

بهبود رشد گیاهچه‌های توتون (*Nicotiana tabacum* L.) تحت تنش خشکی تحت تیمار متیل -

جاسمونات

اکبر نورسته‌نیا* و گوهر یوسف زاده

دریافت: ۱۳۹۴/۱۲/۲۲ / پذیرش: ۱۳۹۵/۱۲/۰۷ / چاپ:

گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه گیلان، رشت، ایران

*مسئول مکاتبات: norasteh@guilan.ac.ir

چکیده. در تنش‌های محیطی کاربرد برخی ترکیبات از جمله تعدادی از هورمون‌های رشد گیاهی مانند متیل جاسمونات می‌تواند سبب افزایش مقاومت گیاه شود. در این مطالعه اثر غلظت‌های مختلف متیل جاسمونات (۱۰، ۲۰ و ۳۰ میکرومولار) بر افزایش مقاومت گیاه در برابر تنش خشکی تحت بررسی قرار گرفت. بررسی‌ها در گیاه توتون طی تنش خشکی اعمال شده با پلی اتیلن گلیکول ۲۰ درصد و طی دوره‌های زمانی ۳، ۶ و ۹ روزه انجام شد. نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد که تنش اعمال شده به طور معنی‌داری موجب افزایش محتوای قندهای محلول، مالون دآلدئید و عوامل دفاعی غیر آنزیمی مانند آنتوسیانین و پرولین می‌شود. همچنین، تنش خشکی موجب کاهش مقادیر رنگیزه‌های فتوسنتزی، کاروتنوئید و فلاونوئید در نمونه‌های تنش دیده شد. اما کاربرد متیل جاسمونات سبب کاهش مالون دی‌آلدئید به عنوان شاخص پراکسیداسیون لیپیدی و مقادیر مربوط به عوامل تنش‌زدا مثل پرولین، بتاکاروتن و مالون دی‌آلدئید و افزایش میزان قند محلول و رنگیزه‌های فتوسنتزی، آنتوسیانین، فلاونوئید و فلاونول شد. با توجه به کاهش هم‌زمان پراکسیداسیون لیپیدی و تعدادی از آنتی‌اکسیدان‌های تحت بررسی، به نظر می‌رسد استفاده برون‌زاد متیل جاسمونات در تنش خشکی می‌تواند به این گیاه برای تحمل تنش کمک کند.

واژه‌های کلیدی. آنتی‌اکسیدان‌های غیر آنزیمی، تنش کم‌آبی، توتون، رنگیزه‌های فتوسنتزی، هورمون رشد گیاهی

Improving the growth of tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) seedling by methyl jasmonate under drought stress

Akbar Norastehnia* & Gohar Yousefzadeh

Received 12.03.2016/ Accepted 25/02/2017 /Published

Department of Biology, Faculty of Science, University of Guilan, Rasht, Iran

*Correspondent author: norasteh@guilan.ac.ir

Abstract. Application of some chemical components including plant hormones such as methyl jasmonate causes resistance to increase in environmental stresses. In this study, the effect of methyl jasmonate in different concentrations (10, 20 and 30 μ M) on the elevation of the plant resistance was investigated in drought stress. Tobacco seedlings were studied under drought stress caused by polyethylene glycol (20%) during periods of 3, 6 and 9 days. The results revealed that the imposed stress significantly increased soluble sugar content, MDA and non-enzymatic defense factors such as anthocyanin and proline. In contrast, it is reduced the amount of photosynthetic pigments, carotenoids and flavonoids. On the other hand, the use of methyl jasmonate decreased malondialdehyde as a marker of lipid peroxidation and values of some defense factors such as proline, beta-carotene and MDA. Meanwhile, it increased the amount of soluble sugars and photosynthetic pigments, anthocyanins, flavonoids and flavonols. As a result of the simultaneous reduction of lipid peroxidation and some antioxidants, it seems that using exogenous methyl jasmonate can help the plant withstand against drought stress conditions.

Keywords. non-enzymatic antioxidants, plant hormone, photosynthetic pigments, tobacco, water stress

مقدمه

رادیکال‌های آزاد باعث تخریب ماکرومولکول‌ها و پراکسیداسیون لیپیدهای غشا می‌شوند. بدین ترتیب تنش اکسیداتیو ناشی از وضعیت نامساعد خشکی به تسریع پیری در گیاهان منجر می‌شود (Sharma & Dubey, 2005). در مقابل، گیاهان از طریق به-کارگیری سازوکارهای دفاعی به تنش پاسخ می‌دهند. ترکیبات فنلی گروهی از متابولیت‌های ثانویه هستند که مانع عملکرد

در تنش خشکی، گیاه جهت حفظ آب سلول اندام‌های مختلف، روزه‌های خود را می‌بندد. در نتیجه، میزان فتوسنتز به دلیل کمبود میزان دی‌اکسیدکربن کاهش می‌یابد. در چنین وضعیتی میزان تشکیل رادیکال‌های فعال اکسیژن به ویژه رادیکال سوپراکسید در کلروپلاست افزایش پیدا می‌کند (Parry et al., 2002).

و کاهش تنش اکسیداتیو سبب بهبود رشد و افزایش رنگیزه‌های فتوسنتزی و کاهش پراکسیداسیون لیپیدی می‌شود و برعکس در غلظت‌های بالا عکس این قضیه اتفاق می‌افتد (Moller, 2001). براین اساس در این مطالعه اثر استفاده از متیل جاسمونات به صورت برون‌زاد در سازوکار افزایش مقاومت و بهبود رشد گیاه توتون تحت تنش خشکی بررسی شده است.

مواد و روش‌ها

گیاهچه‌های ۵۰ روزه توتون (رقم کوکر ۳۴۷) در محیط هیدروپونیک و با استفاده از محلول کامل هوگلند رشد کردند و سپس، تحت تنش خشکی قرار گرفتند. اعمال تنش خشکی با اضافه کردن پلی‌اتیلن گلیکول ۶۰۰۰ با غلظت ۲۰ درصد و به مدت ۴۸ ساعت صورت گرفت. پس از ۴۸ ساعت تنش خشکی، تیماردهی به گلدان‌ها به مدت ۹ روز انجام شد. به این صورت که به گلدان‌های شاهد محلول هوگلند و به دیگر گلدان‌ها محلول هوگلند حاوی متیل جاسمونات در سه غلظت ۱۰، ۲۰ و ۳۰ داده شد. اولین نمونه برداری قبل از اعمال تنش خشکی و به عنوان "شاهد تنش ندیده" (به منظور اطمینان از بهینه بودن وضعیت قبل از اعمال تنش) صورت گرفت که از این پس "شاهد ۱" نامیده می‌شود. پس از اتمام تنش، دومین نمونه برداری به عنوان "شاهد تنش- دیده" (به منظور اندازه‌گیری تغییرات عوامل مورد اندازه‌گیری پس از ۴۸ ساعت تنش و قبل از اعمال تیمار متیل جاسمونات) انجام شد که پس از این "شاهد ۲" نامیده می‌شود. برای هر یک از برداشت‌های روزهای سوم، ششم و نهم نیز یک نمونه "شاهد تیمار نشده با متیل جاسمونات" (برای مقایسه پاسخ طبیعی گیاه با پاسخ گیاهان تیمار یافته با متیل جاسمونات) برداشت شده و "شاهد ۳" نامیده شد. نمونه برداری‌های دیگر پس از تنش و در انتهای روزهای سوم، ششم و نهم (که به ترتیب برداشت اول، برداشت دوم و برداشت سوم نامیده می‌شود) از هر یک از تیمارهای ۱۰، ۲۰ و ۳۰ میکرومولار متیل جاسمونات صورت گرفت. نمونه‌ها پس از منجمد شدن داخل ایزت مایع، به فریزر -۷۰ درجه سانتی‌گراد منتقل و تا زمان تحلیل نگهداری شدند.

سنجش قند محلول، پرولین و بتاکاروتن

رادیکال‌های آزاد می‌شوند و از تخریب سلول‌ها جلوگیری می‌کنند. کاروتنوئیدها آنتی‌اکسیدان‌های چربی‌دوست با وزن مولکولی کم در کلروپلاست هستند که غشاهای کلروپلاستی را در مقابل تنش اکسیداتیو محافظت می‌کنند (Munne-Bosch & Penuelas 2003). قندهای محلول نیز به منزله تنظیم‌کننده‌های اسمزی، ثبات‌دهنده غشاهای سلولی و حفظ‌کننده تورژسانس سلول‌ها عمل می‌کنند. در واقع، در گیاهانی که قندهای محلول در پاسخ به تنش خشکی تجمع می‌یابند، تنظیم اسمزی بهتر صورت می‌گیرد (Slama et al., 2007). در میان رنگدانه‌های غیرفتوسنتزی، آنتوسیانین‌ها فعالیت آنتی‌اکسیداتیو فوق‌العاده قوی دارند و اغلب گونه‌های واکنش‌پذیر اکسیژن و نیتروژن را حذف یا غیرفعال می‌کنند (Sapers, 1998). پرولین نیز یکی از مهم‌ترین ترکیبات محافظت‌کننده گیاه در برابر تنش‌های اکسیداتیو است که، علاوه بر تنظیم اسمزی به عنوان محافظ در برابر تنش نیز عمل می‌کند و تحت تنش می‌تواند عملکردهای متفاوت دیگری مانند ایجاد تعادل اسمزی، حذف رادیکال‌های آزاد، تنظیم pH، حفاظت از ساختار پروتئینی و غشای سلول، بازسازی کلروفیل و فعال کردن چرخه کربس داشته باشد (Molinari et al., 2004). بدین ترتیب، پرولین ترکیب شیمیایی فعال و تأثیرگذاری در فیزیولوژی حفاظتی تنش محسوب می‌شود (Koc et al., 2010). پروتئین، بتائین و قندهای محلول نیز از جمله ترکیباتی هستند که به حفظ تورژسانس سلول‌ها و فرایندهای وابسته به آن در پاسخ به پتانسیل‌های پایین آب در ریشه‌ها و اندام‌های هوایی کمک می‌کنند (Ahmad & Sharma, 2010).

جاسمونات‌ها یکی از انواع مولکول‌های علامت‌دهی است و نیز در جایگاه گروهی از انتقال‌دهندگان مهم پیام در دفاع از گیاه در مقابل آسیب‌های مکانیکی، حشره، حمله پاتوژن‌ها، خشکی و غیره عمل می‌کنند (Memelink, 2009). جاسمونات‌ها همچنین، خسارات ناشی از کم‌آبی را کاهش می‌دهند و سبب افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدان‌ها در گیاه و کاهش رادیکال‌های آزاد و ایجاد مقاومت در برابر تنش کم‌آبی یا خشکی می‌شوند (Gupta, 1993). گزارش‌های متعدد از اثر غلظت‌های مختلف متیل جاسمونات بر گیاهان از جمله سویا نشان داده که متیل جاسمونات در غلظت‌های پایین با افزایش توان دفاع آنتی‌اکسیدانی

سپس، جذب محلول به دست آمده در طول موج‌های ۴۷۰، ۶۴۶ و ۶۶۳ با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر (CamSpec M501 UV/Visible) در مقابل شاهد خوانده و مقدار کلروفیل و همچنین، کارتنوئید کل محاسبه شد (Lichtenthaler, 1987).

سنجش ترکیبات فنلی

به منظور استخراج عصاره فنلی از متانول ۸۰ درصد استفاده شد. ابتدا، برگ‌های توتون به مدت ۴۸ ساعت در آون ۷۰ درجه خشک شد، سپس، ۰/۲ گرم از هر نمونه در هاون چینی ریخته و با نیتروژن مایع به خوبی ساییده شد. به هر نمونه ۲ میلی لیتر متانول اسیدی ۸۰ درصد اضافه شد و نمونه‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۲۵ درجه در دستگاه شیکر قرار داده شد. عصاره‌های به دست آمده صاف شدند و به مدت ۱۰ دقیقه در ۱۵۰۰ rpm سانتریفوژ شدند. محلول رویی با دقت برداشته شد و در دمای ۴ درجه سانتی گراد نگهداری شدند. سنجش مقدار فنول کل با کمک معرف Folin-Ciocalteu انجام و جذب نمونه‌ها در طول موج ۷۶۵ نانومتر خوانده شد (Gao et al., 2000). منحنی استاندارد گالیک اسید برای محاسبه غلظت فنول کل نمونه‌ها مورد استفاده قرار گرفت. میزان فلاونول کل با روش Venskutonis و Miliauskas (2004) و براساس رنگ‌سنجی کلرید آلومینیوم و با استفاده از منحنی استاندارد روتین اندازه‌گیری شد. برای سنجش فلاونوئید کل از روش Krizek و همکاران (2004) استفاده و سپس، میزان فلاونوئید بر حسب درصد محاسبه شد. همچنین، برای سنجش آنتوسیانین از روش Masukasu و همکاران (2003) استفاده شد. نتایج برحسب میکروگرم بر گرم وزن تر در طول موج ۵۵۰ نانومتر خوانده شد و برای محاسبه غلظت آنتوسیانین از ضریب خاموشی $1\text{M}^{-1}\text{Cm}^{-1}$ ۳۳۰۰۰ استفاده شد.

سنجش مالون‌دی‌آلدئید و پروتئین کل

برای سنجش مقدار مالون‌دی‌آلدئید از روش Heath و Packer (1968) استفاده شد. جذب نمونه‌ها در طول موج ۵۳۲ نانومتر قرائت شد. برای محاسبه غلظت MDA از ضریب خاموشی 1cm^{-1} ۱۵۵ استفاده شد و در نهایت، مقدار مالون‌دی‌آلدئید براساس نانومول در گرم وزن تر محاسبه شد.

جهت سنجش میزان پروتئین، ابتدا ۰/۵ گرم بافت منجمد شده برگ در هاون چینی با نیتروژن مایع ساییده شد. نمونه پودر شده در میکروتیوپ ۱/۵ میلی لیتری ریخته و به میزان ۱ میلی لیتر به آن

برای سنجش قند محلول ابتدا عصاره الکلی از نمونه‌های آزمایشی تهیه شد. برای این کار، ۰/۲ گرم بافت منجمد در هاون کاملاً له شد و سپس، ۵ میلی لیتر اتانول ۹۵ درصد به آن افزوده شد. مخلوط حاصل به فالکون‌های ۲ میلی لیتری انتقال یافت و به مدت ۳۰ ثانیه ورتکس شد. سپس، نمونه‌ها به مدت ۵ دقیقه و در دمای ۴ درجه سانتی گراد با دور ۳۰۰۰ rpm سانتریفوژ شدند. محلول رویی جدا و در فالکون درب‌دار با حجم ۱۰ میلی لیتر ریخته شد. به رسوب به جامانده ۵ میلی لیتر اتانول ۷۰ درصد اضافه شد و نمونه‌ها دوباره در وضعیت ذکر شده در مرحله قبل سانتریفوژ شدند. این کار دوبار انجام شد و در هر بار محلول رویی جدا و به لوله‌های آزمایشی که برای این منظور در نظر گرفته شده بود منتقل شد. برای اندازه‌گیری قندهای محلول، ۱۰۰ میکرولیتر از عصاره الکلی به لوله‌های آزمایش منتقل شد. پس از آن، ۳ میلی لیتر محلول آنترون تازه تهیه شده (۱۵۰ میلی گرم آنترون در ۱۰۰ میلی لیتر اسید سولفوریک ۷۲ درصد) به لوله‌ها اضافه شد. لوله‌های آزمایش به مدت ۱۰ دقیقه در بن‌ماری با دمای ۱۰۰ درجه قرار داده شد و پس از سرد شدن در حمام یخ، جذب نمونه‌ها در طول موج ۶۲۵ خوانده شد. بلانک شامل ۱ میلی لیتر اتانول ۹۵ درصد و ۱ میلی لیتر اتانول ۷۰ درصد است. مقادیر قندهای محلول با استفاده از منحنی استاندارد گلوکز تعیین شد (Paquin et al., 1979). برای اندازه‌گیری مقدار پرولین از روش بتس و همکاران (Bates et al., 1973) استفاده شد. جذب عصاره پرولین در طول موج ۵۲۰ نانومتر خوانده شد و مقدار پرولین با استفاده از منحنی استاندارد تعیین شد. برای سنجش بتاکاروتن، جذب نمونه‌ها در طول موج‌های ۴۵۳ و ۵۰۵ به ترتیب مربوط به رنگیزه‌های بتا-کاروتن و لیکوپن خوانده شد. سپس، غلظت بتاکاروتن هر نمونه برحسب میکروگرم بر میلی لیتر محاسبه شد (Nagata & Yamashita, 1992).

سنجش کمی میزان کلروفیل‌های a، b، کل و کاروتنوئید

نیم گرم برگ تر از هر تکرار توزین شد و توسط نیتروژن مایع در داخل هاون چینی آسیاب شد و به آن ۵ میلی لیتر استون ۸۰ درصد (CC ۲۰ آب مقطر: CC ۸۰ استون) اضافه شد. مخلوط به دست آمده به مدت ۱۵ دقیقه با دور ۳۰۰۰ rpm در دمای ۴ درجه سانتی-گراد سانتریفوژ شد. در نهایت، عصاره استونی شفاف جدا شد و حجم آن با استون خالص به ۵ میلی لیتر (حجم اولیه) رسانده شد.

با متیل جاسمونات توانست مقادیر بتاکاروتن را در سطوح بالاتری حفظ کند.

سنجش کلروفیل a، کلروفیل b و کلروفیل کل

مقدار کلروفیل a در کلیه نمونه‌های تحت تنش کاهش یافت. این کاهش در برداشتهای اول و دوم در کلیه نمونه‌های تیمار شده با متیل جاسمونات و نمونه‌های شاهد ۳ ادامه یافت و تنها در برداشت سوم کاهش سرعت تخریب و افزایش سنتز کلروفیل a اتفاق افتاد و موجب ارتقای مقدار آن در کلیه نمونه‌ها شد (شکل ۲ A). مقدار کلروفیل b نیز پس از اعمال تنش خشکی با پلی اتیلن گلیکول در نمونه‌های تنش دیده کاهش معنی داری نسبت به شاهد تنش ندیده متحمل شده است. مشابه با کلروفیل a، این کاهش در برداشتهای اول و دوم ادامه یافت و تنها در برداشت سوم، بازسازی رنگیزه‌های کلروفیلی روندی سریع‌تریافت و مقادیر کلروفیل b در کلیه نمونه‌ها کمی افزایش نشان داد، اما در هیچ‌یک از تیمارها به سطح نمونه‌های شاهد ۱ نمی‌رسد (شکل ۲ B). همان‌طور که در شکل ۲ C مشاهده می‌شود، مقدار کلروفیل کل متأثر از داده‌های مربوط به کلروفیل a و b پس از اعمال تنش خشکی کاهش معنی داری نسبت به شاهد ۱ نشان می‌دهد. در برداشت اول و دوم نیز کاهش در میزان کلروفیل کل در شاهد ۳ و نمونه‌های تیمار شده با متیل جاسمونات نسبت به شاهد ۲ کاملاً معنی دار است. همان‌طور که داده‌های شکل ۲ C نشان می‌دهد، تنها تیمار ۳ در برداشت سوم توانسته تا حدودی روند کاهش کلروفیل کل را جبران کند و مقدار کلروفیل را نسبت به نمونه‌های شاهد ۳، به سطحی نزدیک‌تر به نمونه‌های شاهد ۲ برساند. مقدار کاروتنوئید نیز در همه نمونه‌ها تحت تنش کاهش یافت و در برداشت اول نیز همچنان نسبت به شاهد ۱ کاهش بیشتری نشان داد. با توجه به داده‌های شکل ۲ D، از بین غلظت‌های مورد استفاده متیل جاسمونات، فقط غلظت ۳۰ میکرومولار بود که توانست میزان کاروتنوئیدها را نسبت به شاهد ۳، به طور معنی داری افزایش دهد، به طوری که بیشترین مقدار کاروتنوئید در غلظت ۳ برداشت سوم دیده شد.

سنجش ترکیبات فنلی

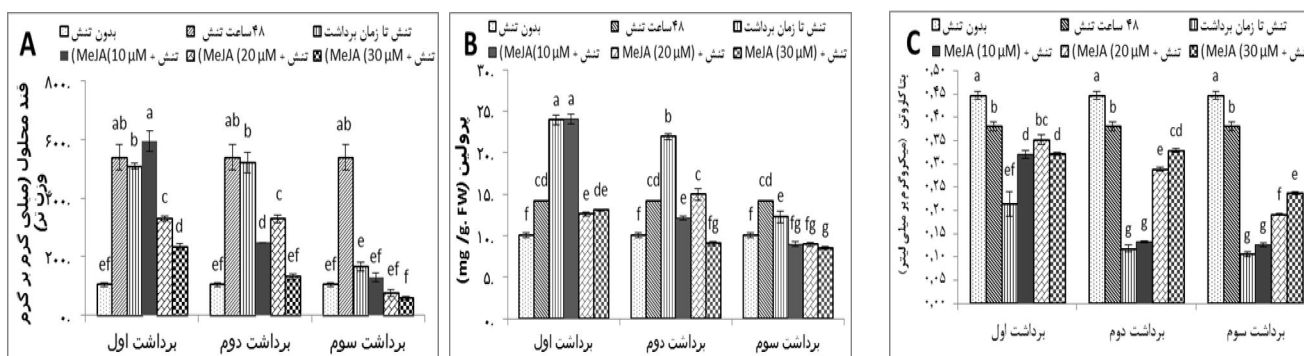
مقدار فلاونوئید تحت اثر تنش خشکی در نمونه‌های تنش دیده به شدت افزایش یافت. حذف تنش این افزایش مقدار فلاونوئیدها را تعدیل می‌کند و طی برداشتهای سه گانه اول، دوم و سوم روند

بافر استات سدیم اضافه شد. نمونه‌ها در دمای ۴ درجه سانتی گراد و با دور rpm ۱۴۰۰۰ به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ شدند. محلول رویی به میکروتیوپ دیگری انتقال یافت و به مدت ۷ دقیقه مطابق مرحله قبل سانتریفوژ شد. نمونه‌های حاصل به فریزر -۷۰ درجه سانتی گراد انتقال داده شدند. محتوای پروتئین کل به روش برادفورد (Bradford, 1976) و با استفاده از سرم آلبومین گاوی BSA به عنوان منحنی استاندارد در طول موج ۵۹۵ نانومتر توسط اسپکتروفوتومتر مدل CamSpec M501 Single Beam UV/Visible اندازه گیری شد.

نتایج

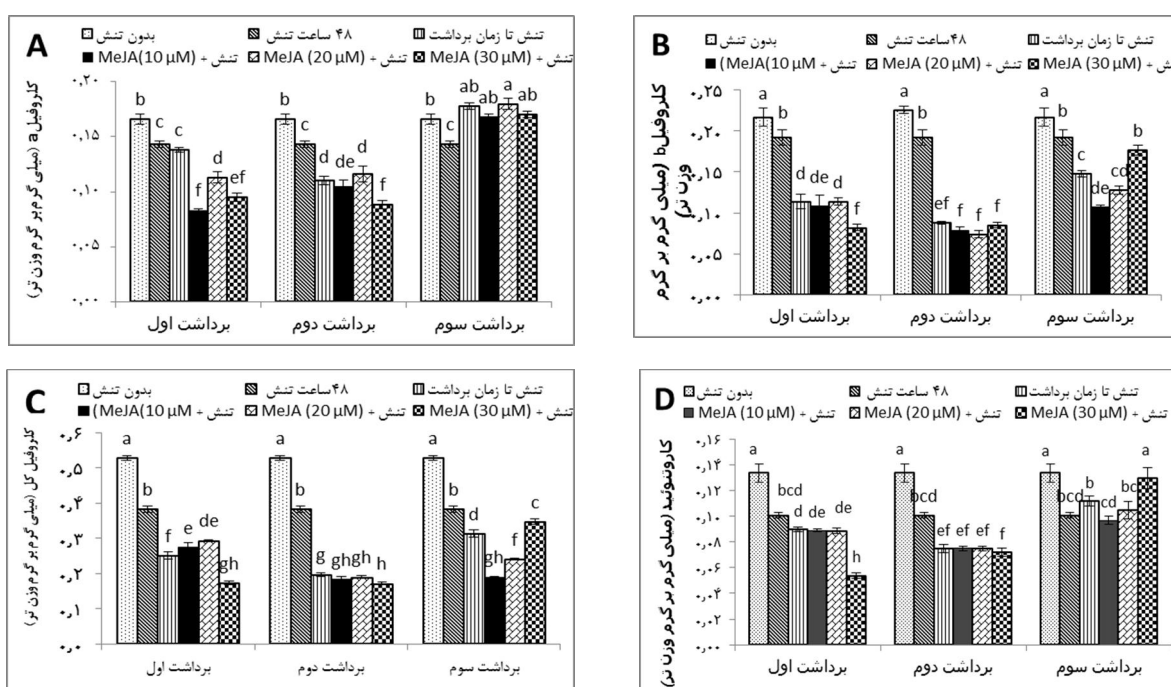
قند محلول، پرولین و بتاکاروتن

بر اساس نتایج، مقدار قند در شاهد ۲ و ۳، افزایش معنی داری نسبت به شاهد ۱ نشان داد. اما در اثر تیمار با غلظت‌های مختلف متیل جاسمونات، قند محلول افزایش کمتری نشان داد. همان‌طور که در نمودار شکل ۱ A دیده می‌شود، در برداشت سوم و پس از گذشت ۹ روز، مقادیر قند محلول به طور معنی داری در همه نمونه‌های تحت تیمار نسبت به شاهد ۲ کاهش یافت. پرولین تحت تنش و در نمونه‌های تنش دیده به مقدار قابل توجهی افزایش یافت. از طرف دیگر، پس از اعمال تنش خشکی، مقادیر پرولین نیز در نمونه‌های شاهد ۲ و شاهد ۳ به طور معنی دار افزایش یافت. تیمار ۱ متیل جاسمونات در اولین برداشت نتوانست تغییری در محتوای پرولین نسبت به نمونه‌های شاهد ۳ ایجاد کند، اما غلظت‌های بالاتر متیل جاسمونات در همین برداشت اول و در تیمارهای ۲ و ۳ دارای اثر معنی دار بوده و مقدار پرولین را در مقادیر نزدیک به شاهد ۱ حفظ کرده‌اند. در برداشت سوم، مقدار پرولین در همه نمونه‌های تیمار ندیده (شاهد ۳) و تیمار دیده (غلظت‌های ۱۰، ۲۰ و ۳۰ میکرومولار متیل جاسمونات) به سطوح پایین‌تر از مقادیر مربوط به شاهد ۲ کاهش یافت (شکل ۱ B). همچنین، تنش خشکی موجب کاهش معنی دار مقدار بتاکاروتن شاهد ۲ نسبت به شاهد ۱ شد (شکل ۱ C). در برداشت اول، در هم، تیمارها، کاهش معنی دار مقدار بتاکاروتن مشاهده شد. با توجه به داده‌های شکل ۳ کاهش مقدار بتاکاروتن در نمونه‌های شاهد ۳ سیر نزولی داشت ولی تیمار



شکل ۱- میانگین تغییرات مقادیر **A**: قند محلول، **B**: پرولین و **C**: بتا کاروتن در برداشت‌های اول، دوم و سوم. داده‌ها میانگین سه تکرار \pm خطای معیار (SE) هستند. حروف متفاوت نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی دار میان تیمارها براساس مقایسه میانگین‌ها با آزمون دانکن در سطح احتمال $p < 0.05$ است.

Fig. 1. Average changes in **A**: soluble sugars, **B**: proline and **C**: betacaroten in the first, second and third harvests. The data are the average of three replicates \pm standard error (SE). Different letters indicate significant differences among treatments according to Duncan's test with $p < 0.05$.

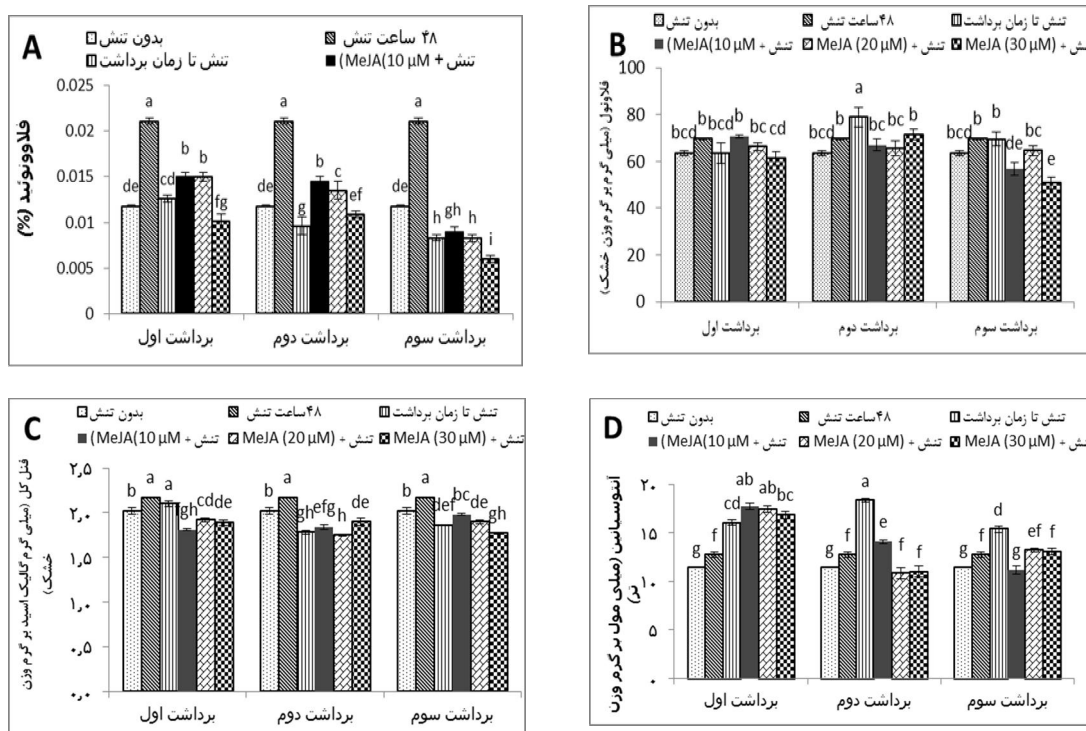


شکل ۲- میانگین تغییرات **A**: مقادیر کلروفیل a، **B**: کلروفیل b، **C**: کلروفیل کل و **D**: کاروتنوئید در برداشت‌های اول، دوم و سوم. داده‌ها میانگین سه تکرار \pm خطای معیار (SE) هستند. حروف متفاوت نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی دار میان تیمارها براساس مقایسه میانگین‌ها با آزمون دانکن و حروف مشترک مبین فقدان اختلاف معنی دار در سطح احتمال $p < 0.05$ است.

Fig. 2. Average changes in **A**: chlorophyll a, **B**: chlorophyll b, **C**: chlorophyll total and **D**: betacaroten in the first, second and third harvests. The data are the average of three replicates \pm standard error (SE). Different letters indicate significant differences among treatments according to Duncan's test with $p < 0.05$.

تغییرات درخور توجهی تحت تنش و در برداشت اول نشان نداد (شکل B ۳)، اما در برداشت دوم نمونه‌های شاهد ۳ به‌طور قابل توجهی افزایش یافتند. تیمار با غلظت‌های مختلف متیل جاسمونات از این افزایش ممانعت کرد و حتی در برداشت سوم باعث کاهش

نزولی آنها را موجب می‌شود. این کاهش مقادیر فلاونوئیدی در کلیه نمونه‌های شاهد ۳ و تیمار یافته‌ها به‌جز نمونه‌های تیمار ۳ متیل جاسمونات بدون تفاوت معنی دار اتفاق افتاد و نمونه‌های تیمار ۳ کاهش بیشتر فلاونوئید را نشان دادند (شکل A ۳). مقادیر فلاونول



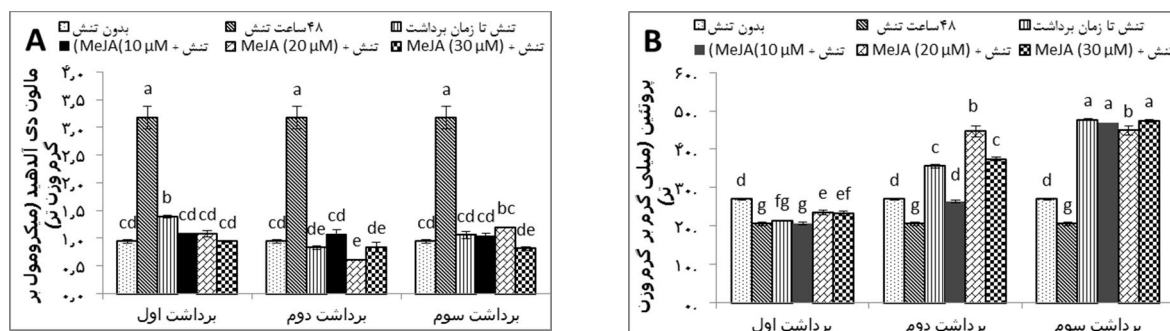
شکل ۳- میانگین تغییرات مقادیر **A:** فلاونوئید، **B:** فلاونول، **C:** فنل کل و **D:** آنتوسیانین در برداشت‌های اول، دوم و سوم. داده‌ها میانگین سه تکرار \pm خطای معیار (SE) است. حروف متفاوت نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌دار میان تیمارها براساس مقایسه میانگین‌ها با آزمون دانکن و حروف مشترک مبین فقدان اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال $p < 0.05$ است.

Fig. 3. Average changes in **A:** flavonoids, **B:** flavenols, **C:** total phenol and **D:** anthocyanins in the first, second and third harvests. The data are the average of three replicates \pm standard error (SE). Different letters indicate significant differences among treatments according to Duncan's test with $p < 0.05$.

اندازه‌گیری پراکسیداسیون لیپیدی تحت اثر تیمار خشکی، افزایش معنی‌دار مالون دآلدئید را در نمونه‌های شاهد ۲ نسبت به شاهد ۱ نشان داد. در مقابل، کلیه نمونه‌های تیماریافته با محلول هوگلدن فاقد متیل‌جاسمونات یا واجد غلظت‌های متفاوت آن، کاهش سریع پراکسیداسیون لیپیدی را پس از خارج شدن از تنش آشکار می‌سازند، باوجود این کاهش MDA در تیماریافته‌های با متیل‌جاسمونات بیشتر و سریع‌تر اتفاق افتاد (شکل A ۴). همان‌طور که در نمودار شکل B ۴ دیده می‌شود، تحت تنش خشکی ۴۸ ساعته و حتی با حذف تنش، طی برداشت اول مقدار پروتئین به‌طور محسوسی کاهش یافت. طی برداشت‌های دوم، مقدار پروتئین در همه نمونه‌ها افزایش یافت، اما نمونه‌های تیماریافته با متیل‌جاسمونات از سرعت افزایش مقدار پروتئین بیشتری برخوردار بودند و در برداشت سوم، تعادلی نسبی در مقادیر پروتئین همه نمونه‌ها حاصل شد.

معنی‌دار آن شد. با توجه به شکل C ۳، ابتدا تحت تنش افزایش مقدار فنل کل مشاهده شد، اما نمونه‌های تیمار شده با متیل‌جاسمونات مقادیر کاهش یافته فنل را نشان دادند. اما در برداشت‌های دوم و سوم این اختلاف بین نمونه‌های تیمار شده با متیل‌جاسمونات و تیمار نشده تقلیل یافت و تفاوت‌ها به حداقل رسید، ولی در هر صورت کمتر از مقادیر فنل در نمونه‌های شاهد ۲ بود. مقادیر آنتوسیانین نیز تحت اثر تنش خشکی افزایش یافت. میانگین داده‌ها در شکل D ۳، افزایش دوباره مقدار آنتوسیانین را در تمام نمونه‌های مربوط به برداشت اول نسبت به شاهد‌های ۱ و ۲ نشان داد. در برداشت دوم مقدار آنتوسیانین با افزایش زمان برداشت در نمونه‌های تیمار شده با متیل‌جاسمونات به طور قابل توجهی کاهش یافت و در برداشت سوم برای همه غلظت‌های متیل‌جاسمونات با کاهش بیشتری همراه شد.

سنجش پراکسیداسیون لیپیدی و پروتئین کل



شکل ۴- میانگین تغییرات مقادیر **A:** مالون دی آلدئید و **B:** پروتئین در برداشت‌های اول، دوم و سوم. داده‌ها میانگین سه تکرار \pm خطای معیار (SE) هستند. حروف متفاوت نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌دار میان تیمارها براساس مقایسه میانگین‌ها با آزمون دانکن و حروف مشترک مبین فقدان اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال $p < 0.05$ است.

Fig. 4. Average changes in **A:** malonaldehyds and **B:** proteins in the first, second and third harvests. The data are the average of three replicates \pm standard error (SE). Different letters indicate significant differences among treatments according to Duncan's test with $p < 0.05$.

درخور توجه است و بازبایی وضعیت قبل از تنش برای گیاه به-سختی و در زمان طولانی امکان‌پذیر است. آزمایش انجام‌شده درباره گیاهان دیگر: جو (Munne-Bosch *et al.*, 2003)، انیسون (Munne-Bosch *et al.*, 2004) و توتون (Norast-ehnia *et al.*, 2014) تأییدی بر این نتایج است. تحت تنش شدید خشکی با تشکیل رادیکال‌های فعال اکسیژن ممکن است آسیب اکسیداتیو اتفاق بیفتد و بتاکاروتن نتواند نقش دفاعی خود را اعمال کند (Hernandez *et al.*, 2004). نتایج بررسی نقش متیل جاسمونات به‌عنوان هورمون افزایش‌دهنده آنتی‌اکسیدان‌های غیر آنزیمی غالباً ترغیب سنتز و ارتقای مقادیر آنها از جمله بتاکاروتن را نشان می‌دهد (Abdelgawad *et al.*, 2014). افزایش آنتوسیانین تحت تنش، همان‌طور که در باره گیاه بگونیا پیشنهاد کرده‌اند (Zhang *et al.*, 2010)، می‌تواند به‌علت نقش حفاظتی آنتوسیانین به‌وسیله حذف مستقیم تنش اکسیداتیو باشد. در بررسی اثر متیل جاسمونات بر مقدار آنتوسیانین گزارش شده که کاربرد متیل جاسمونات با غلظت‌های ۱۰ و ۲۵ میکرومولار موجب افزایش مقدار آنتوسیانین، در آراییدوپسیس می‌شود (Jung, 2004) که تأییدی بر نتایج تحقیق حاضر است. علت این افزایش، اثر متیل جاسمونات بر بیان برخی ژن‌های مؤثر در بیوسنتز آنتوسیانین‌ها پیشنهاد شده است (Shan *et al.*, 2009). کاهش معنی‌دار مقادیر کاروتنوئید تحت تنش خشکی به‌علت بسته‌شدن روزنه‌ها، کاهش میزان فتوسنتز و افزایش تشکیل رادیکال‌های فعال اکسیژن در کلروپلاست رخ می‌دهد. این امر سبب اکسیدشدن

بحث و نتیجه‌گیری

تیمار نمونه‌های تنش‌دیده با غلظت‌های پایین (۱۰ میکرومولار) متیل جاسمونات، افزایش معنی‌دار مقدار پرولین را نشان داد که مشابه با نمونه‌های شاهد تنش‌دیده بود. تحقیقات نشان می‌دهد استفاده از تنظیم‌کننده‌های رشد در افزایش مقدار پرولین تحت تنش خشکی بی‌تأثیر نیست. کاربرد متیل جاسمونات در هنگام تنش‌های مختلف از جمله خشکی، با القای آنزیم سنتزکننده پرولین، سبب افزایش سنتز پرولین در گیاهان می‌شود (Fedina & Benderliev, 2000) اما در تحقیق حاضر، تیمار با غلظت‌های ۲۰ و ۳۰ میکرومولار متیل جاسمونات در برداشت اول، مقدار پرولین را به سطحی نزدیک به شاهد تنش‌ندیده کاهش داد. این نتایج با داده‌های Tizhosh و همکاران (2014) درباره گیاه توتون تحت تنش اکسیداتیو مطابقت داشت. به‌نظر می‌رسد متیل-جاسمونات پس از تحریک اولیه سنتز پرولین و در پی کاهش شدت تنش، با مهار القای آنزیم‌های سنتزکننده پرولین، اثر کاهش خود را القا می‌کند. تجزیه پرولین در طی کاهش تنش ممکن است خود تأمین‌کننده عوامل مورد نیاز فسفوریلاسیون اکسیداتیو میتوکندریایی و تولید ATP برای ترمیم صدمات ناشی از تنش باشد (Bates *et al.*, 1973). برطبق نتایج این تحقیق، مقدار بتاکاروتن تحت تنش خشکی کاهش یافت و این کاهش نسبت به نمونه‌های شاهد ۱ معنی‌دار بود. با آبیاری نمونه‌ها به مدت ۳، ۶ و ۹ روز پس از تنش نیز روند کاهش بتاکاروتن در نمونه‌های شاهد ۳ همچنان ادامه داشت که نشان می‌دهد آسیب ناشی از تنش خشکی

که محرک‌های لازم برای افزایش مقادیر آنها حذف شده و در نتیجه لزوم افزایش سنتز آنها را رفع کرده است. متیل جاسمونات با افزایش فعالیت پراکسیداز (Asghari & Hasanlooe 2015) و دیگر آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان (Shahabinejad *et al.*, 2014) سبب کاهش رادیکال‌های آزاد و تنش اکسیداتیو می‌شود و در نتیجه از مقدار ترکیبات فلاونوئیدی و فلاونول به‌عنوان عوامل آنتی‌اکسیدانی کاسته می‌شود. یکی دیگر از دلایل کاهش ترکیبات فنلی در حضور متیل جاسمونات، اثر منفی حضور متیل جاسمونات بر فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیلایز است (Cao *et al.*, 2009).

کاهش فنل تحت تأثیر تیمار با متیل جاسمونات می‌تواند به‌منزله تخفیف تنش محسوب شود. اصولاً، انباشتگی ترکیبات فنلی نوعی پاسخ دفاعی در برابر تنش‌های زیستی و غیرزیستی است. در غلظت‌های بالای ترکیبات فنلی، به دلیل افزایش تعداد گروه‌های هیدروکسیل موجود در محیط واکنش، احتمال اهدای هیدروژن به رادیکال‌های آزاد بیشتر می‌شود و به دنبال آن، قدرت مهارکنندگی عصاره افزایش می‌یابد (Manach *et al.*, 2004).

تغییرپذیری پروتئین‌ها و واکنش اجتناب‌ناپذیر گیاهان به تنش محیطی است (Hieng *et al.*, 2004). تنش خشکی غلظت پروتئین محلول برگ را کاهش می‌دهد. این کاهش را می‌توان به کاهش سنتز پروتئین‌ها تحت تنش خشکی و یا تجزیه پروتئین‌ها به‌علت افزایش فعالیت آنزیم‌های پروتئاز نسبت داد (Mafakheri *et al.*, 2010). بررسی‌های به‌عمل آمده در گیاهان از جمله تنباکو (Parry *et al.*, 2002) نیز این کاهش را نشان می‌دهد. اگرچه Luo و همکاران (2010) گزارش کردند که تنش خشکی در گیاهانی مانند *Setaria viridis* و *Digitalis* سبب القای سنتز پروتئین‌های دهیدرین می‌شود، این پروتئین‌ها مانع از آن می‌شوند که گیاه آب بیشتری از دست بدهد. مطلب درخور توجه در استفاده از متیل جاسمونات در این بخش این است که این هورمون توانسته در زمان کوتاه‌تری نسبت به نمونه‌های تیمارنیده (شاهد ۳)، یعنی در برداشت دوم، ارتقای مؤثرتری از مقدار پروتئین را موجب شود که حاکی از جنبه حمایتی این هورمون از گیاه تحت تنش است. افزایش میزان پروتئین‌ها تحت تیمار با متیل جاسمونات ممکن است به دلیل فعال شدن مسیر فنیل پروپانوئیدی و سنتز بیشتر آنزیم‌های

کاروتنوئیدها توسط اکسیژن فعال و تخریب ساختار آنها می‌شود (Parry *et al.*, 2002; Sharma & Dubey, 2005). نتایج حاضر با بررسی‌های پیشین درباره گیاهان از جمله زیتون (Ben Ahmad *et al.*, 2009) نیز مطابقت دارد. به نظر می‌رسد سازوکار دفاع نوری در تنش شدید خشکی به شدت آسیب دیده و نمی‌تواند کلروپلاست‌ها را در مقابل تنش اکسیداتیو محافظت کند. با کاهش میزان تنش، میزان تولید رنگیزه‌های کاروتنوئیدی افزایش می‌یابد. در این وضعیت، کاروتنوئیدها قادرند انرژی زیاد طول موج‌های کوتاه را بگیرند و با غیرفعال کردن رادیکال‌های آزاد اکسیژن از تشکیل اکسیژن یکتایی جلوگیری و دستگاه فتوسنتزی را در مقابل پراکسیداسیون لیپیدی محافظت کنند. نتایج به‌دست آمده روشن می‌کند که متیل جاسمونات طی تیمار کوتاه‌مدت نمی‌تواند نقش حفاظتی خود را بر فتوسنتز اعمال کند، اما با گذشت زمان و در غلظت‌های بالاتر، تا حدودی با افزایش مقدار کلروفیل به بهبود فتوسنتز کمک می‌کند. محققان پیشنهاد می‌کنند که متیل جاسمونات در بیان مجموعه‌ای از ژن‌های مربوط به آنزیم‌های کلیدی در بیوسنتز کلروفیل از طریق تشکیل آمینو لوولینیک اسید دخالت دارد (Ahmadi *et al.*, 2004). این نتایج موافق با نتایج به‌دست آمده در گیاه صنوبر (Babst *et al.*, 2005) و آراییدوپسیس (Jung, 2004) است. تنش خشکی غلظت کلروفیل b را بیشتر از کلروفیل a کاهش می‌دهد و باعث افزایش نسبت کلروفیل a به b می‌شود (Ashraf *et al.*, 1994).

بررسی میزان فلاونوئید و فلاونول تحت تنش خشکی نشان داد که این عوامل به‌عنوان متابولیت ثانوی در گیاه افزایش می‌یابند (Myung-Min *et al.*, 2009). افزایش در میزان فلاونوئید و فلاونول برای نمونه‌های تحت تنش این پژوهش با تغییرات گزارش شده در گیاهان دیگری مانند گیاه انیسون برای فلاونوئید و بر روی *Cistus clusii* برای فلاونول مطابقت داشته و نشان‌دهنده اثر محافظتی آنتی‌اکسیدان‌های فلاونوئیدی طی استرس خشکی است (Hernandez *et al.*, 2004). فلاونوئیدها بدلیل داشتن نقش آنتی‌اکسیدانی به‌طور مستقیم با وارد شدن در واکنش‌های احیایی و یا به‌طور غیرمستقیم به‌وسیله کلاته کردن آهن مانع تنش اکسیداتیو می‌شوند. روند ثابت کاهش مقدار فلاونوئید و فلاونول با گذشت زمان و پس از حذف تنش این احتمال را مطرح می‌کند

REFERENCES

- Abdelgawad, Z.A., Khalafaallah, A.A. and Abdallah, M.M.** 2014. Impact of methyl jasmonate on antioxidant activity and some biochemical aspects of maize plant grown under water stress condition. – *Agri. Sci.* 5: 1077-1088.
- Ahmad, P. and Sharma, S.** 2010. Physiobiochemical attributes in two cultivars of mulberry (*Morus alba* L.) under NaHCO₃ stress. – *Int. J. Plant Prod.* 4: 79-86.
- Ahmadi, A. and Ceiocmardeh, A.** 2004. Effect of drought stress on soluble carbohydrate, chlorophyll and proline in four adopted wheat cultivars with various climate of Iran. *Iranian J. Agric. Sci.* 35: 753-763.
- Asghari, M. and Hasanlooe, A.R.** 2015. Methyl jasmonate effectively enhanced some defense enzymes activity and Total Antioxidant content in harvested “Sabrosa” strawberry fruit. – *Food Sci. Nutr.* doi: 10.1002/fsn3.300
- Ashraf, M. and Wu, L.** 1994. Breeding for salinity tolerance in plants. – *Crit Rev Plant Sci.* 13:17-42.
- Babst, B.A., Ferrieri, R.A., Gray, D.W., Lerdau, M., Schlyer, D.J., Schueller, M., Thrope, M.R. and Orians, C.M.** 2005. Jasmonic acid induces rapid changes in carbon transport and partitioning in *Populus*. – *New Phytol.* 167: 63-72.
- Bates, L.S., Walderen, R.D. and Taere, I.D.** 1973. Rapid determination of free proline for water stress studies. – *Plant Soil.* 39: 205-207.
- Bradford, M.M.** 1976. Rapid and sensitive method for the quantification of microgram qua the principle of protein-dye binding. – *Anal. Biochem.* 72: 248-254.
- Ben Ahmad, C., Ben Rouin, B., Sensoyc, S., Boukhrisa, M. and Ben Abdallah, F.** 2009. Changes in gas exchange, proline accumulation and antioxidative enzyme activities in three olive cultivars under contrasting water availability regimes. – *Environ. Exp. Bot.* 345-352.
- Cao, Sh., Zheng, Y., Wang, K., Rui, H. and Tang, Sh.** 2009. Effect of methyl jasmonate on cell wall modification of loquat fruit in relation to chilling injury after harvest. – *Food Chem.* 118: 641-647.
- Creelman, R.A., Mason, H.S., Bensen, R.J., Boyer, J.S. and Mullet, J.E.** 1990. Water deficits and abscisic acid cause differential inhibition of shoot versus root growth in soybean seedlings. – *Plant Physiol.* 214: 92-105.
- Creelman, R.A. and Mullet, I.E.** 1997. Biosynthesis and action of jasmonate in plants. – *Annu. Rev. Plant Physiol.* 48: 355-381.
- Fedina, I.S. and Benderliev, K.M.** 2000. Response of *Secundus incrassatus* to salt stress as affected by methyl jasmonate. – *Biol. Plant.* 43: 625-627.
- Gao, X., Ohlander, M., Jepsson, N., Bjork, L. and Trajkovski, V.** 2000. Changes in antioxidant effects and their relationship to phytonutrients in fruits of sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) during maturation. – *J. Agric. Food Chem.* 48: 1485-1490.
- Gupta, A.K., Singh, J. Kaur, N. and Singh, R.** 1993. Effect of polyethylene glycol induced water stress on uptake in-troversion and transport of sugars in chickpea seedling. – *Plant Physiol. Biochem.* 31: 743-747.
- شرکت کننده در این مسیر و همین طور سنتز آنزیم‌های آنتی-کسیدانی باشد. تیمار نمونه‌های تحت تنش با غلظت‌های مختلف متیل جاسمونات کاهش مقدار MDA را در همه نمونه‌ها و تحت همه تیمارها سریع تر و مؤثرتر از نمونه‌های تیمارندیده به همراه داشت، به طوری که با افزایش مدت زمان تیماردهی این کاهش در مقدار MDA همچنان ادامه یافت. این بدان معناست که متیل جاسمونات به طور مؤثری توانست سطح تنش را کاهش دهد. این نتایج مطابق با بررسی انجام شده در گیاهچه‌های ذرت است که کاربرد متیل جاسمونات در آنها باعث تخفیف اثر تنش شد و سطح مالون دآلدئید را کاهش داد. علت احتمالی این امر را می‌توان افزایش سطح آسکوربیک اسید (به عنوان یک واسطه آنتی-اکسیدانی که در مسیر چرخه Asada halliwell عمل می‌کند در حضور متیل جاسمونات بیان کرد (Li et al., 1998).

سپاسگزاری

نگارندگان این مقاله از مرکز دخانیات استان گیلان بابت تأمین بذر توتون و از دانشگاه گیلان به دلیل حمایت مالی قدردانی می‌کنند.

- Heath, R.L. and Packer, L.** 1968. Photoperoxidation in isolated chloroplasts. – Arch. Biochem. Biophys. 125:189-198.
- Hernandez, I., Alegre, L. and Munne-Bosch, S.** 2004. Drought-induced changes in flavonoids and other low molecular weight antioxidants in *Cistus clusii* grown under Mediterranean field conditions. – Tree Physiol. 24: 1303-1311.
- Hieng, B., Ugrinovic, K., Sustar-Vozlic, J. and Kidric, M.** 2004. Different classes of proteases are involved in the response to drought of *Phaseolus vulgaris* L. cultivars differing in sensitivity. – J. Plant Physiol. 161: 519-30.
- Jung, S.** 2004. Effect of chlorophyll reduction in *Arabidopsis thaliana* by methyl jasmonate or norflurazon on antioxidant systems. – Plant Physiol Biochem. 42: 231-255.
- Koc, E., İslek, C. and Üstun, A.S.** 2010. Effect of cold on protein, proline, phenolic compounds and chlorophyll content of two pepper (*Capsicum annum* L.) varieties. – GU J Sci. 23: 1-6.
- Krizek, D.T., Britz, S.J. and Mirecki, R.M.** 1998. Inhibitory effects of ambient levels of solar UV-A and UV-B radiation on growth of cv. new red fire lettuce. – Physiol. Plant. 103: 1-7.
- Lichthenthaler H.K.** 1987. Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. – Methods Enzymol. 148: 350-382.
- Li, L., Staden, J.V. and Jager, A.K.** 1998. Effect of plant growth regulators on the antioxidant system in seedlings of two maize cultivars subjected to water stress. – J. Plant Growth Regul. 25: 81-87.
- Luo Y., Zhao, X., Zhou, R., Zuo, X., Zhang, J. and Li, Y.** 2010. Physiological acclimation of two psammophytes to repeated soil drought and rewatering. – Acta Physiol. Plant. 33:79-91.
- Mafakheri A., Siosemardeh A., Bahramnejad B., Struik P.C. and Sohrabi, Y.** 2010. Effect of drought stress on yield, proline and chlorophyll contents in three chickpea cultivars. – Aust J Crop Sci. 4: 580-585.
- Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Rémésy, C. and Jiménez, L.** 2004. Polyphenols: food sources and bioavailability. – Am. J. Clin. Nutr. 79: 727-47.
- Masukasu, H., Karin, O. and Kyoto, H.** 2003. Enhancement of anthocyanin biosynthesis by sugar in radish (*Raphanus sativus*) hypocotyls. – Plant Sci. 164: 259-265.
- Memelink, J.** 2009. Regulation of gene expression by jasmonate hormones. – Phytochemistry. 70: 1560-1570.
- Mittler, R.** 2004. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. – Trends Plant Sci. 7: 405-410.
- Molinari, H.B.C., Marur, C.J., Bernal, J.C., Kobayashi, A.K., Pileggi, M., Pereira, F.P.P. and Vieira, L.G.E.** 2004. Osmotic adjustment in transgenic Citrus rootstocks (*Carrizo citrange*) overproducing proline. – Plant Sci. 167: 1375-1381.
- Moller, I.M.** 2001. Plant mitochondria and oxidative stress Electron transport, NADPH turn over and metabolism of reactive oxygen species. – Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 52: 561-91.
- Munne-Bosch S. and Penuelas J.** 2003. Photo and antioxidant protection during summer leaf senescence in *Pistacia lentiscus* L. grown under Mediterranean field conditions. – Ann. Bot. 92: 385-391.
- Munne-Bosch, S. and Penuelas, J.** 2004. Drought induced oxidative stress in strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) growing in Mediterranean field conditions. – Plant Sci. 166: 110.
- Nagata, M. and Yamashita, I.** 1992. Simple method for simultaneous determination of chlorophyll and carotenoids in tomato fruit. – J. Japanese Societ. Food Sci. Technol. 39: 925-928.
- Norastehnia, A., Niaazari, M., Sarmad, J. and Rassa, M.** 2014. Effects of chloride salinity on non-enzymatic antioxidant activity, proline and malondialdehyde content in three flue-cured cultivars of tobacco. – J. Plant Develop. 21: 75-82.
- Parry M.A.J., Andralojc P.J., Khan, S., Lea, P.J. and Keyes, A.J.** 2002. Rubisco activity: effects of drought stress. – Ann. Bot. 89: 833-839.
- Paquin, R. and Lechasseur, P.** 1979. Observations sur une methode dosage de la proline libre dans les extraits de plantes. – Can. J. Bot. 57: 1851-1854.
- Myung-Min, H., Trick, H.N. and Rajasheka, E.B.** 2009. Secondary metabolism and antioxidant are involved in environmental adaptation and stress tolerance in lettuce. – J. Plant Physiol. 166: 180-191.
- Sapers, G.M. and Simmons, G.** 1998. Hydrogen peroxide disinfection of minimally processed fruits and vegetables. – Food Tech. 52: 48-5.
- Shahabinejad, M., Shojaaddini, M., Maserti, B., Arvin, M.J. and Seyedi, S.M.** 2014. Exogenous application of methyl jasmonate and salicylic acid increases antioxidant activity in the leaves of pistachio (*Pistacia vera* L. cv. Fandoughi) trees and reduces the performance of the phloem-feeding psyllid *Agonoscaena pistaciae*. – Arthropod-Plant Inte. 8: 525-530.
- Shan, X., Zhang, Y., Peng, W., Wang, Z. and Xie, D.** 2009. Molecular mechanism for jasmonate- induction of anthocyanin accumulation in *Arabidopsis*. – J. Exp. Bot. 60: 3849-3860.
- Sharma, P. and Dubey, R.S.** 2005. Drought induces oxidative stress and enhances the activities of antioxidant enzymes in growing rice seedlings. – J. Plant Growth Regul. 46: 209-221.
- Slama, I., Ghnaya, T., Hessini, K., Messedi, D., Savoure, A. and Abdelly, C.** 2007. Comparative study of the effects of mannitol and PEG osmotic stress on growth and solute accumulation in *Sesuvium portulacastrum*. – Environ Exp. Bot. 61: 10-17.
- Tizhoosh-Jalaly, M.R., Sarmad, J., Norastehnia, A., Zavarreh, M. and Moshtaghi, M.** 2014. The effect of methyl jasmonate and different chloride concentrations on photosynthetic pigments and proline content in *Nicotiana tabacum* L. cv. Cooker 347. – IJPB. 6: 51-62.
- Turkan, I., Bor, M., Ozdemir, F. and Koca, H.** 2005. Differential responses of lipid peroxidation and antioxidants in the leaves of drought-tolerant *P. acutifolius* Gray and drought-sensitive *P. vulgaris* L. subjected to polyethylene-

ne glycol mediated water stress. – Plant Sci. 168: 223-231.

Venskutonis, P.R., Miliauskas, G. and van Beek, T.A. 2004. Screening of radical scavenging activity of some medicinal and aromatic plant extracts. – Food Chem. 85: 231-237.

Zhang, K.M., Yu, H.J., Shi, K., Zhou, Y.H., Yu, J.Q. and Xia, X.J. 2010. Photoprotective roles of anthocyanins in *Begonia semperflorens*. – Plant Sci. 179: 202-208.

Akbar Norastehnia, A. and Yousefzadeh, G. XX. Improvement in growth of tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) seedling by methyl jasmonate under drought stress. – Nova Biol. Rep. X:.....

اکبر نورسته‌نیا، ا. و یوسف‌زاده، گ. XXX. بهبود رشد گیاهچه‌های توتون (*Nicotiana tabacum* L.) در شرایط تنش خشکی تحت تیمار متیل جاسمونات. – یافته‌های نوین در علوم زیستی X:.....