نیز با کاربرد غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر اسید سالیسیلیک به ترتیب ۱۵ و ۲۶ درصد نسبت به شاهد کاهش پیدا کرد (جدول ۳). با توجه به نتایج غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر اسید سالیسیلیک سبب بسته شدن بیشتر روزنه‌ها شد.

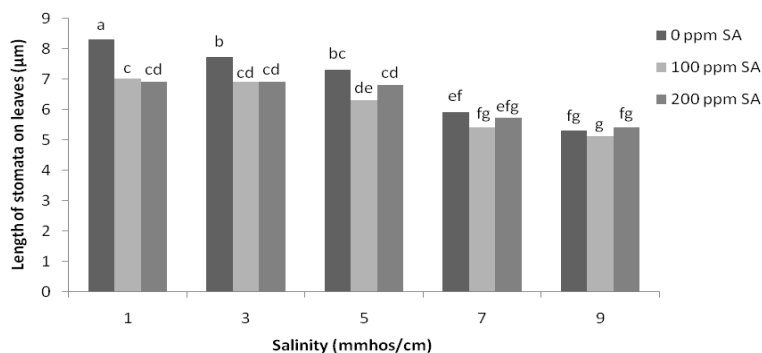
جدول ۳. مقادیر میانگین صفات مربوط به روزنه‌های برگ گیاه همیشه بهار با کاربرد اسید سالیسیلیک

Table 3. The mean values of traits related to calendula plant leaves stomata with application of Salicylic acid

| Salicylic acid (ppm) | width of guard cells under leaves (μm) | width of stomata under leaves (μm) | Length of stomata under leaves (μm) | width of guard cells on leaves (μm) | width of stomata on leaves (μm) | Length of stomata on leaves (μm) |
|----------------------|---|---|--|--|--|---|
| 0 | 2.5 ^{a*} | 2.8 ^a | 7.66 ^a | 2.18 ^a | 2.96 ^a | 6.9 ^a |
| 100 | 1.84 ^c | 2.2 ^b | 6.78 ^c | 1.84 ^b | 2.46 ^b | 6.14 ^b |
| 200 | 2.04 ^b | 2.34 ^b | 7.12 ^b | 2.12 ^a | 2.48 ^b | 6.34 ^b |

* وجود حروف همسان پس از مقادیر میانگین در هر ستون نشان می‌دهد که تیمارها اختلاف معنی‌داری در سطح ۵ درصد ندارند.

* Similar letters after the mean values in each column indicate that treatments no significant differences in level of 5%.



شکل ۵. مقایسه میانگین طول روزنه روی برگ در برهمکنش تأثیر متقابل شوری و اسید سالیسیلیک

Figure 5. Mean Comparison of interaction effects of salinity and salicylic acid on Length of stomata on leaves

رشد شود. نتایج نشان داد که کاربرد اسید سالیسیلیک با تعدیل روند کوچک شدن منافذ روزنه رو و زیر برگ در این شرایط بازدارنده آسیب‌های بیشتر به برگ و گیاه شد و توانایی بالقوه این هورمون گیاهی را در رویارویی با عارضه‌های ناشی از تنش شوری در این گیاه و گیاهان همسان نشان داد.

نتیجه‌گیری کلی

شوری به دلیل ایجاد خشکی فیزیولوژیکی و کاهش آب در دسترس گیاه سبب کم شدن محتوای نسبی آب در گیاه همیشه بهار می‌شود. کوچک شدن منافذ روزنه در اثر تنش شوری در این گیاه نیز می‌تواند سبب کاهش تبادل‌های گازی، کاهش نورساخت و

REFERENCES

- Aftab, T., Masroor, M., Khan, A., Teixeira Da silva, J. A., Idrees, M., Naeem, M. & Moinuddin. (2011). Role of Salicylic Acid in Promoting Salt Stress Tolerance and Enhanced Artemisinin Production in *Artemisia annua* L.. *Journal of Plant Growth Regulators*, 30, 425-435.
- Agarawal, S., Sairam, R. K., Srivasta, G. C. & Meena, R. C. (2005) Changes in antioxidant enzymes activity and oxidative stress by abscisic acid and salicylic acid in wheat genotypes. *Biologia Plantarum*, 49, 541-550.
- Ainsworth, E. A. & Rogers, A. (2007). The response of photosynthesis and stomatal conductance to rising [CO₂]: mechanisms and environmental interactions. *Plant, Cell and Environment*, 30, 258-270.
- Bandurska, H. & Stroinski, A. (2005). The effect of salicylic acid on barley response to water deficit. *Acta Physiologiae Plantarum*, 27, 379-386.
- Bayat, H., Alirezaie, M. & Neamati, H. (2012). Impact of exogenous salicylic acid on growth and ornamental characteristics of calendula (*Calendula officinalis* L.) under salinity stress. *Journal of stress Physiology & Biochemistry*, 8(1), 258-267.
- Cavusoglu, K., Kilic, S. & Kabar, K. (2008). Effects of Some Plant Growth Regulators on Leaf Anatomy of Radish Seedlings Grown Under Saline Conditions. *Journal of Applied Biological Sciences*, 2 (2), 47-50.
- Colom, M. R. & Vazzana, C. (2003). Photosynthesis and PSII functionality of drought resistant and droughtsensitive weeping lovegrass plants. *Environmental and Experimental Botany*, 49, 135-144.
- Condon, A. G., Richards, R. A., Rebetzek, G. J. & Farquhar, G. D. (2004). Breeding for high water use efficiency. *Experimental Botany*, 55, 2447-2460.
- Dong, F. C., Wang, P. T. & Song, C. P. (2001). The role of hydrogen peroxide in salicylic acid-induced stomatal closure in *Vicia faba* guard cells. *Acta Physiologiae Sinica*, 27, 296-302.
- El-Tayeb, M. A. (2005). Response of barley grain to the interactive effect of salinity and salicylic acid. *Plant Growth Regulation*, 42, 215-224.
- Enteshari, Sh. & Sharifian, Sh. (2012). Influence of salicylic acid on growth and some biochemical parameters in a C₄ plant (*Panicum miliaceum* L.) under saline conditions. *African Journal of Biotechnology*, 11(3), 621-627.
- Ewers, B. E. & Oren, R. (2000). Analyses of assumptions and errors in the calculation of stomatal conductance from sap flux measurements. *Tree Physiology*, 20, 579-589.
- Fatemi, R. & Aboutalebi, A. (2012). Evaluation the interaction of salinity and salicylic acid on Sweet basil (*Ocimum basilicum*) properties. *Annals of Biological Research*, 3(11), 5106-5109.

14. Gonzalez, L. & Gonzalez-Vilar, M. (2003). Determination of relative water content. In: J. Manuel and R. Goger (Eds). *Handbook of plant ecophysiology techniques*. (pp.207-212.) Kluwer Academic Publishers, London.
15. Gunes, A., Inal, A., Alpaslan, M., Cicek, N., Guneri, E., Eraslan, F. & Guzelordu, T. (2005). Effects of exogenously applied salicylic acid on the induction of multiple stress tolerance and mineral nutrition in maize (*Zea mays* L.). *Archives of Agronomy and Soil Science*, 51(6), 687-695.
16. Gunes, A., Inal, A., Alpaslan, M., Eraslan, F., Guneri Bagci, E. & Cicek, N. (2007). Salicylic acid induced changes on some physiological parameters symptomatic for oxidative stress and mineral nutrition in maize (*Zea mays* L.) grown under salinity. *Journal of Plant Physiology*, 164, 728-736.
17. Hao, J. H., Wang, X. L., Dong, C. J., Zhang, Z. G. & Shang, Q. M. (2011). Salicylic acid induces stomatal closure by modulating endogenous hormone levels in cucumber cotyledons. *Russian Journal of Plant Physiology*, 58(5), 906-913.
18. Horvath, E., Szalai, G. & Janda, T. (2007). Induction of abiotic stress tolerance by salicylic acid signaling. *Journal of Plant Growth Regulation*, 26, 290-300.
19. Idress, M., Naeem, M., Aftab, T., Masroor, M., Khan, A. & Moinuddin. (2013). Salicylic acid restrains nickel toxicity, improves antioxidant defence system and enhances the production of anticancer alkaloids in *Catharanthus roseus* (L.). *Journal of Hazardous Materials*, 252-253, 367-374.
20. Jianwu, T., Paul, V. B., Brent, E. E., Ankur, R. D. & Kenneth, J. D. (2006). Sap-flux-upscaled canopy transpiration, stomatal conductance and water use efficiency in an old growth forest the GreatLakes region of the United States. *Journal of Geophysical Research-Biogeosciences*, 111-117.
21. Kaymakanova, M., Stoeva, N. & Mincheva, T. (2009). Salinity and its effects on the physiological response of bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Journal of Central European Agriculture*, 9(4), 749-756.
22. Khalid, K. A. & Teixeira da silva, J. A. (2012). Biology of *Calendula officinalis* Linn.: focus on pharmacology, biological activities and agronomic practices. *Medicinal and Aromatic Plant Science and Biotechnology*, 6(1), 12- 27.
23. Khan, N. A., Syeed, S., Masood, A., Nazar, R. & Iqbal, N. (2010). Application of salicylic acid increases contents of nutrients and antioxidative metabolism in mungbean and alleviates adverse effects of salinity stress. *International Journal of Plant Biology*, 1, 1-8.
24. Kiarostami, Kh., Mohseni, R. & Saboor, A. (2010). Biochemical changes of *Rosmarinus officinalis* under salt stress. *Journal of Stress Physiology and Biochemistry*, 6(3), 114-122.
25. Korkmaz, A., Uzunlu, M. & Demirkairan, A. R. (2007). Treatment with acetylsalicylic acid protects muskmelon seedlings against drought stress. *Acta Physiologia Plantarum*, 29, 503-508.
26. Lee, J.S. (1998). The Mechanism of Stomatal Closing by Salicylic Acid in (*Commelina communis* L.). *Journal of Plant Biology*, 41(2), 97-102.
27. Maghsoudi, K. & Maghsoudi moud, A. (2008). Analysis of the effects of stomatal frequency and size on transpiration and yield of wheat (*Triticum aestivum* L.). *American Eurasian Journal of Agricultural and Environmental Sciences*, 3(6), 865-872.
28. Miura, k. & Tada, Y. (2014). Regulation of water, salinity, and cold stress responses by salicylic acid. *Frontiers in Plant Science*, 5(4), 1-12.
29. Munns, R. (2005). Genes and salt tolerance: bringing them together. *New Phytologist*, 167, 645-663.
30. Noreen, S. & Ashraf, M. (2008). Alleviation of adverse effects of salt stress on sunflower (*Helianthus annuus* L.) by exogenous application of salicylic acid: growth and photosynthesis, *Pakistan Journal of Botany*, 40, 1657-1663.
31. Palma, F., Lopez-Gomez, M., Tejera, N. A. & Lluch, C. (2013). Salicylic acid improves the salinity tolerance of *Medicago sativa* in symbiosis with *Sinorhizobium meliloti* by preventing nitrogen fixation inhibition. *Plant Science*, 208, 75-82.
32. Parida, A.K. & Das, A.B. (2005). Salt tolerance and salinity effects on plants: Review. *Ecotoxicology and Environment Safety*, 60, 324-349.
33. Rahdari, P. & Hoseini, S. M. (2011). Salinity stress: a review. *Technical Journal of Engineering and Applied Sciences*, 1(3), 63-66.
34. Ren, A. & Wang, Y. (2010). Effects of salt stress on stomatal differentiation and movement of Amaranth (*Amaranthus tricolor* L.) leaves. *Acta Horticulturae Sinica*, 37(3), 479-484.
35. Saidi, I., Ayouni, M., Dhieb, A., Chtourous, Y., Chaibi, W. & Djebali, W. (2013). Oxidative damages induced by short-term exposure to cadmium in bean plants: Protective role of salicylic acid. *South African Journal of Botany*, 85, 32-38.
36. Sinclair, T.R. & Ludlow, M.M. (1985). Who taught plants the thermodynamics of water the unfulfilled potential of plant water potential? *Australian Journal of Plant Physiology*, 12, 213-217.
37. Wang, D., Shannon, M. C. & Grieve, C. M. (2001). Salinity reduces radiation absorption and use efficiency in soybean. *Field Crops Research*, 69, 267-277.

38. Xue, Sh., Yang, P. & He, Y. (2008). Nitric oxide suppresses stomatal opening by inhibiting inward-rectifying K^+ in channels in *Arabidopsis* guard cells. *Chinese Science Bulletin*, 53(14), 2156-2159.
39. Zhu, M., Dai, Sh., Mc Clung, S., Yan, X. & Chen, S. (2009). Functional differentiation of Brassica napus guard cells and mesophyll cells revealed by comparative proteomics. *Molecular & Cellular Proteomics*, 8(4), 752-766.

Salicylic acid effects on stomatal characteristics and some growth of calendula plants (*Calendula officinalis* L.) under salt stress

Fatemeh Dehghan Niri¹, Vahid Reza Saffari^{2*} and Ali Akbar Maghsoudi Moud²

1. Former M.Sc. Students, Department of Horticultural Sciences, Shahid Bahonar University, Kerman, Iran

2. Associated Professors of Horticultural Institute, Shahid Bahonar University, Kerman, Iran

(Received: Sep. 6, 2014 - Accepted: Dec. 20, 2014)

ABSTRACT

In order to investigate the effects of salicylic acid on some growth and stomatal characteristics of calendula plant, a factorial experiment was conducted based on completely randomized design with five replications in the research Greenhouse of Shahid Bahonar University of Kerman in 2013. Salt stress levels including 1, 3, 5, 7 and 9 mmhos/cm were applied to the soil and salicylic acid solutions with 0, 100 and 200 mg/lit concentration were sprayed on plants. Results showed that both salt stress and salicylic acid reduced length and width of stomata. Compared to the control conditions, highest level of salt stress reduced plant shoot and root dry matter and also relative water content to 51, 58 and 24 percent, respectively. However, application of salicylic acid improved all these characteristics at all applied levels of salt stress. Compared to the control conditions, application of 200 mg/lit solution of salicylic acid increased plant shoot and root dry matter (24 and 28%), respectively. Meanwhile, 100 mg/lit salicylic acid solution increased the relative water content (9%) compared to the control.

Keywords: Dry matter, relative water content, salicylic acid, salinity, stomatal length and width.