

Evaluation of the glycine betaine and salicylic acid spraying on the destructive effects of drought stress on Indigo (*Indigofera tinctoria* L.) medicinal plant

Zeynab Sheykh¹, Sedigheh Esmaeilzadeh Bahabadi^{*2}, Zeynab Mohkami³

1. M.Sc. Graduate, Dept. of Biology, Faculty of Science, University of Zabol, Zabol, Iran. E-mail: zeinab.sh2356@gmail.com
2. Corresponding Author, Associate Prof., Dept. of Biology, Faculty of Science, University of Zabol, Zabol, Iran. E-mail: esmaeilzadeh@uoz.ac.ir
3. Assistant Prof., Dept. of Agronomy and Plant Breeding, Agriculture Institute, Research Institute of Zabol, Zabol, Iran. E-mail: zaynabmohkami@uoz.ac.ir

Article Info

Article type:

Full Length Research Paper

Article history:

Received: 11.22.2023

Revised: 12.12.2023

Accepted: 02.27.2024

Keywords:

Anthocyanin,
Antioxidant activity,
Drought,
Elicitor,
Phenol

ABSTRACT

Background and Objectives: Indigo plant (*Indigofera tinctoria* L.) is a forgotten plant that has many therapeutic properties such as antibacterial, antiallergic, liver protector and antioxidant. Solutions that can reduce the effects of late season drought in plants can be very beneficial. The use of biological stimulant is one of the efficient methods to adjust biological stresses. The aim of this study was to investigate the effect of salicylic acid and glycine betaine elicitors at different irrigation levels on some morphological and phytochemical indicators of Indigo plant.

Materials and Methods: This experiment was conducted as a factorial based on a completely randomized design with 15 treatments and three replications. The treatments examined in this research include irrigation at three levels of 50, 75, and 100% of crop capacity as the first factor and stimulants of salicylic acid (at two levels of 2 and 4 mM) and glycine betaine (at two levels of 50 and 100 mM) along with control (spraying with distilled water) was as the second factor. Irrigation treatments were applied after the plants entered the four-leaf stage based on the agricultural capacity of the soil and by weight method. The agricultural capacity of pot soil was calculated by weight method with the help of moisture meter (TDR). Foliage treatments with stimulants (salicylic acid and glycine betaine) were performed at the 4-leaf stage. After one growing season, morphological parameters such as plant height, number of branches, wet and dry weight of plant, root length and root weight were measured. The amount of photosynthetic pigments was measured with Arnon method, by spectrophotometer approach. The anthocyanin content of leaves was measured by acid methanol method. Proline content was also determined by Bates method with the help of ninhydrin reagent. The total phenolic content was measured by Folin Ciocalteu reagent, the total flavonoid content was measured by aluminum chloride colorimetric method, and the antioxidant activity was measured by DPPH free radical inhibition assay.

Results: The results showed that reducing irrigation (50% FC) reduced plant height, number of branches, plant fresh and dry weight, root length and root weight, chlorophyll, carotenoid, anthocyanin and flavonoid. On the other hand, increased proline, phenol and antioxidant activity. Foliar spraying of glycine betaine and salicylic acid increased the above parameters under normal and water deficit conditions. The positive effect

of glycine betaine, especially the concentration of 100 mM, was higher compared to the positive effect of salicylic acid. The interaction effect of irrigation and stimuli showed that the highest height (1.6 cm), dry weight of plant (73.47 grams per plant), root length (8.75 cm), chlorophyll a (10.8 mg/g) and carotenoid (0.53 mg/g) was obtained with 100 mM glycine betaine treatment in 100% crop capacity irrigation and the highest amount of phenol (294.3 mg/g of gallic acid) and antioxidant activity (68.47%) was achieved with 100 mM glycine betaine treatment in 75% FC irrigation regime.

Conclusion: According to the results of the present research, glycine betaine and salicylic acid, especially glycine betaine at a concentration of 100 mM, can act as a suitable stimulus to increase growth, produce secondary metabolites of the Indigo plant and deal with low negative effects of drought stress should be suggested.

Cite this article: Sheykh, Zeynab, Esmaeilzadeh Bahabadi, Sedigheh, Mohkami, Zeynab. 2025. Evaluation of the glycine betaine and salicylic acid spraying on the destructive effects of drought stress on Indigo (*Indigofera tinctoria* L.) medicinal plant. *Journal of Plant Production Research*, 31 (4), 43-68.



© The Author(s).

DOI: 10.22069/JOPP.2024.21934.3095

Publisher: Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources

ارزیابی اثرات محلول‌پاشی گلايسين بتائين و اسيد سالیسیلیک بر آثار مخرب تنش کم‌آبی در گیاه دارویی نیل (*Indigofera tinctoria* L.)

زینب شیخ^۱، صدیقه اسمعیل‌زاده بهابادی^{۲*}، زینب محکمی^۳

۱. دانش‌آموخته کارشناسی ارشد گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه زابل، زابل، ایران. رایانامه: zeinab.sh2356@gmail.com

۲. نویسنده مسئول، دانشیار گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه زابل، زابل، ایران. رایانامه: esmaeilzadeh@uoz.ac.ir

۳. استادیار گروه زراعت و اصلاح نباتات، پژوهشکده کشاورزی، پژوهشگاه زابل، زابل، ایران. رایانامه: zaynabmohkami@uoz.ac.ir

اطلاعات مقاله	چکیده
نوع مقاله: مقاله کامل علمی- پژوهشی	سابقه و هدف: گیاه دارویی نیل (<i>Indigofera tinctoria</i> L.) گیاهی فراموش شده است که دارای خواص درمانی متعددی مانند ضدباکتری، ضدآلرژی، محافظ کبد و آنتی‌اکسیدانی می‌باشد. یکی از موارد محدودکننده تولیدات گیاهی، تنش خشکی است. استفاده از محرک‌های زیستی یکی از روش‌های کارآمد جهت تعدیل تنش‌های زیستی است. هدف این مطالعه، بررسی تأثیر الیستورهای اسیدسالیسیلیک و گلايسين بتائين در سطوح مختلف آبیاری بر برخی شاخص‌های ریخت‌شناسی و زیست‌شیمیایی گیاه نیل بود.
تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۹/۰۱	مواد و روش‌ها: این آزمایش به‌صورت فاکتوریل در قالب پایه طرح کاملاً تصادفی با ۱۵ تیمار و سه تکرار طی سال ۱۴۰۱ اجرا گردید. تیمارهای مورد بررسی در این پژوهش شامل آبیاری در سه سطح ۵۰، ۷۵ و ۱۰۰ درصد ظرفیت زراعی (F.C.) به‌عنوان فاکتور اول و محرک‌های اسیدسالیسیلیک (در دو سطح ۲ و ۴ میلی‌مولار) و گلايسين بتائين (در دو سطح ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌مولار) به همراه شاهد (عدم محلول‌پاشی) به‌عنوان فاکتور دوم بود. تیمارهای آبیاری پس از ورود گیاهان به مرحله چهار برگی بر اساس ظرفیت زراعی خاک و به روش وزنی اعمال شدند. ظرفیت زراعی خاک گلدان به روش وزنی به کمک دستگاه رطوبت‌سنج (TDR) محاسبه گردید. تیمارهای محلول‌پاشی با محرک‌ها اسید سالیسیلیک (SA) و گلايسين بتائين (GB) در مرحله ۴ تا ۸ برگی با فاصله زمانی یک هفته و در مرحله رشد رویشی ساقه با سه تکرار انجام گردید. پس از طی یک فصل رشد، پارامترهای ریخت‌شناسی مانند ارتفاع بوته، تعداد انشعابات، وزن تر و خشک بوته، طول و وزن ریشه اندازه‌گیری شد. پارامترهای فیتوشیمیایی مانند: میزان رنگدانه‌های فتوسنتزی، محتوای آنتوسیانین برگ، محتوای پرولین، محتوای فنل کل، محتوای فلاونوئید کل و فعالیت آنتی‌اکسیدانی انجام شد.
تاریخ ویرایش: ۱۴۰۲/۰۹/۲۱	واژه‌های کلیدی: آنتوسیانین، الیستور، فعالیت آنتی‌اکسیدانی، فنول، کم‌آبی
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۱۲/۰۸	

یافته‌ها: نتایج نشان داد که کاهش مقدار آبیاری (۵۰ درصد ظرفیت زراعی) ارتفاع بوته، تعداد انشعابات، وزن تر و خشک بوته، طول و وزن ریشه، کلروفیل، کاروتنوئید، آنتوسیانین و فلاونوئید را کاهش داد و پرولین، فنول و فعالیت آنتی‌اکسیدانی را افزایش داد. محلول پاشی گلایسین بتائین و اسیدسالیسیلیک پارامترهای فوق را در شرایط آبیاری نرمال و کم‌آبی افزایش داد. اثر مثبت گلایسین بتائین به‌ویژه غلظت ۱۰۰ میلی‌مولار در مقایسه با اثر مثبت اسید سالیسیلیک، بیش‌تر بود. اثر متقابل آبیاری و محرک‌ها نشان داد بیش‌ترین میزان ارتفاع گیاه (۶/۱ سانتی‌متر)، وزن تر گیاه (۸۱/۱۷ گرم در بوته)، طول ریشه (۸/۷۸ سانتی‌متر) و وزن تر ریشه (۰/۰۵۳۷ گرم) در تیمار 100% F.C. + GB 100 Mm سنجش شده که به ترتیب نسبت به تیمار شاهد ۲۵/۷۷، ۴۸/۹۶، ۵۹/۰۹ و ۱۷۵/۲۱ درصد افزایش داشته است. بیش‌ترین میزان فنول کل (میانگین ۲۷۵/۵۱ میلی‌گرم اسید گالیک در گرم) و فعالیت آنتی‌اکسیدانی (۶۷/۴۷ درصد) در تیمار GB 100 Mm + 75% F.C. حاصل شد که نسبت به تیمار شاهد به ترتیب ۶۸۵ و ۴۸ درصد افزایش داشته است.

نتیجه‌گیری: با توجه به نتایج پژوهش حاضر، گلایسین بتائین و اسید سالیسیلیک، به‌ویژه گلایسین بتائین در غلظت ۱۰۰ میلی‌مولار، می‌تواند به‌عنوان محرک مناسبی برای افزایش رشد، تولید متابولیت‌های ثانویه گیاه نیل و مقابله با اثرات منفی کم‌آبی پیشنهاد شوند.

استناد: شیخ، زینب، اسمعیل‌زاده بهابادی، صدیقه، محکمی، زینب (۱۴۰۳). ارزیابی اثرات محلول پاشی گلایسین بتائین و اسید سالیسیلیک بر آثار مخرب تنش کم‌آبی در گیاه دارویی نیل (*Indigofera tinctoria* L.). نشریه پژوهش‌های تولید گیاهی، ۳۱ (۴)، ۶۸-۴۳.

DOI: 10.22069/JOPP.2024.21934.3095



© نویسندگان.

ناشر: دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

مقدمه

نیل (*Indigofera tinctoria* L.) گیاهی دارویی متعلق به خانواده بقولات (Fabaceae) می باشد (۱). برگ گیاه نیل دارای ماده‌ای به نام نیل یا ایندیگو است که در صنعت رنگرزی بسیار بارزش می باشد (۲). غربالگری فیتوشیمیایی کیفی گیاه نیل نیز وجود ترکیبات فعال زیستی از جمله متابولیت‌های ثانویه مانند آلکالوئیدها، فلاونوئیدها، تانن‌ها، فنول‌ها، ساپونین‌ها، گلیکوزیدها و ترپنوئیدها را در این گیاه نشان داده‌اند (۳).

ریشه‌ها، ساقه‌ها و برگ‌های آن، ملین، خلط‌آور و ضدکرم هستند و برای درمان سرطان، صرع، گاستروپاتی (بیماری‌های معده)، کاردیوپاتی (بیماری‌های قلبی-عروقی)، نوروپاتی، بیماری‌های پوستی مزمن، برونشیت مزمن و آسم و تقویت رشد مو موثر می‌باشند که به حضور متابولیت‌های ثانویه در این گیاه مرتبط است. هم‌چنین، این گیاه حاوی ایندیروبین^۱ و ایندیگتون^۲ است که در عصاره استخراج استخراج شده از برگ‌ها در درمان هیدروفوبیا (آب هراسی) مفید است (۴).

استفاده از محرک‌های زیستی یکی از روش‌های کارآمد جهت تعدیل تنش‌های زیستی است. مطالعات زیادی ثابت کرده‌اند که کاربرد محرک‌ها منجر به بهبود رشد و نمو و افزایش تحمل به تنش‌های محیطی به ویژه خشکی در گیاهان می‌شود (۸، ۹، ۱۰ و ۱۱). اسیدسالیسیلیک یا اورتو هیدروکسی بنزوئیک اسید یک فنول گیاهی است که می‌تواند طیف وسیعی از فرآیندهای فیزیولوژیکی و زیست‌شیمیایی، رشد، نمو و عملکرد را در گیاهان تحت تأثیر قرار دهد و تأثیرات قابل توجهی بر مقاومت گیاهان به تنش‌های محیطی مانند خشکی و شوری دارد (۸ و ۱۲). کاربرد

خارجی اسید سالیسیلیک در غلظت‌های بهینه اثرات مفیدی را هم در شرایط نرمال و هم در شرایط تنش، در رشد و نمو گیاهان نشان می‌دهد (۸ و ۱۳).

گلایسین بتائین^۳ یک ترکیب آمونیوم چهارتایی است که به طور درون‌زا در کلروپلاست‌ها در پاسخ به عوامل تنش‌زای غیرزنده مانند خشکی و شوری سنتز می‌شود (۱۴). گلایسین بتائین نه تنها به عنوان یک تنظیم‌کننده اسمزی عمل می‌کند؛ بلکه ساختار و فعالیت آنزیم‌ها و کمپلکس‌های پروتئینی را تثبیت می‌کند و یکپارچگی غشاها را در برابر اثرات مخرب خشکی حفظ می‌کند (۱۵). گزارش شده است که کاربرد خارجی گلایسین بتائین می‌تواند یک راه امیدوارکننده برای حفظ و افزایش مستقیم رشد، نمو و عملکرد گیاهان باشد (۱۶). هم‌چنین، گلایسین بتائین می‌تواند به تحمل تنش‌های محیطی از طریق نقش خود در انتقال سیگنال و هموستازی یونی کمک کند (۱۵). گلایسین بتائین تحمل به خشکی را در گیاهان زیره (۱۷) و گندم (۱۸) بهبود بخشیده است. گلایسین بتائین با بهبود وضعیت آب بافت و محافظت از غشاهای زیستی در برابر گونه‌های اکسیژن فعال تحت تنش خشکی به بهبود تحمل گیاهان در برابر تنش‌های غیرزنده کمک می‌کند (۱۹).

پژوهش‌گران با مطالعه اثر محلول پاشی اسید سالیسیلیک، گلایسین بتائین و گاما آمینو بوتیریک اسید بر فعالیت آن‌تی‌اکسیدانی گیاه کارلا تحت تنش کم‌آبی نتیجه گرفتند که تنش خشکی (۵۰ درصد ظرفیت زراعی) میزان کلروفیل و ویتامین ث را کاهش داد ولی محتوای کاروتنوئید، مواد جامد محلول، فنول کل، فلاونوئید و آنتوسیانین را افزایش داد (۱۰).

در پژوهشی اثر اسید سالیسیلیک، روی و گلایسین بتائین بر فیزیولوژی و عملکرد ذرت تحت تنش خشکی مشخص شد که تنش خشکی (۵۰ درصد

1- Indirubin
2- Indigtone

3- Glycine betaine

کشت گیاه و اعمال تیمار: ابتدا مخلوط خاکی محتوای کوکوپیت: پرلیت: خاک باغچه (با نسبت ۱:۱:۱) آماده گردید. بذر نیل از شرکت سبزینه گستر چابهار تهیه گردید. پس از آماده‌سازی گلدان‌ها، بذور نیل با قارچ‌کش کاپتان ضدعفونی شدند و ۱۰ عدد بذر در عمق ۱/۵ سانتی‌متری خاک در گلدان‌های یک کیلو گرمی کشت شد. سپس گلدان‌ها درون دستگاه اتاقل رشد^۲ (۱۳۰۰ لیتر نور صنعت فردوس) با دمای شبانه 22 ± 2 درجه سانتی‌گراد، دمای روزانه 28 ± 2 درجه سانتی‌گراد، شرایط ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی قرار گرفتند. اولین علائم جوانه‌زنی ۴-۶ روز پس از کاشت مشاهده گردید. پس از سبز شدن (حدوداً یک هفته پس از کاشت) و در مرحله دو برگی، گیاهچه‌ها تنک شدند و ۵ گیاهچه در هر گلدان نگه داشته شد. این آزمایش به‌صورت فاکتوریل در قالب پایه طرح کاملاً تصادفی با ۱۵ تیمار و سه تکرار اجرا گردید. تیمارهای مورد بررسی در این پژوهش شامل آبیاری در سه سطح ۵۰، ۷۵ و ۱۰۰ درصد ظرفیت زراعی به‌عنوان فاکتور اول و محرک‌های اسید سالیسیلیک (در دو سطح ۲ و ۴ میلی‌مولار) و گلاسیسین بتائین (در دو سطح ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌مولار) به همراه شاهد (عدم محلول‌پاشی) به‌عنوان فاکتور دوم بود. تیمارهای آبیاری پس از ورود گیاهان به مرحله چهار برگی بر اساس ظرفیت زراعی خاک و به روش وزنی اعمال شدند. ظرفیت زراعی خاک گلدان به روش وزنی به کمک دستگاه رطوبت‌سنج (TDR) محاسبه گردید. پنج نمونه ۵۰۰ گرمی از بستر کشت تهیه و با رطوبت‌های مختلف، توسط دستگاه TDR قرائت گردید. سپس با قرار دادن نمونه‌ها در آون و خشک نمودن آن‌ها، رطوبت وزنی هر نمونه به‌دست آمد. در نهایت داده‌های رطوبت وزنی در محور افقی و داده‌های رطوبت قرائت شده

ظرفیت زراعی) پارامترهای ریخت‌شناسی (ارتفاع، وزن تر بوته، وزن خشک بوته، تعداد برگ و سطح برگ)، عملکرد و اجزای آن، محتوای نسبی آب، محتوای کلروفیل a و b، سرعت فتوسنتز، سرعت تعرق و هدایت روزنه‌ای را به طور معنی‌داری کاهش داد و محتوای قند محلول، میزان پرولین، محتوای مالون دی آلدهید، محتوای پراکسید هیدروژن و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی (کاتالاز، پراکسیداز، گلوکاتیون ریداکتاز، سوپراکسید دیسموتاز) را افزایش داد (۲۰).

پژوهش‌گران بیان کردند که کاربرد برون‌زای اسید سالیسیلیک منجر به افزایش معنی‌دار میزان اسمولیت‌ها (کربوهیدرات‌ها و پرولین) در گیاهان آویشن معمولی و آویشن کوهی در شرایط تنش خشکی می‌شود (۲۱). با توجه به اهمیت اهلی‌سازی گیاه دارویی نیل جهت جلوگیری از واردات بی‌رویه این گیاه و از آنجا که بررسی‌های اندکی در زمینه کشت این گیاه در شرایط کم‌آبیاری (تنش خشکی) وجود دارد؛ بنابراین این پژوهش با هدف ارزیابی اثرات کاهشی محلول‌پاشی گلاسیسین بتائین و اسید سالیسیلیک بر آثار مخرب تنش خشکی در گیاه نیل طراحی و اجرا گردید.

مواد و روش‌ها

مواد آزمایشگاهی: متانول با درجه خلوص بالا از شرکت مجلی ایران، ۲ و ۲- دی فنیل - ۱- پیکریل - هیدرازیل^۱ (DPPH)، اسید گالیک، گلاسیسین بتائین، اسیدسالیسیلیک و کوئرستین از شرکت سیگما-آلدریج تهیه گردید. کربنات سدیم، استات پتاسیم، کلرید آلومینیوم، اسید سولفوسالیسیلیک، ناین هیدرین، فولین سیوکالتیو از شرکت مرک-آلمان، تهیه گردید.

نمود (۲۲). تیمارهای محلول پاشی با محرکها (اسید سالیسیلیک و گلابیسین بتائین) در در مرحله ۴ تا ۸ برگی با فاصله زمانی یک هفته و در سه تکرار در مرحله رشد رویشی ساقه انجام گردید (۱۰). پس از دو ماه، پارامترهای ریخت شناسی مانند ارتفاع بوته، تعداد انشعابات، وزن تر و خشک بوته، طول و وزن ریشه اندازه گیری شد (شکل ۱).

توسط دستگاه در محور عمودی نمودار شیب خط قرار داده شد و ارتباط این داده ها توسط خط رسم شده با معادله چند جمله ای به دست آمد $(R^2=0/986, Y=0/0414X^2 + 2/6021X + 0/444)$. سپس با داشتن هر رطوبت وزنی و قرار دادن مقدار آن در معادله به دست آمده، با تقریب خوبی می توان عدد دستگاه را در رطوبت های مورد نظر (۱۰۰، ۷۵ و ۵۰ درصد رطوبت قابل دسترس برای گیاه) پیش بینی



شکل ۱- گیاه نیل کشت شده در اتاقک رشد بعد از گذشت دو ماه.

Fig. 1. Indigo plant grown in a growth chamber after two months.

۴۷۰ نانومتر با دستگاه اسپکتروفوتومتر^۱ قرائت شد. در این فرمولها، A663 میزان جذب قرائت شده در طول موج ۶۶۳، A645 میزان جذب قرائت شده در طول موج ۶۴۵، A470 میزان جذب قرائت شده در طول موج ۴۷۰، V حجم نهایی عصاره استون ۸۰ درصد بر حسب میلی لیتر و W وزن تازه بافت برگ بر حسب گرم می باشد.

اندازه گیری محتوای کلروفیل a، کلروفیل b و کاروتنوئید: سنجش میزان رنگدانه های فتوسنتزی به روش آرنون (۲۳) انجام شد. مقدار ۰/۵ گرم از بافت تر برگ در هاون چینی با ۱۰ میلی لیتر استون ۸۰ درصد ساییده گردید و به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۶۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. سپس میزان جذب عصاره فوقانی در طول موج های ۶۶۳، ۶۴۵ و

$$\text{Chlorophyll a} = (12.25 \times A663 - 2.798) (V / (W \times 1000)) \quad (1)$$

$$\text{Chlorophyll b} = (21.50 \times A645 - 5.10) (V / (W \times 1000)) \quad (2)$$

$$\text{Cars} = (1000 A470 - 1.82 \text{ Chl a} - 85.02 \text{ Chl b}) / 198 \times (V / (W \times 1000)) \quad (3)$$

۰/۵ گرم بافت تر گیاهی در ۱۰ میلی لیتر محلول اسید سولفوسالیسیلیک ۳ درصد در هاون ساییده شد. سپس مخلوط با کاغذ صافی واتمن No. 1 صاف گردید.

تعیین محتوای پرولین: جهت اندازه گیری میزان پرولین برگ از روش بیتس استفاده گردید (۲۴). ابتدا

1- Spectrophotometer- Iran-Modet Code:3480

اندازه‌گیری محتوای آنتوسیانین: به منظور تعیین محتوای آنتوسیانین، مقدار ۰/۱ گرم از برگ‌های تازه با ۱۰ میلی‌لیتر متانول اسیدی (مخلوط ۱ میلی‌لیتر اسیدکلریدریک خالص با ۹۹ میلی‌لیتر متانول) کاملاً ساییده شد. مخلوط حاصل به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و شرایط تاریکی قرار گرفت. سپس به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۴۰۰۰ دور سانتریفیوژ گردید. مقدار جذب عصاره فوقانی در طول موج ۵۵۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر قرائت گردید. از محلول متانول اسیدی به‌عنوان شاهد (بلانک) استفاده گردید. در نهایت محتوای آنتوسیانین با استفاده از رابطه زیر و بر حسب میلی‌گرم بر گرم وزن تر نمونه محاسبه گردید (۲۵).

$$A = \sum BC$$

کلراید استفاده شد (۲۶). طبق این روش، به ۵۰۰ میکرولیتر از عصاره متانولی، ۱۰۰ میکرولیتر از محلول آلومینیوم کلراید ۱۰ درصد، ۱۰۰ میکرولیتر استات پتاسیم^۱ یک مولار و ۲/۸ میلی‌لیتر آب مقطر اضافه گردید. این مخلوط ۴۰ دقیقه در دمای اتاق نگهداری شد. سپس، جذب مخلوط نهایی در طول موج ۴۱۵ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر در مقابل بلانک قرائت شد. از کوئرتستین^۲ به‌عنوان استاندارد برای رسم منحنی کالیبراسیون استفاده شد. منحنی استاندارد با غلظت‌های کوئرتستین (۵۰، ۱۵۰، ۳۵۰، ۴۵۰، ۵۵۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) رسم گردید. در نهایت با قرار دادن مقدار جذب عصاره در معادله خطی زیر مربوط به منحنی استاندارد، مقدار فلاونوئید کل بر حسب میلی‌گرم کوئرتستین در گرم وزن خشک گزارش شد. در این معادله، Y عدد جذب ثبت شده در دستگاه اسپکتروفتومتر و X محتوای فلاونوئید کل می‌باشد.

مقدار ۲ میلی‌لیتر از این عصاره به لوله آزمایش منتقل شد و مقدار ۲ میلی‌لیتر معرف اسید ناین‌هیدرین و ۲ میلی‌لیتر اسیداستیک گلاسیال به آن اضافه گردید. مخلوط حاصل به مدت ۱ ساعت در بن‌ماری و دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت و بعد از گذشت این مدت، نمونه‌ها در حمام یخ به مدت ۳۰ دقیقه نگهداری شدند و پس از خنک شدن نمونه‌ها، ۴ میلی‌لیتر تولوئن به مخلوط واکنش افزوده شد. پس از تکان دادن مخلوط حاصل، ترکیب داخل لوله آزمایش به حالت دو فاز مایع در می‌آید که مقدار جذب مایع فوقانی رنگی حاوی پرولین، در طول موج ۵۲۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر قرائت گردید.

(۴)

که در آن، A مقدار جذب خوانده شده توسط دستگاه اسپکتروفتومتر، \sum برابر با ضریب خاموشی ۳۳۰ مول بر سانتی‌متر مربع، B برابر با عرض کووت (یک سانتی‌متر) و C برابر با غلظت آنتوسیانین می‌باشد.

سنجش محتوای فلاونوئید کل، فنول و فعالیت آنتی‌اکسیدانی: بدین منظور برگ‌های خشک به وسیله آسیاب برقی پودر شدند. سپس عصاره متانولی (۸۰ درصد) از پودر برگ با روش مسراسیون سرد و با نسبت ۲۰:۱ (V/W) ماده خشک گیاهی (۰/۵ گرم) تهیه گردید. نمونه‌ها به مدت ۴۸ ساعت درون حلال متانول و روی شیکر با دور ۱۲۰ rpm در دمای اتاق خیسانده شدند. پس از آن نمونه‌ها با سرعت ۴۰۰۰ دور به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شدند. از این عصاره جهت استفاده در سنجش مقادیر فلاونوئید کل، فنول کل و فعالیت آنتی‌اکسیدانی استفاده گردید.

مقدار فلاونوئید کل: برای اندازه‌گیری مقدار فلاونوئید کل در عصاره متانولی از روش رنگ‌سنجی آلومینیوم

1- CH3CO2K, Merck, Germani, NO.104820
2- Sigma-Aldrich, USA, C15H10O7, NO. Q4951

$$X = \frac{y-0.002}{0.0062} \quad (5)$$

مقدار جذب نوری در طول موج ۷۶۵ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر در مقابل بلانک قرائت شد. منحنی استاندارد گالیک اسید با غلظت‌های ۱۰، ۵۰، ۱۵۰، ۲۰۰ و ۲۵۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر رسم شد. در نهایت با قرار دادن مقدار جذب عصاره در معادله خطی زیر مربوط به منحنی استاندارد، میزان فنول کل بر حسب میلی‌گرم اسید گالیک در گرم محاسبه شد.

$$X = \frac{y-0.098}{0.0057} \quad (6)$$

متانولی با ۲ میلی‌لیتر از محلول DPPH مخلوط گردید. این نمونه‌ها به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق و شرایط تاریکی نگهداری شدند تا رنگ مخلوط واکنش از بنفش به زرد تغییر کند. سپس میزان جذب نوری آن‌ها در طول موج ۵۱۷ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر خوانده شد. مقدار جذب مخلوط واکنش در طول موج ۵۱۷ نانومتر قرائت گردید. در نهایت درصد مهار رادیکال DPPH با استفاده از فرمول زیر محاسبه و بر حسب درصد گزارش شد.

$$100 \times \text{جذب شاهد} / (\text{جذب نمونه} - \text{جذب شاهد}) = \text{درصد مهار رادیکال DPPH} \quad (7)$$

هر صفت با آزمون چنددامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۵ درصد توسط نرم‌افزار SAS انجام گردید. نمودارها و جدول‌ها با استفاده از نرم‌افزار Excel 2010 ترسیم شدند.

محتوای فنول کل: برای سنجش مقدار فنول کل در عصاره متانولی از معرف فولین‌سیوکالتو^۱ استفاده شد (۲۶). در لوله فالكون، ۲۰۰ میکرولیتر عصاره متانولی و ۴۰۰ میکرولیتر معرف فولین‌سیوکالتیو (رقیق شده با آب مقطر به نسبت ۱ به ۱۰) اضافه شد. سپس ۴۰۰ میکرولیتر کربنات سدیم^۲ ۷ درصد به مخلوط فوق افزوده شد و ۳۰ دقیقه در دمای محیط نگهداری شد.

که در آن، Y عدد جذب ثبت شده در دستگاه اسپکتروفتومتر و X محتوای فنول کل می‌باشد. **سنجش فعالیت آنتی‌اکسیدانی:** سنجش فعالیت آنتی‌اکسیدانی به روش مهار رادیکال‌های آزاد ۲ و ۲- دی فنیل-۱- پیکریل- هیدرازیل^۳ (DPPH) انجام شد (۲۸). این روش بر اساس تغییر رنگ محلول متانولی بنفش رنگ DPPH به محلول زرد رنگ دی فنیل- پیکریل هیدازین می‌باشد و یک روش معتبر، آسان، دقیق و مقرون به صرفه با قابلیت تکرارپذیری بالا است. ابتدا، ۱ میلی‌لیتر از عصاره

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها: تجزیه و تحلیل داده‌ها به صورت آزمایش فاکتوریل بر پایه طرح کاملاً تصادفی در ۳ تکرار و با نرم‌افزار آماری SAS نسخه ۹/۳ انجام گردید. مقایسه میانگین داده‌های

1- Folin-Ciocalteu
2- Na₂CO₃, Merck, Germani NO. 106392
3- 2, 2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl

نتایج و بحث

ارتفاع گیاه: نتایج تجزیه واریانس داده‌های ارتفاع گیاه نیل نشان داد که اثر ساده آبیاری در سطح احتمال $0/01 (P \leq 0/01)$ ، اثر ساده محلول‌پاشی با محرک‌های اسیدسالیسیلیک و گلایسین بتائین در سطح احتمال $0/01 (P \leq 0/01)$ و اثر متقابل آبیاری و محرک‌ها در سطح احتمال $0/05 (P \leq 0/05)$ بر ارتفاع گیاه نیل معنی‌دار بودند (جدول ۱). نتایج مقایسه میانگین اثر متقابل نشان داد که در هر سه سطح آبیاری، محلول‌پاشی با محرک‌های اسیدسالیسیلیک و گلایسین بتائین منجر به افزایش ارتفاع در گیاه نیل شد. بیش‌ترین میزان ارتفاع (میانگین $6/1$ سانتی‌متر) در تیمار محلول‌پاشی گلایسین بتائین با غلظت 100 میلی‌مولار در شرایط آبیاری 100 درصد ظرفیت زراعی مشاهده شد که در مقایسه با تیمار شاهد در شرایط آبیاری 100 درصد ظرفیت زراعی (میانگین $4/85$ سانتی‌متر) $25/77$ درصد افزایش داشته است (جدول ۲).

ارتفاع یکی از پارامترهای مهم رشد گیاه است که می‌تواند توسط عوامل مختلف درونی (ژنتیکی)، بیرونی (محیطی مثل بارندگی) و الیستورهای زیستی و غیرزیستی تحت‌تأثیر قرار بگیرد (20 و 61). کاهش ارتفاع در شرایط کم‌آبی می‌تواند به دلیل اختلال در تقسیم و طولی شدن سلولی، کاهش فشار آماس، کاهش تعداد گره، کاهش فاصله میان‌گره، اختلال در سرعت فتوسنتز و کاهش سنتز اسیمیلات‌های فتوسنتزی باشد (30 و 31).

پژوهش‌گران کاهش ارتفاع بوته بالنگو شیرازی را با کاهش مقدار آب خاک گزارش کردند (34). کاهش ارتفاع در گیاهان آویشن (62)، همیشه بهار (63) و مریم گلی (64) تحت تنش خشکی گزارش شده است. نتایج این پژوهش مبنی بر کاهش ارتفاع با کاهش میزان آبیاری با نتایج مطالعات فوق در یک

راستا بود. کاربرد برون‌زای گلایسین بتائین می‌تواند با فعال کردن مکانیسم‌های دفاعی و افزایش احتباس آب سلولی به بهبود پارامترهای رشد و نمو گیاه تحت تنش کمک کند (14 و 65). به‌نظر می‌رسد گلایسین بتائین با احتباس آب سلولی باعث افزایش فشار تورگور و در نتیجه افزایش تقسیم و طولی شدن سلولی می‌شود که این امر افزایش ارتفاع گیاه را در پی دارد. محلول‌پاشی 100 میلی‌مولار گلایسین بتائین ارتفاع شمعدانی عطری را در شرایط خشکی 40 درصد ظرفیت زراعی افزایش داد (66).

تعداد انشعابات جانبی: طبق نتایج تجزیه واریانس داده‌های تعداد انشعابات جانبی، اثر ساده آبیاری در سطح احتمال $0/01 (P \leq 0/01)$ ، اثر ساده محلول‌پاشی با محرک‌های اسید سالیسیلیک و گلایسین بتائین در سطح احتمال $0/01 (P \leq 0/01)$ و اثر متقابل آبیاری و محرک‌ها در سطح احتمال $0/05 (P \leq 0/05)$ بر این صفت تأثیر معنی‌داری داشتند (جدول ۱). بیش‌ترین تعداد انشعابات جانبی (میانگین $7/3$) در تیمار محلول‌پاشی گلایسین بتائین با غلظت 50 میلی‌مولار در شرایط آبیاری 100 درصد ظرفیت زراعی حاصل شد که در مقایسه با تیمار شاهد (عدم محلول‌پاشی) در شرایط آبیاری 100 درصد ظرفیت زراعی (میانگین $4/9$) $48/98$ درصد افزایش داشته است (جدول ۲).

شاخه‌دهی در شرایط کم‌آبی یک ویژگی نامطلوب می‌باشد؛ زیرا باعث مصرف رطوبت خاک و از دست دادن رطوبت به‌واسطه تعرق می‌شود (29). هم‌چنین، گیاه در شرایط کم‌آبی توسعه اندام‌های رویشی مثل شاخه‌های جانبی و ارتفاع را کاهش می‌دهد تا اسیمیلات‌های فتوسنتزی را برای حفظ بقای خود به رشد اندام‌های زایشی هدایت کند (30). بنابراین با کاهش رشد رویشی از تعداد انشعابات نیز کاسته می‌شود. در این زمینه، مشخص شده است که رشد گیاه عمدتاً با تقسیم، طولی شدن و تمایز سلولی انجام

می‌شود و خشکی از طریق اختلال در فرآیند میتوز و افزایش طول سلول، باعث تضعیف رشد می‌شود (۳۱). در توافق با نتایج این پژوهش درباره کاهش تعداد انشعابات در اثر خشکی، گیاه مرزه نیز گزارشی انتشار یافته است (۳۲).

جدول ۱- تجزیه واریانس اثرات آبیاری و محلول پاشی محرک‌ها بر پارامترهای ریخت‌شناسی گیاه نیل.

Table 1. Variance analysis of the effects of irrigation and spraying stimulants on the morphological parameters of the indigo plant.

میانگین مربعات Mean squared							
وزن تر ریشه Root wet weight	طول ریشه Root length	وزن خشک بوته Dry weight of the plant	وزن تر بوته Fresh weight of the plant	تعداد انشعابات جانبی The number of lateral branches	ارتفاع Height	درجه آزادی Degrees of freedom	منبع تغییرات Source of variation
0.00109**	30.988**	3755.327**	2670.445**	15.481**	22.114**	2	آبیاری Irrigation
0.00044**	12.375**	831.39**	903.47**	5.587**	1.975**	4	محرک Stimulant
0.00013**	1.058*	118.913*	160.455*	1.148*	0.4061*	8	آبیاری × محرک Irrigation × Stimulant
0.0000135	1.4009	42.995	68.793	0.5045	0.178	30	خطای آزمایش Error
16.2	12	14.2	14.4	13.7	9.4	-	ضریب تغییرات (درصد) Coefficient of variation

* و ** به ترتیب غیرمعنی‌دار و معنی‌دار در سطوح احتمال ۰/۰۵ و ۰/۰۱

* and ** are respectively significant at the probability levels of 0.05 and 0.01

وزن تر و خشک بوته: بر اساس نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده‌های وزن تر و خشک بوته، اثر ساده آبیاری در سطح احتمال ۰/۰۱ ($P \leq 0.01$)، اثر ساده محلول پاشی با محرک‌های اسیدسالیسیلیک و گلاسیسین بتائین در سطح احتمال ۰/۰۱ ($P \leq 0.01$) و اثر متقابل آبیاری و محرک‌ها در سطح احتمال ۰/۰۵ ($P \leq 0.05$) بر این صفات معنی‌دار بودند (جدول ۱). کم‌ترین میزان وزن تر بوته (میانگین ۳۵/۳۸ گرم در بوته) مربوط به تیمار شاهد (عدم محلول پاشی) در شرایط آبیاری ۵۰ درصد ظرفیت زراعی بود که نسبت به تیمار شاهد (عدم محلول پاشی) در شرایط آبیاری ۱۰۰ درصد ظرفیت زراعی (میانگین ۵۴/۴۹ گرم در بوته) ۴۸/۹۶ درصد افزایش داشته است (جدول ۲). نتایج مقایسه میانگین اثر متقابل آبیاری و محرک‌ها در صفت وزن خشک بوته نشان داد که کم‌ترین وزن خشک بوته (میانگین ۲۱/۹۷ گرم در بوته) مربوط به تیمار شاهد (عدم محلول پاشی) در شرایط آبیاری ۵۰ درصد ظرفیت

بوته) ۳۵/۰۷ درصد کاهش داشته است (جدول ۲). بیش‌ترین میزان وزن تر بوته (میانگین ۸۱/۱۷ گرم در بوته) در تیمار محلول پاشی گلاسیسین بتائین (غلظت ۱۰۰ میلی‌مولار) در شرایط آبیاری ۱۰۰ درصد ظرفیت زراعی به‌دست آمد که در مقایسه با تیمار شاهد (عدم محلول پاشی) در شرایط آبیاری ۱۰۰ درصد ظرفیت زراعی (میانگین ۵۴/۴۹ گرم در بوته) ۴۸/۹۶ درصد افزایش داشته است (جدول ۲). نتایج مقایسه میانگین اثر متقابل آبیاری و محرک‌ها در صفت وزن خشک بوته نشان داد که کم‌ترین وزن خشک بوته (میانگین ۲۱/۹۷ گرم در بوته) مربوط به تیمار شاهد (عدم محلول پاشی) در شرایط آبیاری ۱۰۰ درصد ظرفیت زراعی (میانگین ۵۴/۴۹ گرم در

در شرایط آبیاری ۱۰۰ درصد ظرفیت زراعی حاصل شد که در مقایسه با تیمار شاهد (عدم محلول‌پاشی) در شرایط آبیاری ۱۰۰ درصد ظرفیت زراعی (میانگین ۶۷/۰۳ گرم در بوته) ۵۹/۶۱ درصد افزایش داشت (جدول ۲).

زراعی بود که نسبت به تیمار شاهد (عدم محلول‌پاشی) در شرایط آبیاری ۱۰۰ درصد ظرفیت زراعی (میانگین ۶۷/۰۳ گرم در بوته) ۵۲/۲۷ درصد کاهش داشته است (جدول ۲). بیش‌ترین میزان وزن خشک بوته (میانگین ۷۳/۴۷ گرم در بوته) در تیمار محلول‌پاشی گلیسین بتائین با غلظت ۱۰۰ میلی‌مولار

جدول ۲- مقایسه میانگین اثر متقابل سطوح مختلف آبیاری × محرک‌های زیستی بر صفات ریخت‌شناسی گیاه نیل.

Table 2. Mean comparisons of the interaction effect of irrigation levels × biostimulants on morphological traits of Indigo.

وزن خشک بوته Dry weight of plant	وزن تر بوته Fresh weight of plant	تعداد انشعابات جانبی Lateral branch	ارتفاع ساقه Stem length (Cm)	غلظت محرک Concentration	محرک زیستی Biostimulants	سطوح آبیاری Irrigation levels
46.03 ^{cd}	54.49 ^{cd}	4.9 ^{defg}	4.85 ^{bcd}	0	شاهد Control	۱۰۰ درصد ظرفیت زراعی 100% F.C.
55.76 ^{bc}	66.97 ^{abc}	5.83 ^{bcd}	5.6 ^{ab}	2 mM	سالیسیلیک اسید Salicylic acid	
67.04 ^{ab}	75.82 ^{ab}	5.76 ^{bcd}	5.61 ^{ab}	4 mM	سالیسیلیک اسید Salicylic acid	
71.2 ^a	80.11 ^{ab}	7.3 ^a	6 ^a	50 mM	گلیسین بتائین Glycine betain	
73.47 ^a	81.17 ^a	7 ^{ab}	6.1 ^a	100 mM	گلیسین بتائین Glycine betain	
29.04 ^{ef}	40.72 ^{de}	3.9 ^{gh}	3.65 ^e	0	شاهد Control	۷۵ درصد ظرفیت زراعی 75% F.C.
38.67 ^{de}	74.34 ^{de}	4.53 ^{efg}	4.5 ^d	2 mM	سالیسیلیک اسید Salicylic acid	
37.77 ^{de}	73.31 ^{de}	5.33 ^{cdef}	4.87 ^{bcd}	4 mM	سالیسیلیک اسید Salicylic acid	
50.73 ^c	65.18 ^{bc}	6 ^{bcd}	4.6 ^{cd}	50 mM	گلیسین بتائین Glycine betain	
65.11 ^{ab}	79.34 ^{ab}	6.5 ^{abc}	5.33 ^{abc}	100 mM	گلیسین بتائین Glycine betain	
21.97 ^f	35.38 ^e	3 ^h	2.41 ^g	0	شاهد Control	۵۰ درصد ظرفیت زراعی 50 % F.C.
31.87 ^{ef}	46.14 ^{de}	4.5 ^{efg}	3.65 ^e	2 mM	سالیسیلیک اسید Salicylic acid	
33.95 ^{def}	48.64 ^{de}	5 ^d	3.35 ^{ef}	4 mM	سالیسیلیک اسید Salicylic acid	
34.73 ^{de}	47.95 ^{de}	4 ^{gh}	3.75 ^e	50 mM	گلیسین بتائین Glycine betain	
3.52 ^{ef}	47.8 ^{de}	4 ^{gh}	2.93 ^{fg}	100 mM	گلیسین بتائین Glycine betain	

میانگین‌های دارای حداقل یک حرف مشترک فاقد اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد هستند

Means with at least one similar letter in each column, are not significantly different in 5% probability level

اثر ساده محلول‌پاشی با محرک‌های اسید سالیسیلیک و گلاسیسین بتائین در سطح احتمال $0/01$ ($P \leq 0/01$) بر مقادیر کلروفیل *a* و کلروفیل *b* معنی‌دار بودند. اثر متقابل آبیاری و محرک‌ها در سطح احتمال $0/05$ ($P \leq 0/05$) بر صفت محتوای کلروفیل *a* و در سطح احتمال $0/01$ ($P \leq 0/01$) بر صفت محتوای کلروفیل *b* تأثیر معنی‌داری داشت (جدول ۳). همان‌طور که از نتایج مقایسه میانگین اثر متقابل آبیاری و محرک‌ها مندرج در جدول ۴ قابل مشاهده است؛ در هر سه سطح آبیاری، محلول‌پاشی با محرک‌های اسید سالیسیلیک و گلاسیسین بتائین به‌طور معنی‌داری محتوای کلروفیل *a* و محتوای کلروفیل *b* را در گیاه نیل افزایش داد. کم‌ترین میزان کلروفیل *a* (میانگین $3/7$ میلی‌گرم در گرم وزن تر) مربوط به تیمار شاهد (عدم محلول‌پاشی) در شرایط آبیاری 50 درصد ظرفیت زراعی بود. بیش‌ترین میزان کلروفیل *a* (میانگین $10/8$ میلی‌گرم در گرم وزن تر) در تیمار محلول‌پاشی گلاسیسین بتائین با غلظت 100 میلی‌مولار در شرایط آبیاری 100 درصد ظرفیت زراعی مشاهده شد (جدول ۴).

نتایج مقایسه میانگین اثر متقابل آبیاری و محرک‌ها در صفت محتوای کلروفیل *b* نشان داد که کم‌ترین مقدار کلروفیل *b* (میانگین $1/5$ میلی‌گرم در گرم وزن تر) مربوط به تیمار شاهد (عدم محلول‌پاشی) در شرایط آبیاری 50 درصد ظرفیت زراعی بود و بیش‌ترین میزان کلروفیل *b* (میانگین $7/4$ میلی‌گرم در گرم وزن تر) در تیمار محلول‌پاشی گلاسیسین بتائین با غلظت 100 میلی‌مولار در شرایط آبیاری 100 درصد ظرفیت زراعی به‌دست آمد که در مقایسه با تیمار شاهد (عدم محلول‌پاشی) در شرایط آبیاری 100 درصد ظرفیت زراعی (میانگین $2/9$ میلی‌گرم در گرم وزن تر) $157/63$ درصد افزایش داشت (جدول ۴).

در توافق با نتایج این پژوهش مبنی بر کاهش وزن تر و خشک بوته در اثر کم‌آبی، سایر مطالعات کاهش وزن تر و خشک بوته را در گیاهان ذرت (۲۰)، گلرنگ (۱۴)، اسطوخودوس (۳۳) و بالنگو شیرازی (۳۴) تحت تنش کم‌آبی گزارش کرده‌اند.

مشخص شده است که اسید سالیسیلیک با افزایش کلروفیل و فعالیت آنزیم رابیسکو و بهبود فتوسنتز و نیز جذب بیش‌تر عناصر، موجب بهبود رشد اندام هوایی تحت تنش خشکی می‌شود (۸ و ۳۵). در این راستا، گزارش شده است که کاربرد 10 میلی‌گرم در لیتر اسید سالیسیلیک وزن تر و خشک بوته را در گیاه اکلیل کوهی تحت رژیم‌های کم‌آبی افزایش داد (۳۶). به‌طور مشابه با نتایج این پژوهش مبنی بر افزایش وزن تر و خشک بوته ناشی از اسید سالیسیلیک، سایر پژوهش‌گران افزایش وزن تر و خشک بوته در اثر تیمار اسید سالیسیلیک را در گیاهان ذرت (۲۰) و همیشه بهار (۳۵) تحت تنش کم‌آبی گزارش کرده‌اند. در تأیید نتایج ما سایر پژوهش‌گران (۲۰) نیز گزارش کردند که اسپری گلاسیسین بتائین ($11/5$ گرم بر لیتر) و اسید سالیسیلیک (140 میلی‌گرم بر لیتر) به‌طور قابل‌توجهی باعث افزایش ارتفاع، وزن تر و خشک بوته در ذرت شد و اثر مثبت گلاسیسین بتائین بر وزن تر و خشک بوته بیش‌تر از اسید سالیسیلیک بود. بهبود در رشد ناشی از گلاسیسین بتائین می‌تواند به این دلیل باشد که گلاسیسین بتائین به پدیده تنظیم اسمزی کمک می‌کند؛ ساختار آنزیم روبیسکو را تثبیت می‌کند و نیز از غشای سلولی مثل غشای تیلاکوئیدی و پروتئین‌ها محافظت می‌کند (۱۴).

رنگدانه‌های فتوسنتزی

محتوای کلروفیل *a* و کلروفیل *b*: طبق نتایج تجزیه واریانس داده‌های محتوای کلروفیل *a* و کلروفیل *b*، اثر ساده آبیاری در سطح احتمال $0/01$ ($P \leq 0/01$) و

می‌شود (۷۰). در توافق با نتایج این پژوهش مبنی بر بهبود کلروفیل و کاروتنوئید با اسید سالیسیلیک در تنش خشکی، گزارش شده است که استفاده از اسید سالیسیلیک در ذرت (۲۰)، ریحان (۷۰)، کارلا (۱۰)، و موسیر (۶۸) محتوای کلروفیل و کاروتنوئید را به‌ویژه در شرایط تنش خشکی افزایش می‌دهد.

کاربرد گلاسیسین بتائین مقادیر رنگدانه‌های کلروفیل a, b و کاروتنوئیدها را در کلم وحشی افزایش داد (۷۹). این افزایش در غلظت رنگدانه‌ها ممکن است به دلیل نقش گلاسیسین بتائین در مهار تجمع گونه‌های فعال اکسیژن، محافظت از دستگاه فتوسنتزی، تجمع املاح سازگار برای حفظ آماس در سلول‌ها، فعال‌سازی برخی از ژن‌های مرتبط با تنش، تثبیت ساختارهای پروتئین‌ها و رویسکو و محافظت از غشاهای سلول‌های گیاهان در شرایط کمبود آب باشد (۸۰).

درواقع، در روش محلول‌پاشی گلاسیسین بتائین می‌تواند به سرعت به برگ نفوذ کند و به‌راحتی به سایر اندام‌های گیاهی منتقل شود، جایی که به بهبود تحمل به انواع مختلف تنش غیر زنده کمک می‌کند (۶۵).

محتوای کاروتنوئید: بر اساس نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده‌های محتوای کاروتنوئید، اثر ساده آبیاری در سطح احتمال ۰/۰۱ ($P \leq 0/01$)، اثر ساده محلول‌پاشی با محرک‌های اسیدسالیسیلیک و گلاسیسین بتائین در سطح احتمال ۰/۰۱ ($P \leq 0/01$) و اثر متقابل آبیاری و محرک‌ها در سطح احتمال ۰/۰۵ ($P \leq 0/05$) بر این صفت معنی‌دار بودند (جدول ۳). همان‌طور که از نتایج مقایسه میانگین اثر متقابل آبیاری و محرک‌ها مندرج در جدول ۴ مشاهده می‌شود؛ در هر سه سطح آبیاری، محلول‌پاشی با محرک‌های اسید سالیسیلیک و گلاسیسین بتائین به‌طور معنی‌داری محتوای کاروتنوئید را در گیاه نیل افزایش داد. کم‌ترین میزان کاروتنوئید

کاهش محتوای کلروفیل‌ها و کاروتنوئیدها می‌تواند نشانه‌ای از آسیب اکسیداتیو باشد که لیپیدها و پروتئین‌های غشای کلروپلاست و رنگدانه‌های فتوسنتزی گیاه را مورد هدف قرار داده است (۶۷).

در مطالعه حاضر به‌نظر می‌رسد که گیاه نیل در شرایط کم‌آبی بیش‌تر انرژی خود را صرف تولید پرولین می‌کند؛ در نتیجه تولید کلروفیل و کاروتنوئید در این شرایط کاهش می‌یابد؛ چراکه گلوتمات پیش‌ماده سنتز کلروفیل و پرولین می‌باشد. کاهش کلروفیل در اثر تغییر متابولیسم نیتروژن به سمت سنتز پرولین در نتایج دیگر پژوهش‌گران گزارش شده است (۶۸). همچنین، کاهش رنگدانه‌های فتوسنتزی تحت شرایط تنش خشکی ممکن است به دلیل اختلال در بیوسنتز یا تجزیه رنگدانه‌های کلروفیل و ترکیبات مرتبط در اثر آنزیم تجزیه‌کننده کلروفیلاز باشد (۶۹). در راستای نتایج این پژوهش مبنی بر کاهش محتوای کلروفیل در اثر کم‌آبی، سایر پژوهش‌گران نتایج مشابهی را گزارش کردند. برای مثال، در گیاه همیشه‌بهار، اعمال تنش خشکی (۶۰ درصد ظرفیت زراعی) موجب کاهش کلروفیل a و کلروفیل b شد (۶۳).

مشخص شده است که کاربرد اسید سالیسیلیک به‌صورت برون‌زا یکپارچگی کلروپلاست و ساختارهای تیلاکوئید را در شرایط تنش خشکی حفظ می‌کند. بنابراین، بهبود مقادیر کلروفیل و کاروتنوئید گیاه نیل با محلول‌پاشی اسید سالیسیلیک تحت شرایط کم‌آبی را می‌توان به نقش آنتی‌اکسیدانی اسید سالیسیلیک و نیز حفظ یکپارچگی غشاهای کلروپلاست و تیلاکوئید نسبت داد. مشخص شده است که اسید سالیسیلیک از طریق حفظ یکپارچگی غشای تیلاکوئید عمل کرده و از فتوسنتز II در برابر تنش اکسیداتیو محافظت می‌کند که این امر مانع کاهش کلروفیل و کاروتنوئید در شرایط تنش خشکی

گونه‌های اکسیژن فعال در این شرایط و خسارت آن‌ها به غشاهای کلروپلاست و تیلاکوئید باشد. در این زمینه، گزارش شده است که تنش کم‌آبی به طور معمول با تولید گونه‌های اکسیژن فعال در تیلاکوئیدها توانایی کاهش میزان کاروتنوئید در بافت را دارد (۳۷). به‌طور مشابه، پژوهش‌گران کاهش مقدار کاروتنوئیدها را در رازیانه در معرض خشکی اعلام کردند (۳۸). هم‌راستا با نتایج این پژوهش، کاهش محتوای کاروتنوئید در سطوح مختلف تنش کم‌آبی در گیاهان همیشه بهار (۳۹) و بالنگو (۳۴) گزارش شده است.

(میانگین ۰/۱۶ میلی‌گرم در گرم وزن تر) مربوط به تیمار شاهد (عدم محلول پاشی) در شرایط آبیاری ۵۰ درصد ظرفیت زراعی بود. بیش‌ترین میزان کاروتنوئید (میانگین ۰/۵۳ میلی‌گرم در گرم وزن تر) در تیمار محلول پاشی گلايسين بتائين با غلظت ۱۰۰ میلی‌مولار در شرایط آبیاری ۱۰۰ درصد ظرفیت زراعی حاصل شد که در مقایسه با تیمار شاهد (عدم محلول پاشی) در شرایط آبیاری ۱۰۰ درصد ظرفیت زراعی (میانگین ۰/۲۹ میلی‌گرم در گرم وزن تر) ۸۰/۰۴ درصد افزایش داشته است (جدول ۴).

در این پژوهش، کاهش محتوای کاروتنوئید در اثر تنش کم‌آبی حاصل گردید که می‌تواند به دلیل افزایش

جدول ۳- تجزیه واریانس اثرات آبیاری و محلول پاشی محرک‌های اسید سالیسیلیک و گلايسين بتائين بر صفات فیتوشیمیایی نیل.

Table 3. Variance analysis of the effects of irrigation and spraying stimulants on the morphological parameters of the indigo plant.

میانگین مربعات Mean squared									منابع تغییر Sources of variats
آنتی‌اکسیدان Antioxidant activity	فلاونوئید Total flavonoieides	فنل Total Phenol	پروлін Proline	آنتوسیانین Anthocyanin	کاروتنوئید Carotenoid	کلروفیل b Chlorophyll b	کلروفیل a Chlorophyll a	درجه آزادی Degrees of freedom	
184.575**	3408.737**	58955.66**	306.46**	281.31**	0.01942**	0.30303**	0.4149**	2	آبیاری Irrigation
79.137**	3912.512**	14900.18**	50.93**	92.80**	0.0303**	0.12058**	0.1639**	4	محرک Stimulant
23.901*	719.753**	3092.75**	2.85*	11.784*	0.0053*	0.01889**	0.0521*	8	آبیاری × محرک Irrigation × Stimulant
10.491	130.84	430.244	11.173	5.175	0.00217	0.00398	0.01966	30	خطای آزمایش Error
9	11.4	12	10.4	18.5	14.5	16	20.1	-	ضریب تغییرات (درصد) Coefficient of variation

* و ** به ترتیب غیرمعنی دار و معنی دار در سطوح احتمال ۰/۰۵ و ۰/۰۱

* and ** are respectively significant at the probability levels of 0.05 and 0.01

جدول ۴- مقایسه میانگین اثر متقابل سطوح مختلف آبیاری × محرک‌های زیستی بر صفات فیتوشیمیایی گیاه نیل.

Table 4. Mean comparisons of the interaction effect of irrigation levels × biostimulants on phytochemical traits of Indigo.

آنتی اکسیدان Antioxidant activity	فلاونوئید Total flavonoids	فنل Total phenol	پرولین Proline	آنتوسیانین Anthocyanin	کاروتنوئید Carotenoid	کلروفیل b Chlorophyll b	کلروفیل a Chlorophyll a	غلظت محرک Concentration	محرک زیستی Biostimulants	سطح آبیاری Irrigation levels
46.02 ^c	87.10 ^{def}	35.09 ⁱ	24.28 ^e	11.16 ^{cd}	0.29 ^{ef}	2.9 ^{gh}	6.1 ^{def}	0	شاهد Control	
53.36 ^c	99.35 ^{cd}	39.03 ^h	27.05 ^{de}	16.75 ^b	0.45 ^{bc}	5.7 ^{bc}	9.8 ^{ab}	2 mM	سالیسیلیک اسید Salicylic acid	۱۰۰ درصد ظرفیت زراعی
53.94 ^c	97.24 ^{cde}	172.98 ^f	27.55 ^{cde}	13.86 ^{bc}	0.41 ^{cd}	4.3 ^{de}	7.2 ^{cde}	4 mM	سالیسیلیک اسید Salicylic acid	
56.06 ^c	129.35 ^b	60.46 ^{hi}	27.96 ^{bcd}	23.01 ^a	0.52 ^{ab}	6.8 ^{ab}	10.04 ^{ab}	50 mM	گلیسین بتائین Glycine betaine	100% FC
54.85 ^c	151.50 ^a	169.82 ^f	29.41 ^{cde}	21.03 ^a	0.16 ^h	7.4 ^a	10.8 ^a	100 mM	گلیسین بتائین Glycine betaine	
55.14 ^c	75.48 ^{ef}	178.86 ^f	27.78 ^{abc}	7.36 ^{de}	0.23 ^{fgh}	2.4 ^{hi}	5 ^{ef}	0	شاهد Control	
60.22 ^b	85.37 ^{def}	199.89 ^{cdef}	33.55 ^{ab}	9.35 ^{de}	0.28 ^{ef}	3 ^{fgh}	5.8 ^{def}	2 mM	سالیسیلیک اسید Salicylic acid	۷۵ درصد ظرفیت زراعی
60.96 ^b	92.26 ^{de}	219.65 ^{bcd}	34.8 ^{ab}	10.15 ^{cde}	0.28 ^{ef}	3.1 ^{fgh}	6.3 ^{cdef}	4 mM	سالیسیلیک اسید Salicylic acid	
62.45 ^b	152.47 ^a	275.51 ^{ab}	34.90 ^a	16.73 ^b	0.36 ^{de}	5.2 ^{cd}	8.8 ^{abc}	50 mM	گلیسین بتائین Glycine betaine	75% FC
68.47 ^a	115.80 ^{bc}	294.3 ^a	36.92 ^{abcd}	11.33 ^{cd}	0.29 ^{ef}	4.1 ^{def}	6.9 ^{cde}	100 mM	گلیسین بتائین Glycine betaine	
50.88 ^d	66.11 ^f	134.4 ^g	32.94 ^a	6.63 ^c	0.53 ^a	1.5 ⁱ	3.7 ^f	0	شاهد Control	
56.98 ^c	82.04 ^{def}	189.53 ^{def}	35.95 ^a	8.25 ^{de}	0.18 ^{gh}	2.4 ^{hi}	4.7 ^{ef}	2 mM	سالیسیلیک اسید Salicylic acid	۵۰ درصد ظرفیت زراعی
55.98 ^c	87.58 ^{def}	183.51 ^{ef}	37.04 ^a	8.86 ^{cd}	0.25 ^{fg}	2.8 ^{gh}	6.5 ^{cde}	4 mM	سالیسیلیک اسید Salicylic acid	
57.30 ^c	96.51 ^{cde}	223.42 ^{bed}	36.40 ^a	10.6 ^{cde}	0.25 ^{fg}	2.7 ^{gh}	4.8 ^{ef}	50 mM	گلیسین بتائین Glycine betaine	50 % FC
57.81 ^{bc}	85.44 ^{def}	230.18 ^{bc}	37.67 ^a	9.91 ^{cde}	0.26 ^{fg}	3.8 ^{efg}	7.6 ^{cd}	100 mM	گلیسین بتائین Glycine betaine	

در هر ستون، میانگین‌هایی که دارای حداقل یک حرف مشابه هستند؛ طبق آزمون دانکن در سطح احتمال ۵ درصد اختلاف معنی‌داری ندارند. In each column, there is no significant difference between treatments with common letters according to Duncan test in 5% probability level

نتایج مقایسه میانگین نشان داد که با کاهش ظرفیت زراعی از ۱۰۰ درصد تا ۵۰ درصد (تنش خشکی) میزان پرولین (۵/۶ درصد) افزایش یافت (جدول ۴). بیش‌ترین مقدار پرولین (میانگین ۳۷/۶۷ میکرومول در گرم) در تیمار محلول‌پاشی گلیسین بتائین ۱۰۰ میلی‌مولار در شرایط آبیاری ۵۰ درصد ظرفیت زراعی مشاهده شد که در مقایسه با تیمار شاهد (عدم

محتوای پرولین: نتایج تجزیه واریانس داده‌های محتوای پرولین نشان داد که اثر ساده آبیاری در سطح احتمال ۰/۰۱ (P≤۰/۰۱) و اثر ساده محلول‌پاشی با محرک‌های اسید سالیسیلیک و گلیسین بتائین در سطح احتمال ۰/۰۱ (P≤۰/۰۱) بر این صفت تأثیر معنی‌داری داشتند (جدول ۳). اثر متقابل آبیاری و محرک‌ها در این صفت معنی‌دار نبود (جدول ۳).

آویشن معمولی و آویشن کوهی (۲۱)، گندم (۷۲) و ذرت (۲۰) مطابقت داشت. به گفته پژوهش‌گران (۱۴) افزایش تولید پرولین از طریق افزایش ۷-گلوتامیل کیناز و کاهش فعالیت پرولین اکسیداز پس از کاربرد اسید سالیسیلیک منجر به افزایش تحمل به تنش خشکی شد.

در این پژوهش، افزایش محتوی پرولین با محلول‌پاشی گلايسين بتائين حاصل گردید و اثر مثبت گلايسين بتائين در مقایسه با اسید سالیسیلیک بیش‌تر بود. این نتیجه با نتایج پژوهش‌گرانی مطابقت داشت که بیان کردند محلول‌پاشی گلايسين بتائين (۱۱/۵ گرم بر لیتر) و اسید سالیسیلیک (۱۴۰ میلی‌گرم بر لیتر) به‌طور قابل‌توجهی موجب افزایش محتوی پرولین در گیاه ذرت شد و اثر مثبت گلايسين بتائين بر پرولین بیش‌تر از اسید سالیسیلیک بود (۲۰). به‌طور مشابه، کاربرد برونزای گلايسين بتائين در گندم منجر به افزایش تحمل در برابر تنش خشکی از طریق تجمع پرولین شده است (۱۸). هم‌چنین، محلول‌پاشی گلايسين بتائين باعث افزایش محتوی پرولین در برنج (۷۴)، ذرت (۱۵) و یولاف (۷۵) شد که بیانگر نقش مثبت گلايسين بتائين در افزایش تحمل به شرایط تنش‌زا به وسیله تنظیم مثبت مکانیسم‌های دخیل در رشد و تولید محصول در شرایط تنش می‌باشد (۱۵). این نتایج نشان می‌دهد که تجمع پرولین در گیاهان محلول‌پاشی شده با گلايسين بتائين نقش کلیدی به‌عنوان مکانیسم دفاع تنظیم اسمزی تحت تنش کم‌آبی ایفا می‌کند.

محتوای آنتوسیانین: طبق نتایج تجزیه واریانس داده‌های محتوای آنتوسیانین، اثر ساده آبیاری در سطح احتمال ۰/۰۱ ($P \leq 0/01$)، اثر ساده محلول‌پاشی با محرک‌های اسید سالیسیلیک و گلايسين بتائين در سطح احتمال ۰/۰۱ ($P \leq 0/01$) و اثر متقابل آبیاری و محرک‌ها در سطح احتمال ۰/۰۵ ($P \leq 0/05$) بر این

محلول‌پاشی) در شرایط آبیاری ۱۰۰ درصد ظرفیت زراعی (میانگین ۲۴/۲۹ میکرومول در گرم) ۵۵/۱ درصد افزایش داشته است (جدول ۴).

در راستای نتایج ما مبنی بر افزایش محتوی پرولین در شرایط کم‌آبی، سایر پژوهش‌گران نتایج مشابهی را گزارش کردند. برای مثال، با افزایش شدت تنش تا ۳۰ درصد ظرفیت زراعی، مقدار پرولین در گیاه دارویی گشنیز زیاد شد (۴۰). به‌طور مشابه، گیاه ذرت سطوح پرولین برگ را در شرایط تنش خشکی افزایش داد (۱۵). هم‌چنین، نتایج این مطالعه با نتایج پژوهش‌ها در گیاهان همیشه بهار (۳۹)، بالنگو (۳۴) و برنج (۴۱) مطابقت داشت. از آن‌جا که تجمع بالای پرولین به‌عنوان یک مکانیسم برای تحمل تنش در نظر گرفته می‌شود (۱۴ و ۴۲) می‌توان بیان کرد که گیاه نیل از طریق انباشت پرولین شرایط کم‌آبی را تحمل می‌کند.

اسید سالیسیلیک باعث فرآیند انتقال پویای پرولین می‌شود که برای نقش محافظتی پرولین در گیاهان حیاتی می‌باشد. تحت تیمار اسید سالیسیلیک، گلوتامیک-۷-سمی آلدئید^۱ به پیرولین-۵-کربوکسیلات^۲ در سیتوزول و کلروپلاست تبدیل شد و بنابراین انتقال پرولین را افزایش داد (۷۳). در توافق با نتایج ما مبنی بر افزایش محتوی پرولین با کاربرد اسید سالیسیلیک، افزایش محتوی پرولین در گیاه همیشه‌بهار هنگامی که از اسید سالیسیلیک استفاده شد؛ گزارش شده است (۳۵). هم‌چنین، تیمار اسید سالیسیلیک در غلظت ۳۰۰ میلی‌گرم در لیتر محتوا پرولین در گیاه دارویی به‌لیمو را افزایش داد و منجر به افزایش سازگاری گیاه در شرایط کمبود آب شد (۴۲). نتایج ما با نتایج سایر مطالعات در مورد افزایش محتوی پرولین با کاربرد اسید سالیسیلیک در گیاهان بابونه (۷۱)، ریحان (۷۰)،

1- Glutamic- γ -semi-aldehyde
2- Pyrroline-5- carboxylate

سطح احتمال $0/01 (P \leq 0/01)$ ، اثر ساده محلول‌پاشی با محرک‌های اسید سالیسیلیک و گلایسین بتائین در سطح احتمال $0/01 (P \leq 0/01)$ و اثر متقابل آبیاری و محرک‌ها در سطح احتمال $0/01 (P \leq 0/01)$ بر این صفت معنی‌دار بودند (جدول ۳). همان‌طور که از نتایج مقایسه میانگین اثر متقابل آبیاری و محرک‌ها مندرج در جدول ۴ قابل مشاهده است؛ بیش‌ترین میزان فنول کل (میانگین $294/3$ میلی‌گرم اسید گالیک در گرم) در تیمار محلول‌پاشی گلایسین بتائین با غلظت 100 میلی‌مولار در شرایط آبیاری 75 درصد ظرفیت زراعی حاصل شد (جدول ۴).

در این آزمایش، غلظت فنول کل در شرایط کم‌آبی در گیاه نیل افزایش یافت. در راستای این نتیجه، سایر پژوهش‌گران نتایج مشابهی را گزارش کردند. برای مثال، در گلرنگ کاهش میزان آب (60 درصد ظرفیت زراعی) به‌طور قابل‌توجهی میزان فنول‌های کل را افزایش داد (۱۴). به‌طور مشابه، افزایش فنول کل با محلول‌پاشی گلایسین بتائین در شرایط خشکی در کارلا (۱۰)، پنبه (۴۸) و گلرنگ (۱۴) گزارش شده است.

افزایش میزان فنول در شرایط کم‌آبی می‌تواند به‌دلیل افزایش آنزیم فنیل آلانین آمونیلایز باشد. در این زمینه گزارش شده است که در شرایط تنش‌زا به‌علت افزایش فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیلایز، میزان تولید ترکیبات فنولی افزایش می‌یابد (۷۶).

در این پژوهش، افزایش محتوای فنول گیاه نیل در اثر محلول‌پاشی اسید سالیسیلیک حاصل گردید. در این زمینه مشخص شده است که اسید سالیسیلیک منجر به افزایش فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیلایز از طریق افزایش رونویسی mRNA خاص آن می‌شود. این آنزیم موجب تبدیل فنیل آلانین به ترانس-سینامیک اسید می‌شود و باعث تداوم چرخه فنیل پروپانوییدی و تولید مواد فنولی می‌شود (۷۷).

صفت تأثیر معنی‌داری داشتند (جدول ۳). همان‌طور که از نتایج مقایسه میانگین اثر متقابل آبیاری و محرک‌ها مندرج در جدول ۴ مشاهده می‌شود؛ در هر سه سطح آبیاری، محلول‌پاشی با محرک‌های اسید سالیسیلیک و گلایسین بتائین به‌طور معنی‌داری محتوای آنتوسیانین را در گیاه نیل افزایش داد. این افزایش در تیمارهای گلایسین بتائین بیش‌تر از اسید سالیسیلیک بود. بیش‌ترین میزان آنتوسیانین (میانگین $23/01$ میلی‌گرم در گرم وزن تر) در تیمار محلول‌پاشی گلایسین بتائین با غلظت 50 میلی‌مولار در شرایط آبیاری 100 درصد ظرفیت زراعی مشاهده شد که در مقایسه با تیمار شاهد (عدم محلول‌پاشی) در شرایط آبیاری 100 درصد ظرفیت زراعی (میانگین $11/17$ میلی‌گرم در گرم وزن تر) $106/1$ درصد افزایش داشته است (جدول ۴).

آنتوسیانین‌ها یکی از آنتی‌اکسیدان‌های غیر آنزیمی هستند که توسط گیاهان برای مقابله با تنش اکسیداتیو تولید می‌شوند (۴۳). نتایج این پژوهش مبنی بر کاهش میزان آنتوسیانین با افزایش میزان کم‌آبی با نتایج مطالعاتی مطابق بود که کاهش میزان آنتوسیانین با افزایش کم‌آبی را در گیاهان سیاهدانه (۴۴)، نعنای فلفلی (۴۵) و رازیانه (۴۶) گزارش کردند. مقادیر تولید آنتوسیانین در شرایط خشکی به‌گونه گیاهی، مرحله رشدی گیاه، شدت تنش و مدت قرارگیری در تنش بستگی دارد (۴۷). در واقع، غلظت‌های پایین‌تر آنتوسیانین‌ها در گیاه نیل تحت تنش خشکی نشان می‌دهد که این ترکیبات برخلاف فنول‌ها، نقش ضعیفی در تحمل به تنش خشکی در این گیاه دارند. به دلیل فقدان منابع مکانیسمی که از طریق آن خشکی باعث کاهش غلظت آنتوسیانین‌ها می‌شود نیاز به بررسی بیشتر دارد.

محتوای فنول کل: نتایج تجزیه واریانس داده‌های محتوای فنول کل نشان داد که اثر ساده آبیاری در

در گرم) در تیمار محلول‌پاشی گلاسیسین بتائین با غلظت ۵۰ میلی‌مولار در شرایط آبیاری ۷۵ درصد ظرفیت زراعی به‌دست آمد که در مقایسه با تیمار شاهد (عدم محلول‌پاشی) در شرایط آبیاری ۱۰۰ درصد ظرفیت زراعی (میانگین ۸۷/۱۱ میلی‌گرم کوئرستین در گرم) ۷۵/۰۴ درصد افزایش داشته است. با این حال این تیمار از نظر بیش‌ترین مقدار فلاونوئید کل اختلاف آماری معنی‌داری را با تیمار گلاسیسین بتائین ۱۰۰ میلی‌مولار در شرایط آبیاری ۱۰۰ درصد ظرفیت زراعی نداشت (جدول ۴).

به‌طور مشابه، شرایط محدودیت آبی (۳۵ درصد ظرفیت زراعی) میزان فلاونوئید را در نعنای فلفلی کاهش داد (۴۶). غلظت‌های پایین‌تر فلاونوئید کل در گیاه نیل تحت تنش خشکی نشان می‌دهد که این ترکیب برخلاف فنول‌ها، نقش ضعیفی در تحمل به تنش خشکی در این گیاه دارند. در واقع، اثر تنش کم‌آبی بر مقدار (کاهش یا افزایش) متابولیت‌های ثانویه گیاهی یک پدیده خاص گونه است و به شدت تنش نیز بستگی دارد (۴۱ و ۴۹).

در این پژوهش، گلاسیسین بتائین موجب افزایش محتوی فلاونوئید گیاه نیل در شرایط کم‌آبی شد و تأثیر مثبت آن بیش‌تر از اسید سالیسیلیک بود. در راستای این نتیجه، پژوهش‌گران گزارش کردند که محلول‌پاشی گلاسیسین بتائین (۵۰ و ۱۰۰ میلی‌مولار) در هر دو شرایط آبیاری نرمال (۱۰۰ درصد ظرفیت زراعی) و تنش خشکی (۵۰ درصد ظرفیت زراعی) به‌طور معنی‌داری محتوی فلاونوئید را در گیاه کارلا افزایش داد (۱۰). افزایش مقدار فلاونوئید کل با محلول‌پاشی گلاسیسین بتائین می‌تواند به علت نقش تنظیم‌کنندگی یا سیگنال‌دهی آن‌ها در بسیاری از فرآیندهای فیزیولوژیکی و زیست‌شیمیایی، هم‌چنین فرایندهای انطباق گیاه در شرایط تنش باشد (۴۳).

از آن‌جا که تولید متابولیت‌های ثانویه در گیاه تحت تأثیر متابولیت‌های اولیه است؛ بنابراین هر عاملی که موجب تقویت فتوسنتز و متابولیت‌های اولیه در گیاه شود؛ افزایش مقادیر متابولیت‌های ثانویه را نیز به‌دنبال دارد (۳۳). افزایش فنول کل توسط گلاسیسین بتائین به صورت کاربرد برون‌زا می‌تواند به دلیل این واقعیت باشد که گلاسیسین بتائین به عنوان یک ماده سیگنال‌دهنده در گیاهان در طول تنش خشکی عمل می‌کند (۱۴ و ۷۸).

محتوای فلاونوئید کل: بر اساس نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده‌های محتوای فلاونوئید کل، اثر ساده آبیاری در سطح احتمال ۰/۰۱ ($P \leq 0/01$)، اثر ساده محلول‌پاشی با محرک‌های اسید سالیسیلیک و گلاسیسین بتائین در سطح احتمال ۰/۰۱ ($P \leq 0/01$) و اثر متقابل آبیاری و محرک‌ها در سطح احتمال ۰/۰۱ ($P \leq 0/01$) بر این صفت معنی‌دار بودند (جدول ۳). نتایج مقایسه میانگین اثر متقابل آبیاری و محرک‌ها در صفت محتوای فلاونوئید کل نشان داد که در هر سه سطح آبیاری، محلول‌پاشی با محرک‌های اسید سالیسیلیک و گلاسیسین بتائین مقدار آنتوسیانین را در گیاه نیل افزایش داد. بیش‌ترین تأثیر مثبت در شرایط آبیاری ۱۰۰ درصد ظرفیت زراعی مربوط به تیمار گلاسیسین بتائین ۱۰۰ میلی‌مولار بود و در شرایط آبیاری ۷۵ درصد و ۵۰ درصد ظرفیت زراعی در تیمار گلاسیسین بتائین ۵۰ میلی‌مولار مشاهده شد (جدول ۴). کم‌ترین مقدار فلاونوئید کل (میانگین ۶۶/۱۲ میلی‌گرم کوئرستین در گرم) مربوط به تیمار شاهد (عدم محلول‌پاشی) در شرایط آبیاری ۵۰ درصد ظرفیت زراعی بود که نسبت به تیمار شاهد (عدم محلول‌پاشی) در شرایط آبیاری ۱۰۰ درصد ظرفیت زراعی (میانگین ۸۷/۱۱ میلی‌گرم کوئرستین در گرم) ۲۴/۱ درصد کاهش داشته است (جدول ۴). بیش‌ترین میزان فلاونوئید کل (میانگین ۱۵۲/۴۷ میلی‌گرم کوئرستین

مرواریدی (*Alternanthera tenella*) توسط اسید سالیسیلیک تقویت گردید و علت آن به افزایش محتوی فنول در اثر اسیدسالیسیلیک نسبت داده شد (۵۴). حداکثر فعالیت آنتی‌اکسیدانی زعفران پس از تیمار اسیدسالیسیلیک ۰/۱ میلی‌مولار گزارش شد (۵۱). در واقع، اسید سالیسیلیک سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی را برای محافظت از گیاه در برابر آسیب اکسیداتیو ناشی از تنش غیرزنده تقویت می‌کند (۵۲). در این مطالعه، فعالیت آنتی‌اکسیدانی با محلول‌پاشی گلاسیسین بتائین در گیاه نیل تحت تنش کم‌آبی افزایش یافت که می‌توان به تولید بالای محتوای فنولیک و فلاونوئید در اثر گلاسیسین بتائین نسبت داد؛ چنان‌که اثر مثبت گلاسیسین بتائین بر محتوای فلاونوئید و فنول در جدول ۴ مشاهده می‌شود. در راستای این نتیجه، پژوهش‌گران بیان کردند که فعالیت آنتی‌اکسیدانی کل و محتوای فنول در گیاه کاهوی تیمار شده با گلاسیسین بتائین (۲۵ میلی‌مولار) افزایش یافت (۵۵). به طور مشابه، محلول‌پاشی گلاسیسین بتائین به ویژه غلظت ۱۰۰ میلی‌مولار باعث افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدانی در گیاه همیشه‌بهار در معرض تنش خشکی شد (۵۶). هم‌چنین، کاربرد گلاسیسین بتائین ۸۰۰ پی‌پی‌ام در پنبه باعث افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدانی شد (۵۷). بیش‌ترین فعالیت آنتی‌اکسیدانی کل در گیاه توت‌فرنگی مربوط به تیمار ۱۰ میلی‌مولار گلاسیسین بتائین بود (۵۸). در گیاه شنبلیله، محلول‌پاشی گلاسیسین بتائین به‌ویژه در غلظت ۵۰ میلی‌مولار فعالیت آنتی‌اکسیدانی را افزایش داد (۵۹).

نتیجه‌گیری کلی

به‌طورکلی اثر محرک‌ها بسته به نوع و غلظت محرک متفاوت بود. طبق نتایج حاصل محلول‌پاشی گلاسیسین بتائین به ویژه در غلظت بالا توانست تحمل گیاه نیل به تنش خشکی را با افزایش محتوی پرولین،

فعالیت آنتی‌اکسیدانی: طبق نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده‌های فعالیت آنتی‌اکسیدانی، اثر ساده آبیاری در سطح احتمال ۰/۰۱ ($P \leq 0/01$)، اثر ساده محلول‌پاشی با محرک‌های اسیدسالیسیلیک و گلاسیسین بتائین در سطح احتمال ۰/۰۱ ($P \leq 0/01$) و اثر متقابل آبیاری و محرک‌ها در سطح احتمال ۰/۰۵ ($P \leq 0/05$) بر این صفت معنی‌دار بودند (جدول ۳). نتایج مقایسه میانگین اثر متقابل آبیاری و محرک‌ها در صفت فعالیت آنتی‌اکسیدانی نشان داد که در هر سه سطح آبیاری، محلول‌پاشی با محرک‌های اسیدسالیسیلیک و گلاسیسین بتائین فعالیت آنتی‌اکسیدانی را در گیاه نیل افزایش داد. کم‌ترین مقدار فعالیت آنتی‌اکسیدانی (میانگین ۶۷/۰۲ درصد) مربوط به تیمار شاهد (عدم محلول‌پاشی) در شرایط آبیاری ۱۰۰ درصد ظرفیت زراعی بود (جدول ۴). بیش‌ترین فعالیت آنتی‌اکسیدانی (میانگین ۶۸/۴۷ درصد) در تیمار محلول‌پاشی گلاسیسین بتائین با غلظت ۱۰۰ میلی‌مولار در شرایط آبیاری ۷۵ درصد ظرفیت زراعی به‌دست آمد که در مقایسه با تیمار شاهد (عدم محلول‌پاشی) در شرایط آبیاری ۱۰۰ درصد ظرفیت زراعی (میانگین ۲۶/۰۳ درصد) ۸۶/۲۱ درصد افزایش داشته است (جدول ۴). در این مطالعه، فعالیت آنتی‌اکسیدانی قابل‌توجهی تحت تیمار اسیدسالیسیلیک در گیاه نیل تحت تنش کم‌آبی حاصل شد که می‌تواند به تولید بالای محتوای فنولیک و فلاونوئید در اثر اسیدسالیسیلیک مربوط باشد. ترکیبات فنولی گیاهان به طور مستقیم به فعالیت آنتی‌اکسیدانی آن‌ها کمک می‌کنند و هم‌چنین ارتباط بین آن‌ها و فعالیت آنتی‌اکسیدانی نیز تأیید شده است (۴۱ و ۵۱). فعالیت آنتی‌اکسیدانی حذف رادیکال DPPH در عصاره گندم تیمار شده با ۱ میلی‌مولار اسیدسالیسیلیک بالاترین میزان را داشت (۵۲). کاربرد اسیدسالیسیلیک ظرفیت آنتی‌اکسیدانی را در تاج خروس افزایش داد (۵۳). فعالیت آنتی‌اکسیدانی (براساس مهار رادیکال DPPH) برگ‌های نوعی گل

تشکر و قدردانی

این پژوهش با حمایت مالی دانشگاه زابل انجام شده است (شماره گرت: IR-UOZ-GR-5521).

آنتوسیانین، فلاونوئید، محتوی فنول کل و فعالیت آنتی اکسیدانی بهبود بخشد. بنابراین، گلابیسین بتائین ۱۰۰ میلی مولار به عنوان محرک مناسبی جهت افزایش رشد، تحمل و تولید متابولیت‌های ثانویه پیشنهاد می‌گردد.

منابع

1. Muhammad, S., Sajjad, H., & Choudhary, M. I. (2018). Phytochemistry and pharmacology of Indigofera: A review. *Records of Natural Products*, 12 (1), 1-13.
2. Zargarani Khouzani, M. R. (2022). Assessing *Indigofera tinctoria* L. as a forgotten medicinal-industrial plant and the importance of its revitalization for the sustainability of Iran's agricultural ecosystems. *Central Asian Journal of Environmental Science and Technology Innovation*, 3 (2), 32-39.
3. Mishra, D. N., Gomare, K. S., & Sheelwant, S. V. (2020). GC-MS Analysis and phytochemical screening of *Indigofera tinctoria* (Linn.) leaf extract characterizing its medicinal use. *International Journal of Ayurvedic Medicine*, 11 (2), 289-299.
4. Motamarri, S. N., Karthikeyan, M., Rajasekar, S., & Gopal, V. (2012). *Indigofera tinctoria* Linn-a phytopharmacological review. *International Journal of Research in Pharmaceutical and Biomedical Sciences*, 3 (1), 164-169.
5. Rao, H. Y., Jayabhaskaran, C., Kamalraj, S., Parthasarathy, R., Mondal, S., Sundararaj, R., & Kumar, S. (2021). Exploring the molecular signatures of host-pathogen interactions in plant diseases: conflict and cooperation. In *Food Security and Plant Disease Management* (Pp: 63-74). Woodhead Publishing.
6. Esmailzadeh, B. S., & Sharifi, M. (2013). Increasing the production of plant secondary metabolites using biotic elicitors. *Journal of cell & tissue*, 4 (2), 119-128.
7. Fazili, M. A., Bashir, I., & Ahmad, M. (2022). In vitro strategies for the enhancement of secondary metabolite production in plants: a review. *Bulletin of the National Research Centre*, 46, 35-47.
8. Saraf, R., Saingar, S., Chaudhary, S., & Chakraborty, D. (2018). Response of plants to salinity stress and the role of salicylic acid in modulating tolerance mechanisms: Physiological and proteomic approach. In: Vats S. (eds) *Biotic and Abiotic Stress Tolerance in Plants*. Springer, Singapore.
9. Wani, A. S., Ahmad, A., Hayat, S., & Tahir, I. (2019). Epibrassinolide and proline alleviate the photosynthetic and yield inhibition under salt stress by acting on antioxidant system in mustard. *Plant Physiology and Biochemistry*, 135, 385-394.
10. Rezaei Alulu, A., Khairi, A., Sani Khani, M., & Arghwani, M. (2019). The effect of salicylic acid, glycine betaine and gamma-aminobutyric acid solution spraying on the antioxidant activity of Carla plant under water stress. *Plant Ecophysiology*, 40, 140-151. [In Persian]
11. Mousavi, A. S., Naimi, M., Rahmi Karizki, A., & Qolizadeh, A. (2021). The effect of elicitors on osmotic regulation, membrane stability, photosynthetic pigments and yield of essential oil of hyssop plant under drought stress. *Agronomy*, 23 (3), 632-621. [In Persian]
12. Oliveira, K. R., Souza Junior, J. P., Bennett, S. J., Checchio, M. V., Alves, R. D. C., Felisberto, G., Prado, R. D. M., & Gratão P. L. (2020). Exogenous silicon and salicylic acid applications improve tolerance to boron toxicity in field pea cultivars by intensifying antioxidant defence systems. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 201, 110778.

13. Koo Y., Heo A., & Choi H. (2020). Salicylic acid as a safe plant protector and growth regulator. *The plant Pathology Journal*, 36, 1-10.
14. Nazar, Z., Akram, N. A., Saleem, M. H., Ashraf, M., Ahmed, S., Ali, S., Abdullah Alsahli, A., & Alyemeni, M. N. (2020). Glycinebetaine-Induced Alteration in Gaseous Exchange Capacity and Osmoprotective Phenomena in Safflower (*Carthamus tinctorius* L.) under Water Deficit Conditions. *Sustainability*, 12 (24), 10649.
15. Shafiq, S., Akram, N. A., Ashraf, M., García-Caparrós, P., Ali, O. M., & Latef, A. A. H. A. (2021). Influence of Glycine Betaine (Natural and Synthetic) on Growth, Metabolism and Yield Production of Drought- Stressed Maize (*Zea mays* L.) Plants. *Plants*, 10, 25-40.
16. Zhang, W., Han, Z., Guo, Q., Liu, Y., Zheng, Y., Wu, F., & Jin, W. (2014). Identification of maize long non-coding RNAs responsive to drought stress. *PLOS ONE*, 9, e98958.
17. Armin, M., & Miri, H. R. (2014). Effects of glycine betaine application on quantitative and qualitative yield of cumin under irrigated and rain-fed cultivation. *Journal of Essential Oil-Bearing Plants*, 17 (4), 708-716.
18. Raza, M. A. S., Saleem, M. F., Shah, G. M., Khan, I. H., & Raza, A. (2014). Exogenous application of glycinebetaine and potassium for improving water relations and grain yield of wheat under drought. *Journal of soil science and plant nutrition*, 14, 348-364.
19. Nawaz, M., & Wang, Z. (2020). Abscisic Acid and Glycine Betaine Mediated Tolerance Mechanisms under Drought Stress and Recovery in *Axonopus compressus*: A New Insight. *Scientific Reports*, 10, 6942.
20. Shemi, R., Wang, R., & Gheith, E. S. M. S. (2021). Effects of salicylic acid, zinc and glycine betaine on morpho-physiological growth and yield of maize under drought stress. *Scientific Reports*, 11, 3195.
21. Mohammadi, H., Amirikia, F., Ghorbanpour, M., Fatehi, F., & Hashempour, H. (2019). Salicylic acid induced changes in physiological traits and essential oil constituents in different ecotypes of *Thymus kotschyanus* and *Thymus vulgaris* under well-watered and water stress conditions. *Industrial Crops and Products*, 129, 561-574.
22. Alahbakhsh, E., Galavi, M., Mousavi Nick, S. M., & Mohkami, Z. (2019). Effects of irrigation regimes and fertilizers on qualitative and quantitative traits of Purslan (*Portolaca oleraceae*). *Journal of Water and Soil Conservation*, 26 (1), 247-253.
23. Arnon, D. I. (1949). Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in Beta vulgaris. *Plant Physiology*, 24, 1-15.
24. Bates, L. S., Waldren, R. P., & Teare, I. D. (1973). Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant and Soil*, 39 (1), 205-207.
25. Wagner, G. J. (1979). Content and vacuole/extra vacuole distribution of neutral sugars, free amino acids, and anthocyanins in protoplast. *Plant Physiology*, 64, 88-93.
26. Chang, C., Yang, M., Wen, H., & Chern, J. (2002). Estimation of total flavonoid content in Propolis by two complementary colorimetric methods. *Food and Drug Analysis*, 10, 178-182.
27. Slinkard, K., & Singleton, V. L. (1977). Total phenol analysis: automation and comparison with manual methods. *American journal of enology and viticulture*, 28 (1), 49-55.
28. Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., & Berset, C. (1995). Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensm. Wiss. Technology*, 28, 25-30.
29. Chen, D., Wang, Y., Wang, X., Nie, Z., Gao, Z., & Zhang, L. (2016). Effects of branch removal on water use of rain-fed jujube (*Ziziphus jujuba* Mill.) plantations in Chinese semiarid Loess Plateau region. *Agricultural Water Management*, 178, 258-270.

30. Bijalwan, P., Sharma, M., & Kaushik, P. (2022). Review of the effects of drought stress on plants. *A systematic approach*, e2022020014.
31. Seleiman, M. F., Al-Suhaibani, N., Ali, N., Akmal, M., Alotaibi, M., Refay, Y., Dindaroglu, T., Abdul-Wajid, H. H., & Battaglia, M. L. (2021). Drought stress impacts on plants and different approaches to alleviate its adverse effects. *Plants*, 10, 259.
32. Miranshahi, B., & Sayyari, M. (2016). Methyl jasmonate mitigates drought stress injuries and affects essential oil of summer savory. *Journal of Agricultural Science and Technology*, 18 (6), 1635-1645.
33. Mohsenzadeh, S., Hosseinkhani Hezaveh, M., & Zamanpour Shah Mansouri, H. (2019). Some physiological characteristics of lavender medicinal plant (*Lavandula angustifolia*) in response to drought stress and compost and vermicompost. *Journal of Plant Production Research*, 27 (3), 149-162.
34. Omid, H., Pirjalili, F., & Ahmadi, Kh. (2019). Evaluation of the effect of drought stress on the morpho-physiological characteristics of three Balango Shirazi populations (*Lallemantia royleana* Benth.). *Horticultural Sciences*, 34 (4), 605-620. [In Persian]
35. Abbas, S. M., Ahmad, R., Waraich, E. A., & Qasim, M. (2019). Exogenous application of salicylic acid at different plant growth stages improves physiological processes in marigold (*Tagetes erecta* L.). *Pakistan Journal of Agricultural Sciences*, 56 (3), 541-548.
36. Gorgini Shabankare, H., & Khorasaninejad, S. (2016). The effect of biofertilizers and salicylic acid on the yield and quality characteristics of the Rosemary medicinal plant under water deficit regimes. *Good farming Agricultural Journal*, 19 (2), 475-491.
37. Islam, M. Z., Park, B. J., & Lee, Y. T. (2021). Bioactive phytochemicals and antioxidant capacity of wheatgrass treated with salicylic acid under organic soil cultivation. *Chemistry & Biodiversity*, 18 (2), e2000861.
38. Mibe, E. K., Ambuko, J., Giovannoni, J. J., Onyango, A. N., & Owino, W. O. (2017). Carotenoid profiling of the leaves of selected African eggplant accessions subjected to drought stress. *Food Science & Nutrition*, 5 (1), 113-122.
39. Khalilzadeh, R., Seid Sharifi, R., & Pirzad, A. (2020). Mitigation of drought stress in pot marigold (*Calendula officinalis*) plant by foliar application of methanol. *Journal of Plant Physiology and Breeding*, 10 (1), 71-84.
40. Zali, A. G., & Ehsanzadeh, P. (2018). Exogenous proline improves osmoregulation, physiological functions, essential oil, and seed yield of fennel. *Industrial Crops and Products*, 111, 133-140.
41. Noorzad, S., Ahmadian, A., & Moghadam, M. (2014). Investigating the amount of proline, chlorophyll index, carbohydrates and absorption of nutrients in the medicinal plant coriander (*Coriandrum sativum* L.) under the effect of drought stress and fertilizer treatment. *Research Journal Agricultural Sciences of Iran*, 13 (1), 131-139.
42. Dianat, M., Saharkhiz, M. J., & Tavassolian, I. (2016). Salicylic acid mitigates drought stress in *Lippia citriodora* L.: Effects on biochemical traits and essential oil yield. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 8, 286-293.
43. Yaqoob, H., Akram, N. A., Iftikhar, S., Ashraf, M., Khalid, N., Sadiq, M., Alyemeni, M. N., Wijaya, L., Alam, P. J., & Ahmad, P. (2019). Seed pretreatment and foliar application of proline regulates morphological, physio-biochemical processes and activity of antioxidant enzymes in two cultivars of quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) plants. *Plants*, 8, 588.

44. Ashraf, M., & Harris, P. J. C. (2013). Photosynthesis under stressful environments: An overview. *Photosynthetica*, 51, 163-190.
45. Kabiri, R., Nasibi, F., & Farahbakhsh, H. (2014). Effect of exogenous salicylic acid on some physiological parameters and alleviation of drought stress in *Nigella sativa* plant under hydroponic culture. *Plant Protection Science*, 50 (1), 43-51.
46. Nobakht, P., Ebadi, A., Permon, Q., & Nikkha Bahrami, R. (2017). Effect of hydrogen peroxide foliar application on photosynthetic pigments of peppermint under water limitation conditions. *Plant Process Function*, 7 (27), 19-29.
47. Mojaradi, T., Yavarzadeh M. R., & Shirzadi F. (2019). Effect of seed priming with salicylic acid and brassinosteroid foliar spraying on yield and some physiological traits of fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.) under low irrigation conditions. *Crop Ecophysiology*, 14 (2), 193-216.
48. Baghbani Arani, A., Modarres-Sanavy, S. A., Mashhadi Akbar Boojar, M., Mokhtassi, M., & Bidgoli, A. (2017). Towards improving the agronomic performance, chlorophyll fluorescence parameters and pigments in fenugreek using zeolite and vermicompost under deficit water stress. *Industrial Crop and Products*, 109, 346-357.
49. Shallan, M. A., Hassan, H. M., Namich, A. A., & Ibrahim, A. A. (2012). Effect of sodium nitroprusside, putrescine and glycine betaine on alleviation of drought stress in cotton plant. *Am-Eur. Journal of Agricultural and Environmental Sciences*, 12, 1252-1265.
50. Sharma, A., Shahzad, B., Rehman, A., Bhardwaj, R., Landi, M., & Zheng, B. (2019). Response of phenylpropanoid pathway and the role of polyphenols in plants under abiotic stress. *Molecules*, 24 (13), 2452.
51. Stankovic, M. S. (2011). Total phenolic content, flavonoid concentration and antioxidant activity of *Marrubium peregrinum* L. extracts. *Kragujevac Journal of Science*, 33, 63-72.
52. Moradi, A., Zarinkamar, F., De Domenico, S., Mita, G., Di Sansebastiano, G. P., & Caretto, S. (2020). Salicylic Acid Induces Exudation of Crocin and Phenolics in Saffron Suspension-Cultured Cells. *Plants*, 9(8), 949-953.
53. Khandaker, L., Akond, A., & Oba, S. (2011). Foliar application of salicylic acid improved the growth, yield and leaf's bioactive compounds in red amaranth (*Amaranthus tricolor* L.), *Veg. Crop Res Bull*, 74, 77-86.
54. Rodrigues-Brandão, I., Kleinowski, A. M., Einhardt, A. M., Lima, M. C., Amarante, L. D., Peters, J. A., & Braga, E. J. B. (2014). Salicylic acid on antioxidant activity and betacyanin in production from leaves of *Alternanthera tenella*. *Ciência Rural*, 44, 1893-1898.
55. Shams, M., Yildirim, E., Ekinçi, M., Turan, M., Dursun, A., Parlakova, F., & Kul, R. (2016). Exogenously applied glycine betaine regulates some chemical characteristics and antioxidative defence systems in lettuce under salt stress. *Horticulture Environment and Biotechnology*, 57 (3), 225-231.
56. Feiz, F. S., Hakimi, L., Mousavi, A., & Ghanbari Jahromi, M. (2019). The effects of glycine betaine and L-arginine on biochemical properties of pot marigold (*Calendula officinalis* L.) under water stress. *Iranian Journal of Plant Physiology*, 9 (3), 2795-2805.
57. Magdy, A. S., Hazem, M. M. A., Alia, A. M. N., & Alshaimaa, A. I. (2012). Effect of sodium nitroprusside, putrescine and glycine betaine on alleviation of drought stress in cotton plant. *American-Eurasian Journal of Agricultural & Environmental Sciences*, 12 (9), 1252-1265.
58. Adak, N., & Tozlu, I. (2020). The effects of glycine betaine on pomology, yield and biochemical characteristics of strawberry plants under soilless culture. *Acta Horticulturae*, 1273, 45-52.

59. Ismaiel, S. A., & El-Bialy, N. M. (2022). Glycine betaine enhancing plant growth and antioxidant activity of fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* L.) under salt stress. *Journal of Biological Research-Bollettino della Società Italiana di Biologia Sperimentale*, 1, 1-21.
60. Isah, T. (2019). Stress and defense responses in plant secondary metabolites production. *Biological Research*, 52, 39.
61. Sher, A., Sarwar, B., Sattar, A., Ijaz, M., Ul-Allah, S., Hayat, M. T., Manaf, A., Qayyum, A., Zaheer, A., Iqbal, J., Askary, A. E., Gharib, A. F., Ismail, K. A., & Elesawy, B. H. (2022). Exogenous application of zinc sulphate at heading stage of wheat improves the yield and grain zinc biofortification. *Agronomy*, 12, 734.
62. Askari, E., & Ehsanzadeh, P. (2015). Effectiveness of exogenous salicylic acid on root and shoot growth attributes, productivity, and water use efficiency of water-deprived fennel genotypes. *Horticulture, Environment, and Biotechnology*, 56, 687-696.
63. Riaz, A. T. I. F., Younis, A., Taj, A. R., Karim, A., Tariq, U., Munir, S., & Riaz, S. I. T. W. A. T. (2013). Effect of drought stress on growth and flowering of marigold (*Tagetes erecta* L.), *Pakistan Journal of Botany*, 45 (S1), 123-131.
64. Asadi, S., Lebaschy, M. H., Khourgami, A., & Shirani Rad, A. M. (2012). Effect of drought stress on the morphology of three *Salvia sclarea* populations. *Annals of Biological Research*, 3 (9), 4503-4507.
65. Castro-Duque, N. E., Chávez-Arias, C. C., & Restrepo-Díaz, H. (2020). Foliar Glycine Betaine or Hydrogen Peroxide Sprays Ameliorate Waterlogging Stress in Cape Gooseberry. *Plants*, 9 (5), 644.
66. Naiebzadeh, M., Hakimi, L., & Khaligi, A. (2019). Investigating the effect of Glycine betaine and humi-forthi on morpho-physiological and biochemical properties *Pelargonium graveolens* under water stress. *Plant production research*, 26 (3), 37-56. [In Persian]
67. Koobaz, P., Reza Ghaffari, M., Heidari, M., Mirzaei, M., Ghanati, F., Amirkhani, A., Mortazavi, S. E., Moradi, F., Hajirezaei, M. R., & Salekdeh, G. H. (2020). Proteomic and metabolomic analysis of desiccation tolerance in young wheat seedlings. *Plant Physiology Biochemistry*, 146, 349-362.
68. Yousefvand, P., Sohrabi, Y., Heidari, G., Weisany, W., & Mastinu, A. (2022). Salicylic Acid Stimulates Defense Systems in *Allium hirtifolium* Grown under Water Deficit Stress. *Molecules*, 27 (10), 3083.
69. Bhuiyan, T. F., Ahamed, K. U., Nahar, K., Al Mahmud, J., Bhuyan, M. B., Anee, T. I., Fujita, M., & Hasanuzzaman, M. (2019). Mitigation of PEG-induced drought stress in rapeseed (*Brassica rapa* L.) by exogenous application of osmolytes. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 20, 101197.
70. Zulficar, F., Chen, J., Finnegan, P. M., Younis, A., Nafees, M., Zorrig, W., & Hamed, K. B. (2021). Application of Trehalose and Salicylic Acid Mitigates Drought Stress in Sweet Basil and Improves Plant Growth. *Plants*, 10 (6), 1078.
71. Nazarli, H., Ahmadi, A., & Hadian, J. (2014). Salicylic acid and methyl jasmonate enhance drought tolerance in chamomile plants. *Journal of HerbMed Pharmacology*, 3, 87-92.
72. Sedaghat, M., Tahmasebi-Sarvestani, Z., Emam, Y., & Mokhtassi-Bidgoli, A. (2017). Physiological and antioxidant responses of winter wheat cultivars to strigolactone and salicylic acid in drought. *Plant Physiology and Biochemistry*, 119, 59-69.
73. La, V. H., Lee, B. R., Islam, M. T., Park, S. H., Jung, H. I., Bae, D. W., & Kim, T. H. (2019). Characterization of salicylic acid-mediated modulation of the drought stress responses: Reactive oxygen species, proline, and redox state in *Brassica napus*. *Environmental and Experimental Botany*, 157, 1-10.

74. Cha-um, S., Samphumphuang, T., & Kirdmanee, C. (2013). Glycinebetaine alleviates water deficit stress in indica rice using proline accumulation, photosynthetic efficiencies, growth performances and yield attributes. *Australian Journal of Crop Science*, 7 (2), 213-218.
75. Shehzadi, A., Akram, N. A., Ali, A., & Ashraf, M. (2019). Exogenously applied glycinebetaine induced alteration in some key physiobiochemical attributes and plant anatomical features in water stressed oat (*Avena sativa* L.) plants. *Journal of Arid Land*, 11, 292-305.
76. Abdi, Gh., Shokrpour, M., Salami, S. A., & Berteza, C. M. (2017). Effect of water deficit stress on yield characteristics, antioxidant capacity and metabolite profile of peppermint (*Mentha piperita* L.). *Iranian Journal of Horticultural Science*, 49 (3), 715-727.
77. Bagal, U. R., Lee bens mack, J. H., Walter Lorenz, W., & Dean, J. F. D. (2012) The phenyl alanine ammonia lyase (PAL) gene family shows a gymnosperm specific lineage. *BioMed Central Genomics*, 13, 1471-2164.
78. Gupta, N., & Thind, S. K. (2017). Grain yield response of drought stressed wheat to foliar application of glycine betaine. *Indian Journal of Agricultural Research*, 51, 287-291.
79. Liaqat, S., Masroor, A., Maqsood, Z., & Tasleem, W. (2020). Effect of Glycine Betaine as a Growth Promoter and Stress Mitigator in *Brassica oleracea* var. Italica. *Journal La Lifesti*, 1 (4), 31-35.
80. Ahmad, R., Lim, C. J., & Kwon, S. Y. (2013). Glycine betaine: a versatile compound with great potential for gene pyramiding to improve crop plant performance against environmental stresses. *Plant Biotechnology Reports*, 7, 49-57.