

# Crop Science Research in Arid Regions

homepage: <https://cropscience.uoz.ac.ir/>

## Research Article

Volume 7, Issue 2, 2025, P. 411-425

## The effect of methanol foliar application on some physiological reactions of cowpea plant under drought stress

Hassan Nouriyani <sup>\*1</sup>

<sup>a</sup> Department of Agronomy and Plant Breeding, Payame Noor University, Iran

\*Corresponding Author: [hnouriyani@pnu.ac.ir](mailto:hnouriyani@pnu.ac.ir)

Received: 1 February 2025

Accepted: 23 March 2025

DOI: 10.22034/CSRAR.2025.503631.1468

### How to cite this article:

Nouriyani, H. 2025. The effect of methanol foliar application on some physiological reactions of cowpea plant under drought stress. *Crop Science Research in Arid Regions*, 7(2), 411-425. <https://doi.org/10.22034/csrar.2025.503631.1468>

### Abstract

**Introduction:** Among the environmental stresses, drought is one of the most important factors affecting the growth and development of plants, and due to the simultaneous effect on the morphological, physiological and biochemical characteristics of plant tissues and cells, it ultimately leads to plant growth decay and yield reduction. This stress induces various physiological, biochemical and molecular responses in plants as a survival mechanism. Also, this stress can reduce the chlorophyll content, relative water content, stomatal conductance and ultimately grain yield. The results of some studies show that increasing the concentration of CO<sub>2</sub> in the leaves leads to a reduction of the negative effects caused by drought stress in plants. One of the important strategies to increase the concentration of CO<sub>2</sub> in plants is the use of compounds such as methanol, which can increase the concentration of CO<sub>2</sub> in plants and help photosynthesis and growth under drought stress conditions. In this case, methanol can act as an additional carbon source, and in environmental conditions where the plant is limited by CO<sub>2</sub> (such as drought stress), methanol as a precursor can help the plant absorb more carbon and turn it into the final product of photosynthesis. Therefore, the aim of this study was to investigate the effect of methanol foliar spraying on some physiological reactions of cowpea plants in the face of drought stress.

**Materials and Methods:** The research was conducted as a split plot experiment based on randomized complete block design with three replications during the summer of 2021 in the Dezful region. Drought stress was applied based on irrigation intervals at four levels (80, 110, 140, and 170 mm of evaporation from a Class A evaporation pan) as the main factor. Foliar spraying was performed at four levels (0, 10, 20, and 30% volumetric methanol solution with 2 grams per liter of glycine) as the sub-factor. The evaluated traits included stomatal conductance, transpiration, sub-stomatal CO<sub>2</sub> concentration, photosynthesis, relative water content, chlorophyll index, proline content, electrolytes leakage, anthocyanin and flavonoid. Analysis of variance was performed using statistical analysis system (SAS version: 9.3). The means were compared using the Duncan's multiple range test at 5% probability level.

**Results and Discussion:** The results of the experiment showed that under drought stress conditions, stomatal conductance, transpiration rate, sub-stomatal CO<sub>2</sub> concentration, photosynthetic rate, relative water content, and chlorophyll index decreased. In contrast, the content of proline, electrolyte leakage,



©2024 The author(s). This is an open access article distributed under [Creative Commons Attribution 4.0 International License \(CC BY 4.0\)](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

anthocyanins, and flavonoids increased. Methanol foliar application also had a significant effect on all the studied traits, with the maximum effect observed in the treatment with 30% volumetric methanol solution, particularly on transpiration rate and anthocyanin content. Under irrigation conditions after 170 mm of evaporation, foliar application with 30% volumetric methanol resulted in a significant increase in stomatal conductance (89%), sub-stomatal CO<sub>2</sub> concentration (20%), photosynthetic rate (67%), and chlorophyll index (31%), anthocyanin content (12%) as well as a 27% reduction in the amount of electrolytes leakage compared to the treatment of no foliar application (control) was observed in these conditions.

**Conclusion:** Based on the results of this study, the use of methanol, especially the foliar spraying of 30% volumetric of methanol, improved some physiological traits such as stomatal conductance, relative water content, chlorophyll index, sub-stomatal CO<sub>2</sub> concentration, and photosynthesis rate, cell membrane stability, proline content and secondary metabolites like anthocyanins and flavonoids which can improve the cowpea ability to increase drought stress tolerance.

**Keywords:** Anthocyanin, Electrolytes leakage, Methanol, Photosynthesis, Proline

## اثر محلول پاشی متانول بر برخی واکنش‌های فیزیولوژیکی گیاه لوبیا تحت تنش خشکی

حسن نوریانی\*

۱- گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشگاه پیام نور، ایران

\* مسئول مکاتبه: [hnouriyani@pnu.ac.ir](mailto:hnouriyani@pnu.ac.ir)

DOI: 10.22034/CSRAR.2025.503631.1468

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۰۱/۰۳

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۱۱/۱۳

## چکیده

به منظور بررسی اثر محلول پاشی متانول بر برخی واکنش‌های فیزیولوژیکی لوبیا چشم‌بلبلی در شرایط تنش خشکی، آزمایشی به صورت کرت‌های یک‌بار خرد شده در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی در سه تکرار در تابستان سال ۱۴۰۰ در منطقه دزفول اجرا گردید. در این تحقیق تنش خشکی به صورت دور آبیاری در چهار سطح (آبیاری پس از ۸۰، ۱۱۰، ۱۴۰ و ۱۷۰ میلی‌متر تبخیر از تشتک تبخیر کلاس A)، به عنوان فاکتور اصلی و محلول پاشی مقادیر (صفر، ۱۰، ۲۰ و ۳۰ درصد حجمی متانول به همراه دو گرم در لیتر گلیسین) به عنوان فاکتور فرعی در نظر گرفته شد. نتایج آزمایش نشان داد که شرایط تنش خشکی هدایت روزنه‌ای، شدت تعرق، غلظت CO<sub>2</sub> زیر روزنه‌ای، سرعت فتوسنتز، محتوای نسبی آب برگ و شاخص کلروفیل را کاهش داد؛ در حالی که باعث افزایش محتوای پرولین، نشت الکترولیت‌ها، میزان آنتوسیانین‌ها و فلاونوئیدها گردید. تیمار محلول پاشی متانول نیز بر تمامی صفات مورد بررسی به جز شدت تعرق و آنتوسیانین‌ها اثر معنی‌داری داشت و این تأثیر در محلول پاشی با ۳۰ درصد حجمی متانول به حداکثر خود رسید. در شرایط آبیاری پس از ۱۷۰ میلی‌متر تبخیر، محلول پاشی با ۳۰ درصد حجمی متانول موجب افزایش معنی‌دار هدایت روزنه‌ای (۸۹ درصد)، غلظت CO<sub>2</sub> زیر روزنه‌ای (۲۰ درصد)، سرعت فتوسنتز (۶۷ درصد)، شاخص کلروفیل (۳۱ درصد) و میزان آنتوسیانین‌ها (۱۲ درصد) و کاهش ۲۷ درصدی در میزان نشت الکترولیت‌ها نسبت به تیمار عدم محلول پاشی (شاهد) در این شرایط گردید. بنابراین، می‌توان کاربرد ۳۰ درصد حجمی متانول را به عنوان یک سازوکار مؤثر بر مکانیسم‌های فیزیولوژیکی گیاه لوبیا چشم‌بلبلی در تحمل تنش خشکی و تعدیل اثر منفی آن توصیه نمود.

واژه‌های کلیدی: آنتوسیانین، پرولین، فتوسنتز، متانول، نشت الکترولیت

## مقدمه

روزنه‌ای فتوسنتز و یا به‌طور غیرمستقیم در نتیجه تنش اکسیداتیو ناشی شود (Nouriyani, 2023). در محدودیت روزنه‌ای فتوسنتز، بسته شدن روزنه در پاسخ به کاهش تورژسانس سلول‌های برگ رخ می‌دهد و منجر به کاهش CO<sub>2</sub> قابل دسترس در فضای بین سلولی برگ می‌شود. علاوه بر محدودیت روزنه‌ای فتوسنتز، محدودیت غیر روزنه‌ای با کاهش انتشار CO<sub>2</sub> از طریق مزوفیل برگ (کاهش هدایت مزوفیلی) یا تغییر در متابولیسم فتوسنتزی در تعیین ظرفیت فتوسنتز تحت تنش خشکی دخالت دارد (Yang et al., 2021). فلاونوئیدها و آنتوسیانین‌ها از جمله بزرگ‌ترین زیرگروه‌های ترکیبات فنلی هستند که از مسیر فنیل پروپانوئید سنتز شده و به عنوان جاروب کننده گونه‌های اکسیژن فعال (ROS) نقش مهمی در مقابله با تنش‌های محیطی ایفا می‌کنند (Agati et al., 2012). کنترل رفتار سلول محافظ روزنه و وضعیت آب برگ، نوسان عمل فتوسنتزی، تنظیم اسمزی از طریق سنتز اسمولیت‌هایی مانند پرولین و سنتز پروتئین‌های القایی در شرایط تنش

تنش‌های محیطی یک مانع بزرگ در دستیابی به عملکرد بالقوه محصولات کشاورزی در سراسر جهان است؛ در این میان، تنش خشکی مهم‌ترین عامل محدودکننده رشد گیاهان می‌باشد که توانایی القای واکنش‌های فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی متعددی را دارد (Carraro and Di Iorio, 2022). تنش خشکی منجر به انسداد روزنه‌ای و کاهش در میزان تعرق، پتانسیل آب بافت‌های گیاهی، فتوسنتز، ممانعت از رشد، تجمع اسید آسبیزیک (ABA)، پرولین، مانیتول، سوربیتول، ترکیبات پاک‌کننده رادیکال‌ها (آسکوربات، گلوتاتیون، آلفاتوکوفرول) و سنتز پروتئین‌ها و mRNA می‌گردد (Shukla et al., 2017).

از آنجا که بسته شدن روزنه‌ها از اولین فرایندهایی است که در پاسخ به تنش خشکی رخ می‌دهد و به دلیل این که میزان فتوسنتز با میزان هدایت روزنه مرتبط است، کاهش فتوسنتز تحت خشکی می‌تواند مستقیماً از محدودیت روزنه‌ای و غیر

(*et al.*, 2017)؛ افزایش تثبیت CO<sub>2</sub>، میزان کلروفیل a و b، محتوای نسبی آب برگ، میزان پرولین و CO<sub>2</sub> درون سلولی در نخود (*Hosseinzadeh et al.*, 2014) گردیده است. بنابراین، بررسی نتایج پژوهش‌ها نشان داد که محلول پاشی متانول می‌تواند تأثیرات مثبتی بر گیاهان در شرایط تنش خشکی داشته باشد؛ از این رو تحقیق حاضر باهدف بررسی اثر محلول پاشی متانول بر برخی واکنش‌های فیزیولوژیکی گیاه لوبیا چشم‌بلبلی در مواجهه با تنش خشکی اجرا گردید.

### مواد و روش‌ها

این پژوهش بر اساس طرح کرت‌های خردشده در قالب بلوک‌های کامل تصادفی در سه تکرار طی تابستان سال ۱۴۰۰ به صورت مزرعه‌ای در منطقه دزفول، واقع در شمال استان خوزستان با طول جغرافیایی ۴۸ درجه و ۳۳ دقیقه شرقی و عرض جغرافیایی ۳۲ درجه و ۹ دقیقه شمالی با ارتفاع ۴۸ متر از سطح دریا مورد بررسی قرار گرفت. در این تحقیق تنش خشکی به صورت دور آبیاری در چهار سطح (آبیاری پس از ۸۰، ۱۱۰، ۱۴۰ و ۱۷۰ میلی‌متر تبخیر از تشتک تبخیر کلاس A) به عنوان فاکتور اصلی و محلول پاشی متانول در چهار سطح (صفر، ۱۰، ۲۰ و ۳۰ درصد حجمی متانول به همراه دو گرم در لیتر گلیسین) به عنوان فاکتور فرعی در نظر گرفته شد.

عملیات تهیه زمین توسط گاواهن برگردان دار و دو دیسک عمود برهم و ماله‌کشی (تسطیح زمین) صورت گرفت. بر اساس نتایج آزمون خاک (جدول ۱) و توصیه‌های کودی، کودهای شیمیایی نیتروژن (از منبع اوره ۷۵ کیلو گرم)، پتاس (از منبع سولفات پتاسیم ۹۰ کیلو گرم) و فسفر (از منبع سوپر فسفات ۱۰۰ کیلو گرم) در هکتار استفاده شد.

در این پژوهش، کاشت بذر لوبیا چشم‌بلبلی رقم مشهد (تیپ بوته رونده، میان رس، رنگ هاله احاطه کننده ناف بذر سیاه، وزن صد دانه ۲۰ گرم) که از مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی صفی‌آباد دزفول تهیه شده بود، در تاریخ ۲۰ تیرماه به صورت دستی روی خطوط کشت ۷۵ سانتی‌متری، فاصله دو بوته ۲۰ سانتی‌متر (تراکم ۶۷۰۰۰ بوته در هکتار) و تعداد هشت خط کشت به طول هفت متر بود. فاصله هر کرت از کرت دیگر به صورت دو خط نکاشت و فاصله بین دو بلوک سه متر در نظر گرفته شد.

خشکی از جمله مکانیسم‌های فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی گیاهان در مواجهه با تنش است (*Rai et al.*, 2021).

لوبیا چشم‌بلبلی (*Vigna sinensis L.*) با داشتن حدود ۲۵ درصد پروتئین از جمله حبوبات مهم علفی و یک‌ساله با رشد سریع است که در مراحل پر شدن غلاف و گل‌دهی به تنش خشکی بسیار حساس است (*Kochaki and Khaje*, 2008). در سال‌های اخیر رویکردهای مختلفی جهت حفظ عملکرد و افزایش تحمل گیاهان زراعی از جمله لوبیا به تنش خشکی، مورد توجه محققان قرار گرفته است. نتایج برخی مطالعات نشان می‌دهد که افزایش غلظت CO<sub>2</sub> درون برگ‌ها منجر به کاهش اثرات منفی ناشی از تنش خشکی در گیاهان می‌شود (*Madanes et al.*, 2019; *Nonomura et al.*, 2000). یکی از راهکارهای افزایش غلظت CO<sub>2</sub> درون برگ‌ها استفاده از ترکیباتی نظیر متانول، اتانول، پروپانول و بوتانول می‌باشند که قابلیت تبدیل به CO<sub>2</sub> را دارند (*Machado et al.*, 2018). در بین این ترکیبات، متانول (CH<sub>3</sub>OH) به عنوان یک ترکیب الکلی سبک، ماده‌ای است که بر فیزیولوژی گیاهان تأثیر قابل توجهی داشته و به‌ویژه این که بر ظرفیت فتوسنتزی و افزایش عملکرد گیاهان زراعی با مسیر فتوسنتزی سه کربنه در شرایط تنش‌های محیطی نقش بسزایی دارد. علت افزایش عملکرد را به کاهش تنفس نوری و افزایش آماس سلولی بافت‌های گیاهی نسبت داده‌اند (*Nonomura et al.*, 2000). متانول پس از محلول پاشی از طریق آنزیم متانول اکسیداز تبدیل به فرمالدهید و سپس تبدیل به فرمات (متانوئیک اسید) می‌شود. فرمات در مرحله بعد توسط آنزیم فرمات دهیدروژناز تبدیل به دی‌اکسید کربن شده و باعث افزایش CO<sub>2</sub> درون سلولی گیاه می‌شود (*Ramirez et al.*, 2006).

نتایج برخی از پژوهش‌ها حاکی از آن است که محلول پاشی متانول باعث افزایش میزان کلروفیل، کارتنوئیدها، فلاونوئید و آنتوسیانین در گیاه دارویی گل انگشتانه ارغوانی (*Rezaei et al.*, 2024)؛ افزایش شاخص کلروفیل، هدایت روزنه‌ای، عملکرد دانه و کاهش نشست الکترولیت‌ها در گندم (*Aghaei et al.*, 2021)؛ افزایش محتوای نسبی آب برگ، پرولین و کاهش تولید پراکسید هیدروژن در سویا (*Amraei et al.*, 2017)؛ افزایش میزان تجمع پرولین، رنگیزه‌های فتوسنتزی و بهبود عملکرد دانه در کلزا (*Kalantar Ahmadi et al.*, 2024).

جدول ۱- خصوصیات فیزیکی و شیمیایی خاک مزرعه آزمایش

Table 1- Physical and chemical properties of soil experimental field

عمق نمونه برداری Sampling depth (cm)	بافت خاک Soil texture	نیتروژن قابل جذب Nitrogen	فسفر قابل جذب Phosphorus	پتاسیم قابل جذب Potassium	ماده آلی Organic matter (%)	اسیدیته اشباع pH	هدایت الکتریکی Electrical conductivity (ds/m)
0-30	Clay loam	45	6.7	109	0.8	7.4	0.99

استفاده از داده‌های هواشناسی گزارش شده توسط ایستگاه هواشناسی صفی‌آباد دزفول (جدول ۲) محاسبه و پس از رسیدن به حد میزان تبخیر تیمار موردنظر، در صبح روز بعد آبیاری آن انجام می‌گرفت.

آبیاری کرت‌های آزمایشی به صورت نشتی پس از عملیات کاشت تا استقرار کامل بوته (ظهور اولین برگ سه برگچه‌ای) یکسان و به‌طور نرمال انجام و سپس بر اساس تیمارهای تنش خشکی، آبیاری اعمال گردید. برای تعیین زمان دقیق آبیاری، در پایان هرروز مقدار تبخیر از تشتک تبخیر کلاس A با

جدول ۲- برخی پارامترهای هواشناسی طی فصل رشد

Table 2- Some meteorological parameters during the growing season

ماه Month	میانگین دما Average temperature (°C)	بارندگی Rainfall (mm)	رطوبت نسبی Relative humidity (%)	میزان تبخیر Evaporation rate (mm)
تیر Jun-Jul	37.3	0	23	422.0
مرداد Jul-Aug	37.2	0	24	424.8
شهریور Aug-Sep	34.7	0	27	330.4
مهر Sep-Oct	29.1	0	33	240.3
آبان Oct-Nov	21.9	28.2	53	108.3
آذر Nov-Dec	17.3	34.9	72	58.1

روزانه‌ای ( $\text{mol CO}_2 \cdot \text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ) با استفاده از دستگاه آنالیزور گازی مادون قرمز IRGA (مدل LCA-4) در مرحله گلدهی و قبل از آبیاری، از ساعت ۹-۱۱ صبح در شدت تشعشع فعال فتوسنتزی ۱۸۰۰-۱۵۰۰ میکرو مول بر مترمربع بر ثانیه انجام شد (Afshari *et al.*, 2012). برای این منظور، از هر واحد آزمایشی یک گیاه به‌طور تصادفی انتخاب و از برگچه وسطی برگ ماقبل آخر آن نمونه برداری به عمل آمد. سپس با قرار دادن نمونه برگ هر واحد آزمایشی به مدت یک دقیقه درون محفظه شیشه‌ای مخصوص دستگاه، اعداد دستگاه قرائت و مقدار آن برای هر صفت ثبت گردید (Liu *et al.*, 2011).

جهت برآورد شاخص کلروفیل برگ از دستگاه کلروفیل متر

محلول پاشی متانول دو بار طی فصل رشد گیاه و با فواصل زمانی ۱۰ روز صورت گرفت. اولین محلول پاشی طی مرحله رویشی به فاصله چهار هفته پس از کاشت و محلول پاشی دوم، در اوایل گلدهی انجام شد. محلول پاشی تا زمان جاری شدن قطره‌های محلول از اندام‌های هوایی ادامه یافت. در مدت زمان اجرای آزمایش کنترل علف‌های هرز به‌صورت دستی صورت گرفت.

لندازه‌گیری صفات مورد ارزیابی یک هفته پس از آخرین محلول پاشی انجام گرفت. برآورد سرعت فتوسنتز در واحد سطح برگ ( $\mu\text{mol CO}_2 \cdot \text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ )، غلظت  $\text{CO}_2$  اتاقتک زیر روزنه‌ای ( $\mu\text{mol} \cdot \text{mol}^{-1}$ )، سرعت تعرق ( $\text{mmol H}_2\text{O} \cdot \text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ) و هدایت

۲۴ ساعت در دمای اتاق و نور کم در آب مقطر غوطه‌ور شدند. پس از آن، نمونه‌ها به سرعت و با دقت با دستمال کاغذی خشک و وزن اشباع آن‌ها اندازه‌گیری شد. نهایتاً برای تعیین وزن خشک، نمونه‌ها در آون با دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد و به مدت ۲۴ قرار داده شد و پس از توزین، محتوای نسبی آب برگ از طریق رابطه (۲) محاسبه گردید (Ritchie et al., 1990):

$$RWC = [(FW - DW) \div (SW - DW)] \times 100 \quad (2)$$

که در این رابطه FW، DW و SW به ترتیب برابر وزن تر، وزن خشک و وزن اشباع است.

برای اندازه‌گیری میزان نشت الکترولیت‌ها، ابتدا ۰/۱ گرم از برگ ماقبل آخر گیاه وزن گردید و به قطعات هم‌اندازه خرد شد و قطعات برگی با آب مقطر شستشو و در ۱۰ میلی‌لیتر آب بدون یون در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد شناور شدند. پس از ۲۴ ساعت هدایت الکتریکی اولیه محلول ( $EC_1$ ) ثبت گردید. سپس قطعات برگ در بن ماری با دمای ۹۰ درجه سانتی‌گراد به مدت دو ساعت قرار گرفتند و هدایت الکتریکی ثانویه آن‌ها ( $EC_2$ ) نیز ثبت شد. در نهایت میزان نشت الکترولیت‌ها از غشای سلول با استفاده از رابطه (۳) محاسبه گردید (Lutts et al., 1996):

$$A = (EC_1 \div EC_2) \times 100 \quad (3)$$

عملیات آماری و آنالیز واریانس با استفاده از نرم‌افزار (Ver. 9.3) SAS روی داده‌های آزمایش انجام گردید. مقایسه میانگین صفات مورد ارزیابی، بر اساس آزمون دانکن و در سطح احتمال ۵ درصد صورت گرفت.

## نتایج و بحث

### هدایت روزنه‌ای

بر اساس نتایج تجزیه واریانس داده‌ها، اثر ساده تیمار تنش خشکی و محلول پاشی متانول و همچنین اثر متقابل بین آن‌ها بر صفت هدایت روزنه‌ای معنی‌دار بود (جدول ۳). مقایسه میانگین اثر متقابل تنش خشکی و محلول پاشی متانول نشان داد که کم‌ترین و بیشترین هدایت روزنه‌ای به میزان ۰/۶۲ و ۳/۹۵ مول  $CO_2$  بر مترمربع بر ثانیه به ترتیب به تیمار عدم محلول پاشی متانول در شرایط آبیاری پس از ۱۷۰ میلی‌متر تبخیر و تیمار محلول پاشی ۳۰ درصد حجمی متانول در شرایط آبیاری پس از ۸۰ میلی‌متر تبخیر (شاهد) تعلق داشت (جدول

دیجیتالی (SPAD-50 Minolta) کشور ژاپن استفاده گردید. بدین منظور در مرحله گلدهی از هر کرت پنج بوته به صورت تصادفی انتخاب و عدد SPAD برگچه‌های سه برگ از برگ‌های قسمت پایینی، میانی و انتهایی هر بوته قرائت گردید. میانگین عدد SPAD سه برگ مورد ارزیابی هر بوته به عنوان معیار شاخص کلروفیل بوته در نظر گرفته شد. در نهایت میانگین تمامی اعداد کلروفیل متر (SPAD) قرائت‌شده پنج بوته به عنوان میزان شاخص کلروفیل برای هر تیمار محاسبه گردید.

برای سنجش میزان آنتوسیانین برگ، ابتدا مقدار ۰/۲ گرم از بافت تازه گیاهی با چهار میلی‌لیتر محلول اسید کلریدریک و متانول یک درصد در یک هاون چینی ساییده شد. محلول حاصل به مدت ۲۴ ساعت در یخچال نگهداری شد و سپس به مدت ۱۰ دقیقه در ۱۳۰۰۰ دور دقیقه سانتریفیوژ گردید. محلول رویی به دقت به ظرف دیگری منتقل شد و برای طیف‌سنجی مورد استفاده قرار گرفت و جذب محلول‌ها در طول موج ۵۳۰ و ۶۵۷ نانومتر قرائت گردید. در نهایت محتوای آنتوسیانین برای هر عصاره با استفاده از رابطه (۱) محاسبه شد (Mita et al., 1997)

$$A = A_{530} - (0.25A_{657}) \quad (1)$$

که در آن، A جذب نوری نمونه و اعداد اندیس نشانگر طول موج‌هایی است که جذب در آن‌ها اندازه‌گیری شد.

برای اندازه‌گیری میزان فلاونوئید برگ، ابتدا مقدار ۰/۲ گرم از بافت تازه گیاهی در سه میلی‌لیتر اتانول اسیدی به طور کامل ساییده و سانتریفیوژ گردید و در طول موج ۳۰۰ نانومتر جذب محلول خوانده شد (Krizek et al., 1998). اندازه‌گیری پرولین برگ با استفاده از روش بیتس و همکاران (Bates et al., 1973) انجام گرفت. به این صورت که مقدار ۰/۱ گرم برگ در دو میلی‌لیتر سولفوسالیسیلیک اسید ۳/۳ درصد ساییده شده و با سرعت ۴۰۰۰ دور در دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ و از عصاره به دست آمده جهت برآورد محتوای پرولین استفاده شد. جذب در دستگاه طیف‌سنج با طول موج ۵۲۰ نانومتر قرائت گردید.

برای اندازه‌گیری میزان محتوای نسبی آب برگ (RWC) قطعات دو سانتی‌متری از قسمت میانی نمونه برگ ماقبل آخر تهیه و وزن تر آن‌ها با استفاده از ترازوی دقیق ۰/۰۰۱ گرم مشخص گردید. سپس جهت تعیین وزن اشباع، نمونه‌ها به مدت

شد و در نهایت متانول با تأثیر بر دستگاه روزنه‌ای و باز و بستن روزنه‌ها، افزایش هدایت روزنه‌ای را در پی داشت. نتایج یافته‌های دیگر محققان در گندم نیز حاکی از افزایش هدایت روزنه‌ای در اثر کاربرد متانول می‌باشد (Aghaei et al., 2021).

(۵). کاهش هدایت روزنه‌ای در شرایط تنش خشکی را می‌توان به کاهش پتانسیل آب برگ و بسته شدن روزنه‌ها نسبت داد (Nouriyani, 2021)؛ درحالی‌که به نظر می‌رسد استفاده از متانول باعث افزایش میزان کربوهیدرات تولیدشده در برگ و به دنبال آن جذب آب بیشتر و افزایش فشار تورژسانس در گیاه

جدول ۳- تجزیه واریانس (میانگین مربعات) صفات فیزیولوژیکی لوبیا چشم‌بلبلی تحت تنش خشکی

Table 3- Analysis of variance (mean of squares) of physiological traits of Cowpea under drought stress

منابع تغییر Source of variation	درجه آزادی df	هدایت روزنه‌ای Stomatal conductance	تعرق Transpiration	غلظت CO <sub>2</sub> زیر روزنه‌ای Sub stomatal CO <sub>2</sub>	فتوسنتز Photosynthesis	محتوای نسبی آب RWC
تکرار Replication	2	0.07995	0.02316	1964.77080	0.50521	85.56250
تنش خشکی Drought stress	3	20.52823 **	82.84223 **	34552.85423 **	184.95695 **	1375.57639 **
خطای (a) Error (a)	6	0.02634	0.12589	75.18754	0.24798	25.36806
متانول Methanol	3	1.08508 **	0.07582 ns	1760.57640 **	6.52139 **	398.74305 **
متانول × تنش Stress × Methanol	9	0.05009 *	0.04933 ns	133.87273 **	0.19454 *	15.87269 ns
خطای (b) Error (b)	24	0.01930	0.04841	22.2778	0.08313	12.27778
ضریب تغییرات CV (%)		6.30	6.38	2.65	4.42	5.35

ns, \* و \*\* به ترتیب غیر معنی‌دار و معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد و ۱ درصد

ns, \* and \*\* Non-Significant, Significant at 5% and 1% probability level, respectively

ادامه جدول ۳- تجزیه واریانس (میانگین مربعات) صفات فیزیولوژیکی لوبیا چشم‌بلبلی تحت تنش خشکی

Continue the table 3- Analysis of variance (mean of squares) of physiological traits of Cowpea under drought stress

منابع تغییر Source of variation	درجه آزادی df	پرولین Proline	شاخص کلروفیل Chlorophyll index	نشت الکترولیت‌ها Electrolytes leakage	آنتوسیانین Anthocyanin	فلاونوئید Flavonoid
تکرار Replication	2	3.64583	40.68750	17.77083	0.000003	0.00672
تنش خشکی Drought stress	3	178.79862 **	985.58334 **	1461.18750 **	0.000401 **	3.34868 **
خطای (a) Error (a)	6	16.34028	5.68751	9.60417	0.000004	0.02679
متانول Methanol	3	33.24306 **	266.36112 **	491.35418 **	0.000053 ns	0.23963 **
متانول × تنش Stress × Methanol	9	7.15046 ns	10.15741 **	14.09491 *	0.000045 *	0.04656 ns
خطای (b) Error (b)	24	4.19445	1.85417	4.78472	0.000019	0.02190
ضریب تغییرات CV (%)		6.88	3.23	4.54	11.83	7.40

ns, \* و \*\* به ترتیب غیر معنی‌دار و معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد و ۱ درصد

ns, \* and \*\* Non-Significant, Significant at 5% and 1% probability level, respectively

جدول ۴- مقایسه میانگین اثر ساده تنش خشکی و محلول پاشی متانول بر صفات فیزیولوژیکی لوبیا چشم بلبلی

Table 4- Meam comparison of the simple effect of drought stress and methanol foliar application on physiological traits of Cowpea

تیمارها Treatments	تعرق Transpiration (mmol H <sub>2</sub> O. m <sup>-2</sup> s <sup>-1</sup> )	محتوای نسبی آب RWC (%)	پرولین Proline (mg.g <sup>-1</sup> fw)	فلاونوئید Flavonoid (mg.g <sup>-1</sup> fw)
سطوح تنش Stress levels				
آبیاری پس از ۸۰ میلی متر تبخیر Irrigation after 80 mm of evaporation	6.70 a	79.83 a	25.92 d	1.49 d
آبیاری پس از ۱۱۰ میلی متر تبخیر Irrigation after 110 mm of evaporation	4.25 b	70.25 b	c 28.00	1.68 c
آبیاری پس از ۱۴۰ میلی متر تبخیر Irrigation after 140 mm of evaporation	2.23 c	59.92 c	b 30.25	2.14 b
آبیاری پس از ۱۷۰ میلی متر تبخیر Irrigation after 170 mm of evaporation	0.62 d	51.75 d	a 34.93	2.69 a
سطوح متانول Methanol levels				
بدون محلول پاشی (شاهد) Without foliar spraying (Control)	3.37 a	59.00 d	27.58 c	1.87 c
محلول پاشی ۱۰ درصد حجمی Foliar spraying 10% volumetric	3.41 a	63.01 c	29.42 b	1.92 bc
محلول پاشی ۲۰ درصد حجمی Foliar spraying 20% volumetric	3.47 a	67.33 b	30.75 ab	2.02 b
محلول پاشی ۳۰ درصد حجمی Foliar spraying 30% volumetric	3.55 a	72.41 a	31.35 a	2.19 a

در هر ستون میانگین‌های با حروف مشابه بر اساس آزمون دانکن در سطح احتمال پنج درصد اختلاف معنی‌داری باهم ندارند.

Means followed by the same letters in each column are not significantly different at 5% probability level, according to Duncan's test.

جدول ۵- مقایسه میانگین اثر متقابل تنش خشکی و محلول پاشی متانول بر صفات فیزیولوژیکی لوبیا چشم بلبلی

Table 5- Comparison of the mean interaction of drought stress and methanol foliar application on physiological traits of Cowpea

تنش خشکی Drought stress	متانول Methanol	هدایت روزنه‌ای Stomatal conductance (mol CO <sub>2</sub> . m <sup>-2</sup> s <sup>-1</sup> )	غلظت CO <sub>2</sub> زیر روزنه‌ای Sub stomatal CO <sub>2</sub> (μmol. mol <sup>-1</sup> )	فتوسنتز Photosynthesis (μmol CO <sub>2</sub> . m <sup>-2</sup> s <sup>-1</sup> )	شاخص کلروفیل Chlorophyll index (SPAD)	نشت الکترولیت‌ها Electrolytes leakage (%)	آنتوسیانین Anthocyanin (mg.g <sup>-1</sup> fw)
I <sub>1</sub>	M <sub>0</sub>	3.54 c	220.67 d	10.60 c	46.05 c	43.01 fg	0.030 l
	M <sub>1</sub>	3.63 bc	228.51 c	10.77 c	48.74 c	37.02 ij	0.031 l
	M <sub>2</sub>	3.79 ab	235.00 b	11.50 b	b 53.00	34.33 hi	0.033 kl
	M <sub>3</sub>	3.95 a	258.02 a	12.94 a	a 62.32	31.65 j	0.034 k
I <sub>2</sub>	M <sub>0</sub>	2.52 d	196.31 f	7.20 f	e 41.34	47.00 ef	0.037 j
	M <sub>1</sub>	2.58 d	202.63 f	7.47 f	d 44.00	43.66 fg	0.039 ij
	M <sub>2</sub>	2.62 d	214.35 e	8.14 e	49.05 c	40.34 gh	0.041 i
	M <sub>3</sub>	3.44 c	237.14 b	8.70 d	52.67 b	35.02 j <sup>i</sup>	0.043 <sup>h</sup>
I <sub>3</sub>	M <sub>0</sub>	1.30 fg	138.00 j	3.24 ij	34.00 hi	63.35 a	0.054 g
	M <sub>1</sub>	1.35 fg	145.01 i	3.60 i	36.02 gh	59.32 b	0.057 f
	M <sub>2</sub>	1.43 f	153.32 gh	4.20 h	39.00 f	52.41 c	0.060 ef
	M <sub>3</sub>	2.05 e	158.05 g	4.70 g	41.69 e	45.05 ef	0.062 e
I <sub>4</sub>	M <sub>0</sub>	0.62 h	110.66 l	2.14 l	28.34 k	67.00 a	0.070 d
	M <sub>1</sub>	0.66 h	117.03 l	2.71 k	30.66 j	64.31 a	0.073 c
	M <sub>2</sub>	0.69 h	126.72 k	3.04 jk	33.59 i	59.25 b	0.075 b
	M <sub>3</sub>	1.17 g	132.04 jk	3.57 i	37.04 fg	48.94 cd	0.078 a

در هر ستون میانگین‌های با حروف مشابه بر اساس آزمون دانکن در سطح احتمال پنج درصد اختلاف معنی‌داری باهم ندارند.

I<sub>1</sub>, I<sub>2</sub>, I<sub>3</sub> و I<sub>4</sub>: به ترتیب آبیاری پس از ۸۰، ۱۱۰، ۱۴۰ و ۱۷۰ میلی متر تبخیر از تشتک تبخیر کلاس A؛ M<sub>0</sub>، M<sub>1</sub>، M<sub>2</sub> و M<sub>3</sub>: به ترتیب محلول پاشی صفر، ۱۰، ۲۰ و ۳۰ درصد حجمی متانول

Means followed by the same letters in each column are not significantly different at 5% probability level, according to Duncan's test.

I<sub>1</sub>, I<sub>2</sub>, I<sub>3</sub> and I<sub>4</sub>: Irrigation after 80, 110, 140 and 170 mm evaporation from Class A evaporation pan, respectively; M<sub>0</sub>, M<sub>1</sub>, M<sub>2</sub> and M<sub>3</sub>: 0, 10, 20 and 30 volume percent methanol spraying, respectively.

## شدت تعرق

هدایت روزنه‌ای باعث کاهش جذب  $\text{CO}_2$  و در نتیجه کاهش غلظت  $\text{CO}_2$  اتاقک زیر روزنه‌ای می‌گردد. در حالی که به نظر می‌رسد بالا بودن غلظت  $\text{CO}_2$  اتاقک زیر روزنه‌ای در تیمارهای محلول پاشی متانول، ناشی از جذب متانول از طریق روزنه‌های برگ که طی فرآیند اکسیداسیون به دی‌اکسید کربن تبدیل و باعث افزایش  $\text{CO}_2$  وارد شده به فضای زیر روزنه‌ها می‌شود (Patel et al., 2020). افزایش غلظت  $\text{CO}_2$  اتاقک زیر روزنه‌ای در تیمارهای محلول پاشی متانول با یافته‌های پژوهش‌گران دیگر مطابقت دارد (Hosseinzadeh et al., 2014).

## سرعت فتوسنتز

اثر ساده تیمارهای تنش خشکی و محلول پاشی متانول و همچنین اثر متقابل بین آن‌ها بر سرعت فتوسنتز معنی‌دار بود (جدول ۳). در تمامی تیمارهای تنش خشکی با افزایش غلظت متانول، سرعت فتوسنتز افزایش یافت، به طوری که بیشترین و کم‌ترین مقادیر آن به ترتیب به تیمار محلول پاشی ۳۰ درصد حجمی متانول در شرایط آبیاری پس از ۸۰ میلی‌متر تبخیر (۱۲/۹۴ میکرو مول  $\text{CO}_2$  بر مترمربع بر ثانیه) و تیمار عدم محلول پاشی متانول در شرایط آبیاری پس از ۱۷۰ میلی‌متر تبخیر (۲/۱۴ میکرو مول  $\text{CO}_2$  بر مترمربع بر ثانیه) اختصاص داشت (جدول ۵). می‌توان بیان نمود که بسته شدن روزنه‌ها و کاهش غلظت  $\text{CO}_2$  زیر اتاقک روزنه در شرایط تنش خشکی، دلیلی بر کاهش فتوسنتز باشد (Jin et al., 2015). در مقابل، متابولیزه شدن متانول به دی‌اکسید کربن، سبب برتری  $\text{CO}_2$  در رقابت با  $\text{O}_2$  در اتصال به روبیسکو شده و در نتیجه بازدارندگی واکنش اکسیژنی شدن (کاهش تنفس نوری) و افزایش فتوسنتز را به همراه دارد (Gout et al., 2000). به نظر می‌رسد متانول با تبدیل شدن به  $\text{CO}_2$  سبب افزایش غلظت  $\text{CO}_2$  درون سلولی برگ‌ها شده و با بهبود انجام عمل فتوسنتز و ماده سازی بیشتر منجر به مصرف NADPH تولید شده در زنجیره انتقال الکترون می‌گردد (Patel et al., 2020) و در نتیجه از تجمع آن در کلروپلاست سلول‌های برگ‌ها و تشکیل سوپر اکسید هیدروژن جلوگیری می‌کند. بنابراین می‌توان گفت در حضور میزان بیشتر  $\text{CO}_2$  عمل کربوکسیلاسیون جایگزین اکسیژناسیون شده و فتوسنتز افزایش می‌یابد. بررسی‌های دیگر نیز نشان داد محلول پاشی متانول باعث افزایش فتوسنتز و بهبود رشد گیاه

اثر ساده تیمار تنش خشکی بر صفت شدت تعرق معنی‌دار بود، اما اثر ساده تیمار محلول پاشی متانول و همچنین اثر متقابل تنش خشکی و محلول پاشی متانول بر صفت مذکور معنی‌دار نگردید (جدول ۳). مقایسه میانگین تیمارهای تنش خشکی نشان داد که کم‌ترین و بیشترین میزان شدت تعرق به ترتیب به تیمار آبیاری پس از ۸۰ میلی‌متر تبخیر (۰/۶۲ میلی مول  $\text{H}_2\text{O}$  بر مترمربع بر ثانیه) و تیمار آبیاری پس از ۱۷۰ میلی‌متر تبخیر (۶/۷۰ میلی مول  $\text{H}_2\text{O}$  بر مترمربع بر ثانیه) اختصاص داشت (جدول ۴). پژوهش‌گران بیان داشتند کاهش شدت تعرق در تیمارهای تحت تنش خشکی به علت بسته شدن روزنه‌ها و کاهش هدایت روزنه‌ای است که علاوه بر تولید اسید آبسزیک (ABA) در ریشه و ارسال آن به برگ‌ها، در اثر کاهش پتانسیل فشاری در برگ نیز تولید می‌شود و ABA تولید شده به‌عنوان یک سیگنال ارتباطی، سبب بسته شدن روزنه‌ها می‌گردد (Yamori et al., 2013). همان‌گونه که در جدول (۴) مشاهده می‌گردد، مصرف متانول باعث افزایش میزان شدت تعرق گردید اما از نظر آماری معنی‌دار نبود. به نظر می‌رسد که محلول پاشی متانول از طریق تأثیر بر سیستم روزنه‌ای و کاهش مقاومت روزنه‌ای باعث افزایش شدت تعرق گردید؛ زیرا هدایت روزنه‌ای بیشتر (مقاومت روزنه‌ای کم‌تر) با شدت تعرق بالاتر ارتباط تنگاتنگی دارد (Nouriyani, 2021).

## غلظت $\text{CO}_2$ اتاقک زیر روزنه

نتایج تجزیه واریانس داده‌های آزمایش نشان داد که اثر ساده تیمارهای تنش خشکی و محلول پاشی متانول و همچنین اثر متقابل بین آن‌ها بر صفت غلظت  $\text{CO}_2$  اتاقک زیر روزنه معنی‌دار بود (جدول ۳). تیمار آبیاری پس از ۱۷۰ میلی‌متر تبخیر بدون محلول پاشی متانول (شاهد) و تیمار آبیاری پس از ۸۰ میلی‌متر تبخیر به همراه محلول پاشی ۳۰ درصد حجمی متانول به ترتیب با ۱۱۰/۶۶ و ۲۵۸/۰۲ میکرو مول بر مول کمترین و بیشترین میزان غلظت  $\text{CO}_2$  اتاقک زیر روزنه‌ای را به خود اختصاص دادند (جدول ۵). از آنجا که  $\text{CO}_2$  از طریق منفذ روزنه به درون فضای زیر روزنه‌ای انتشار یافته و وارد فضای بین سلولی و سپس سلول‌های مزوفیلی می‌شود؛ می‌توان اظهار داشت که در شرایط تنش خشکی، بسته شدن روزنه‌ها و کاهش

می‌شود (Xiao-Tang *et al.*, 2008).

### محتوای نسبی آب برگ

متانول میزان پرولین نیز افزایش یافت (جدول ۴). از آنجا که آنزیم پیرولین ۵-کربوکسیلات سنتتاز (P5CS) که نقش مهمی در سنتز اسیدآمینه پرولین ایفا می‌نماید در شرایط اسیدی بیشترین فعالیت را دارد (Yordanov *et al.*, 2003) گزارش شده است که متانول با کاهش اسیدیته (pH) در گیاه منجر به افزایش فعالیت آنزیم پیرولین ۵-کربوکسیلات سنتتاز شده و از این طریق باعث افزایش میزان پرولین در برگ می‌گردد (Ramroudi *et al.*; Hosseinzadeh *et al.*, 2014). (2016).

### شاخص کلروفیل

نتایج تجزیه واریانس داده‌ها مشخص نمود که اثر ساده تیمار تنش خشکی و محلول پاشی متانول و همچنین اثر متقابل بین آن‌ها بر صفت شاخص کلروفیل معنی‌دار بود (جدول ۳). مقایسه میانگین داده‌ها نشان داد که تیمار محلول پاشی ۳۰ درصد حجمی متانول در شرایط آبیاری پس از ۸۰ میلی‌متر تبخیر بیشترین میزان (۶۲/۳۲) و تیمار عدم محلول پاشی متانول در شرایط آبیاری پس از ۱۷۰ میلی‌متر تبخیر کم‌ترین میزان (۲۸/۳۴) شاخص کلروفیل را به خود اختصاص داد (جدول ۵). تنش خشکی از فعال شدن آنزیم‌های کلیدی دخیل در سنتز کلروفیل جلوگیری می‌کند و یا باعث افزایش فعالیت آنزیم‌های مؤثر در تخریب آن می‌گردد (Bhusal *et al.*, 2018) و به بیان دیگر، کاهش کلروفیل در اثر تنش خشکی ناشی از افزایش تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن در سلول است که این رادیکال‌ها موجب پراکسیداسیون و تجزیه این رنگ‌دانه‌ها می‌گردند (Simova-Stoilova *et al.*, 2008). کاهش میزان کلروفیل در لوبیا ناشی از تنش خشکی در دیگر تحقیقات نیز گزارش شده است (Patel *et al.*; Davoodi *et al.*, 2018; Alillou *et al.*, 2024; 2022). افزایش میزان کلروفیل در شرایط محلول پاشی متانول با اکسیداسیون متانول در ارتباط است؛ زیرا هنگامی که گیاه در شرایط کمبود آب با تنش اکسیداتیو و بسته شدن روزنه‌ها و کاهش  $CO_2$  درون سلولی برگ مواجه می‌شود، به نظر می‌رسد که در این شرایط محلول پاشی متانول منجر به افزایش غلظت  $CO_2$  درون سلولی و کاهش تنفس نوری می‌شود. در نتیجه با کاهش تنفس نوری، پراکسید هیدروژن تولید شده در پراکسی زوم کاهش یافته و

محتوای نسبی آب برگ (RWC) تحت تأثیر معنی‌دار اثر ساده تیمارهای تنش خشکی و محلول پاشی متانول قرار گرفت (جدول ۳). مقایسه میانگین تیمارهای تنش خشکی نشان داد که بیشترین و کم‌ترین محتوای نسبی آب برگ به میزان ۷۹/۸۳ و ۵۱/۷۵ درصد به ترتیب به تیمار آبیاری پس از ۸۰ میلی‌متر تبخیر و تیمار آبیاری پس از ۱۷۰ میلی‌متر تبخیر مربوط بود (جدول ۴). کاهش محتوای نسبی آب برگ در شرایط تنش خشکی، ناشی از کاهش میزان جذب آب از خاک توسط ریشه‌ها و یا به علت تعرق بیشتر از روزه‌های برگ است (Ma *et al.*, 2017). گزارش شده است تنش خشکی باعث کاهش محتوای نسبی آب برگ ژنوتیپ‌های لوبیا گردید (Dastneshan *et al.*, 2022). همان‌طور که در جدول (۴) ملاحظه می‌شود، کاربرد متانول سبب افزایش محتوای نسبی آب برگ و بهبود شرایط آبی گیاه گردید. در این ارتباط می‌توان بیان داشت کاربرد متانول باعث بهبود فتوسنتز و در نتیجه افزایش تولید کربوهیدرات در برگ شد و به نظر می‌رسد افزایش مواد اسمزی درون بافت‌ها موجب جذب آب بیشتر با نیروی قوی‌تر از خاک شده و در نهایت سبب بهبود محتوای نسبی آب در شرایط تنش خشکی گردید.

### اسیدآمینه پرولین

نتایج آزمایش نشان داد که اثر ساده تیمارهای تنش خشکی و محلول پاشی متانول بر میزان پرولین معنی‌دار بود، اما اثر متقابل بین آن‌ها بر صفت مذکور معنی‌دار نبود (جدول ۳). مقایسه میانگین داده‌های تیمار تنش خشکی نشان داد کم‌ترین و بیشترین مقادیر پرولین به ترتیب به تیمار آبیاری پس از ۸۰ میلی‌متر تبخیر (۲۵/۹۲) میلی‌گرم بر گرم وزن تازه برگ) و تیمار آبیاری پس از ۱۷۰ میلی‌متر تبخیر (۳۴/۹۳) میلی‌گرم بر گرم وزن تازه برگ) تعلق داشت (جدول ۴). از پاسخ‌های گیاهان به خشکی تجمع اسمولیت‌هایی مانند پرولین است که منجر به سازگاری اسمزی گیاه می‌شود. افزایش پرولین در شرایط تنش را به افزایش فعالیت آنزیم پیرولین ۵-کربوکسیلات سنتتاز که در مسیر بیوسنتز پرولین نقش دارد، نسبت داده‌اند (Kamanga *et al.*, 2018). در این آزمایش با افزایش مصرف

آبیاری پس از ۱۷۰ میلی‌متر تبخیر با میزان ۰/۰۷۸ میلی‌گرم بر گرم وزن تازه برگ و تیمار عدم محلول پاشی متانول در شرایط آبیاری پس از ۸۰ میلی‌متر تبخیر با میزان ۰/۰۳۰ میلی‌گرم بر گرم وزن تازه برگ به ترتیب بیش‌ترین و کم‌ترین مقادیر آنتوسیانین را به خود اختصاص داد (جدول ۵). در آزمایشی محلول پاشی متانول باعث افزایش تولید آنتوسیانین‌ها در گیاهان تحت تنش خشکی گردید (Rezaie Allolo et al., 2024). در شرایط خشکی، آنتوسیانین‌ها به‌عنوان جذب‌کننده‌های نور و محافظت‌کننده‌های سلولی عمل می‌کنند و این افزایش به علت نقش حفاظت نوری آن‌ها به‌وسیله حذف مستقیم رادیکال‌های آزاد اکسیژن در طول مدت تنش اکسیداتیو است (Madanes et al., 2019).

### فلاونوئیدها

نتایج تجزیه واریانس داده‌های آزمایش نشان داد که اثر ساده تنش خشکی و محلول پاشی متانول بر صفت مورد ارزیابی فلاونوئید معنی‌دار بود، اما اثر متقابل بین آن‌ها بر صفت مذکور معنی‌دار نبود (جدول ۳). مقایسه میانگین تیمار تنش خشکی نشان داد که بیش‌ترین و کم‌ترین میزان فلاونوئیدها به ترتیب مربوط به تیمار آبیاری پس از ۱۷۰ میلی‌متر تبخیر (۲/۶۹ میلی‌گرم بر گرم وزن تازه برگ) و تیمار آبیاری پس از ۸۰ میلی‌متر تبخیر (۱/۴۹ میلی‌گرم بر گرم وزن تازه برگ) بود (جدول ۴). افزایش فلاونوئیدها در شرایط تنش خشکی به‌عنوان یک سیستم آنتی‌اکسیدانی غیر آنزیمی می‌تواند از تنش‌های اکسیداتیو جلوگیری کند، به این معنی که توان حذف گونه‌های فعال اکسیژن را دارند (Sen et al., 2020). نتایج آزمایشی نشان داد که با افزایش شدت تنش رطوبتی میزان فنول و فلاونوئید کل نسبت به شاهد افزایش یافت (Afshari et al., 2024). مصرف متانول باعث افزایش معنی‌دار میزان فلاونوئیدها گردید؛ به‌طوری‌که محلول پاشی ۳۰ درصد حجمی متانول با مقدار ۲/۱۹ میلی‌گرم بر گرم وزن تازه برگ باعث افزایش حدود ۱۸ درصدی میزان فلاونوئیدها نسبت به تیمار عدم محلول پاشی متانول گردید (جدول ۴). در این ارتباط می‌توان اظهار نمود که متانول به‌عنوان محرک سنتز بیش‌تر ترکیبات ثانویه مانند فلاونوئیدها در شرایط تنش بود. گزارش شده است، افزایش غلظت فلاونوئیدها سبب کاهش پراکسیداسیون لیپیدها، نشت

خسارت وارده بر کلروفیل نیز کاهش می‌یابد. نتایج مشابهی از افزایش کلروفیل با به کار بردن متانول در گندم (Aghaei et al., 2023) و ذرت (Armin and Keyvanloo, 2015) تحت تنش خشکی گزارش شده است.

### نشت الکترولیت‌ها

نتایج تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که اثر ساده تیمارهای تنش خشکی و محلول پاشی متانول و همچنین اثر متقابل بین آن‌ها بر صفت نشت الکترولیت‌ها معنی‌دار بود (جدول ۳). مقایسه میانگین داده‌های مربوط به اثر متقابل تیمار تنش خشکی و محلول پاشی متانول مشخص نمود که بیش‌ترین و کم‌ترین میزان نشت الکترولیت‌ها به ترتیب مربوط به تیمار عدم محلول پاشی متانول در شرایط آبیاری پس از ۱۷۰ میلی‌متر تبخیر (۶۷ درصد) و تیمار محلول پاشی ۳۰ درصد حجمی متانول در شرایط آبیاری پس از ۸۰ میلی‌متر تبخیر (۳۱/۶۵ درصد) بود (جدول ۵). در این آزمایش تنش خشکی موجب افزایش میزان نشت الکترولیت‌ها گردید؛ که در این ارتباط بیان شده است تنش خشکی به‌واسطه تولید مواد تخریب‌کننده غشاء از جمله پراکسید هیدروژن ناشی از تنش اکسیداتیو و پراکسیداسیون لیپیدی غشاء، سبب ناپایداری غشای سلولی شده و در نتیجه نشت الکترولیت‌ها افزایش می‌یابد (Chaves et al., 2003). در آزمایشی بر روی گیاه کینوا تنش خشکی باعث افزایش نشت الکترولیت‌ها گردید (Mousavi Sardou et al., 2023). اما در تحقیق حاضر محلول پاشی متانول باعث کاهش میزان نشت الکترولیت‌ها از غشاء سلول شد. کاهش نشت الکترولیت‌ها و افزایش پایداری غشای سلولی با محلول پاشی متانول مربوط به خواص ضد تنشی آن است که به نظر می‌رسد متانول با افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان مانند کاتالاز و پراکسیداز، باعث تجزیه مواد تخریب‌کننده غشای سلولی از جمله پراکسید هیدروژن می‌گردد.

### آنتوسیانین

میزان آنتوسیانین تحت تأثیر معنی‌دار اثر ساده تنش خشکی و اثر متقابل تنش خشکی و محلول پاشی متانول قرار گرفت (جدول ۳). مقایسه میانگین داده‌های آزمایش نشان داد که تیمار محلول پاشی ۳۰ درصد حجمی متانول در شرایط

۳۰ درصد حجمی آن می‌تواند توانمندی گیاه را در افزایش تحمل تنش خشکی و تعدیل اثرات منفی آن در گیاه لوبیا چشم‌بلبلی بهبود ببخشد.

### سپاس‌گزاری

این مقاله برگرفته از طرح پژوهشی است که با همکاری و حمایت‌های مالی معاونت محترم پژوهش و فناوری دانشگاه پیام نور استان خوزستان انجام گردیده که بدین‌وسیله تشکر و قدردانی به عمل می‌آید.

### تعارض منافع

نویسنده اظهار می‌نماید که هیچ‌گونه تعارض منافی در رابطه با نشر این مقاله وجود ندارد.

الکترولیت‌ها، غلظت پراکسید هیدروژن و کاهش اثرات مخرب تنش خشکی می‌شود (Boscaiu et al., 2010).

### نتیجه‌گیری کلی

به‌طور کلی، نتایج آزمایش نشان داد که تنش خشکی تأثیر منفی بر صفات فیزیولوژیکی نظیر هدایت روزنه‌ای، شدت تعرق، غلظت CO<sub>2</sub> زیر روزنه‌ای، سرعت فتوسنتز، محتوای نسبی آب برگ و شاخص کلروفیل لوبیا چشم‌بلبلی داشت. اما، کاربرد متانول از طریق بهبود صفات فیزیولوژیکی مورد ارزیابی در این آزمایش باعث افزایش پایداری غشای سلولی، بهبود صفات فتوسنتزی و شرایط آبی گیاه، تقویت پاسخ دفاعی و فعالیت آنتی‌اکسیدانی از طریق تشدید تولید متابولیت‌های ثانویه (فلاونوئیدها و آنتوسیانین‌ها) و تجمع بیشتر اسیدآمینه پرولین گردید. بنابراین، به نظر می‌رسد کاربرد متانول به‌خصوص مصرف

## References

- Afshari, M., Rahimmalek, M. and Sabzalian, M.R., 2024. Evaluation of limited irrigation effects on essential oil constituents and antioxidant activities of the medicinal plant *S. abrotanoides*. *Journal of Crop Science Research in Arid Regions*, 6(1), pp.33-50. [In Persian]. <https://doi.org/10.22034/csrar.2024.338848.1228>
- Afshari, M.A., Habibi, H., Shekari, F. and Fotokian, M.H., 2012. Effect of salicylic acid (SA) on the photosynthesis, dry weight and canopy temperature in the cowpea (*Vigna unguiculata*) vegetative growth stage. *Journal of Agronomy Sciences*, 4(6), pp.41-50. [In Persian].
- Agati, G., Azzarello, E., Pollastri, S. and Massimiliano, T., 2012. Flavonoids as antioxidants in plants: location and functional significance. *Plant Science*, 196, pp.67-76.
- Aghaei, F., Seyed Sharifi, R. and Narimani, H., 2023. Effect of methanol on yield, dry matter remobilization and grain filling process of wheat (*Triticum aestivum* L.) under irrigation withholding. *Environmental Stresses in Crop Sciences*, 16(1), pp.83-100. [In Persian]. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2012.07.014>
- Aghaei, F., Seyyed Sharifi, R., Khomari, S. and arimani, H., 2021. Effects of methanol on grain yield, chlorophyll fluorescence indices and some physiological traits of wheat (*Triticum aestivum* L.) under irrigation withholding conditions. *Crop Production*, 13(4), pp.151-172. [In Persian]. <https://doi.org/10.22069/ejcp.2021.18631.2382>
- Alillou, M.K., Roshdi, M., Rezadust, S. and Khalili Mahaleh, J., 2024. Evaluation of the biochemical characteristics of red beans (*Phaseolus Vulgaris* L.) and seed protein under different levels of irrigation and growth stimulating compounds. *Journal of Crop Science Research in Arid Regions*, 6(2), pp.541-558. [In Persian]. <https://doi.org/10.22034/csrar.2024.351363.1260>

- Amraei, B., Paknejad, F., Ebrahimi, M.A. and Sobhanian, H., 2017. Effects of methanol spraying on some biochemical and physiological characteristics of soybean (*Glycine max* L.) under drought stress. *Journal of Plant Environmental Physiology*, 12(45), pp.81-94. [In Persian].
- Armin, M. and Keyvanloo, A., 2015. Effects of methanol foliar application on some root and shoot morphological characteristics of Corn under drought stress conditions. *Journal of Crop Research*, 7, pp.27-40. [In Persian].
- Bates, L.S., Waldren, R.P. and Teare, I.D., 1973. Rapid determination of free proline for water stress studies. *Plant and Soil*, 39, pp.205-207. <https://doi.org/10.1007/bf00018060>
- Bhusal, N., Bhusal, S.J. and Yoon, T.M., 2018. Comparisons of physiological and anatomical characteristics between two cultivars in bi-leader apple trees (*Malus domestica* Borkh.). *Scientia Horticulturae*, 231, pp.73-81. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2017.12.006>
- Boscaiu, M., Sanchez, M., Bautista, I., Donat, P., Lidon, A., Llinares, J., Llul, C. Mayoral, O. and Vicente, O., 2010. Phenolic compounds as stress markers in plants from gypsum habitats. *Bulletin UASVM Horticulture*, 67, pp.44-49.
- Carraro, E. and Di Iorio, A., 2022. Eligible strategies of drought response to improve drought resistance in woody crops: a mini-review. *Plant Biotechnology Reports*, 16, pp.265-282. <https://doi.org/10.1007/s11816-021-00733-x>
- Chaves, M., Marco, J. and Pereira, J., 2003. Understanding plant response to drought from genes to the whole plant. *Functional Plant Biology*, 30(3), pp.239-264. <https://doi.org/10.1071/fp02076>
- Dastneshan, Sh., Bihamta, M.R., Alireza Abbasi, A.R. and Sabokdast, M., 2022. Biochemical and molecular evaluation of some beans genotypes (*Phaseolus vulgaris* L.) under drought stress conditions. *Iranian Journal of Field Crop Science*, 52(4), pp.1-14. [In Persian]. <https://doi.org/10.22059/ijfcs.2020.280103.654606>
- Davoodi, S.H., Rahemi-karizaki, A., Nakhzari-moghadam, A. and Gholamalipour Alamdari, E., 2018. The effect of deficit irrigation on yield and physiological traits of Bean cultivars. *Plant Production Technology*, 10(1), pp.83-95. [In Persian]. <https://doi.org/10.22084/ppt.2018.9633.1537>
- Gout, E., Aubert, S., Bligny, R., Rebeille, F., Nonomura, A.R., Benson, A. and Douce, R., 2000. Plant metabolism of methanol in plant cells. Carbon-13 nuclear magnetic resonance studies. *Plant Physiology*, 123, pp.287-296. <https://doi.org/10.1104/pp.123.1.287>
- Hosseinzadeh, S.R., Cheniany, M. and Salimi, A., 2014. Effects of foliar application of methanol on physiological characteristics of chickpea (*Cicer arietinum* L.) under drought stress. *Iranian Journal of Pulses Research*, 5(2), pp.71-82. [In Persian].
- Jin, R., Shi, H., Han, C., Zhong, B., Wang, Q. and Chan, Z., 2015. Physiological changes of purslane (*Portulaca oleracea* L.) after progressive drought stress and rehydration. *Scientia Horticulture*, 194, pp.215-221. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2015.08.023>
- Kalantar Ahmadi, S.A., Ebadi, A., Daneshian, J., Siadat, S.A. and Jahanbakhsh, S., 2017. Effect of drought stress and foliar application of growth regulators on photosynthetic pigments and seed yield of rapeseed (*Brassica napus* L. cv. Hyola 401). *Iranian Journal of Crop Sciences*, 18(3), pp.196-217. [In Persian].

- Kamanga, R.M., Mbega, E. and Ndakidemi, P., 2018. Drought tolerance mechanisms in plants: Physiological responses associated with water deficit stress in *Solanum lycopersicum*. *Advances in Crop Science and Technology*, 6(3), pp.1-8. <https://doi.org/10.4172/2329-8863.1000362>
- Kochaki, A.R. and Khaje Hosseini, M.J., 2008. Modern agriculture: First Edition. Publications University of Mashhad, Iran, p.712. [In Persian].
- 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. *Physiologia Plantarum*, 103, pp.1-7. <https://doi.org/10.1034/j.1399-3054.1998.1030101.x>
- Liu, Y., Subhash, C., Yan, J., Song, C. and Zhao, J., Li, J., 2011. Maize leaf temperature responses to drought: Thermal imaging and quantitative trait loci (QTL) mapping. *Environmental and Experimental Botany*, 71, pp.158-165. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2010.11.010>
- Lutts, S., Kinet, J.M. and Bouharmont, J., 1996. NaCl- induced senescence in leaves of rice (*Oryza sativa* L.) cultivars differing in salinity resistance. *Annals of Botany*, 78, pp.389-398. <https://doi.org/10.1006/anbo.1996.0134>
- Ma, D., Sun, D., Wang, C., Ding, H., Qin H., Hou, J., Huang, X., Xie, Y. and Guo, T., 2017. Physiological responses and yield of wheat plants in zinc-mediated alleviation of drought stress. *Frontiers in Plant Science*, 8, pp.860-867. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00860>
- Machado, C.F.R., Araújo, O.D.Q.F., de Medeiros, J.L. and de Brito Alves, R.M., 2018. Carbon dioxide and ethanol from sugarcane biorefinery as renewable feedstocks to environment-oriented integrated chemical plants. *Journal of Cleaner Production*, 172, pp.1232-1242. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2017.10.234>
- Madanes, S., Hunsche, M. and Noga, G., 2019. Methanol as a potential resource for drought stress tolerance. *Plant Physiology and Biochemistry*, 139, pp.123-132.
- Mita, S., Murano, N., Akaike, M. and Nakamura, K., 1997. Mutants of *Arabidopsis thaliana* with pleiotropic effects on the expression of the gene for beta-amylase and on the accumulation of anthocyanin those are inducible by sugars. *Plant Journal*, 11, pp.841-851. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313x.1997.11040841.x>
- Mousavi Sardou, S.F., Khammari, I., Mousavi Nick, S.M., Maghsoudi, A.A. and Allahdou, M., 2023. The effect of drought stress and potassium sulfate on seed yield and physiological traits of quinoa plant. *Journal of Crop Science Research in Arid Regions*, 5(1), pp.37-49. [In Persian]. <https://doi.org/10.22034/csrar.2023.356951.1277>
- Nonomura, A.R., Benson, A. and Douce, R., 2000. Metabolism of methanol in plant cells. Carbon-13 nuclear magnetic resonance studies. *Plant Physiology*, 123, pp.287-296. <https://doi.org/10.1104/pp.123.1.287>
- Nouriyani, H., 2021. Response of leaf gas exchanges and grain yield of S.C. 704 Maize to salicylic acid foliar application under water deficit stress. *Crop Physiology Journal*, 13 (50), pp.131-163. [In Persian].
- Nouriyani, H., 2023. Environmental Stresses and Plants Production (Physiological, Biochemical and Molecular Approaches). Payame Noor University Press, Iran, 224p. [In Persian].

- Patel, P., Bhatt, S. and Trivedi, R., 2020. Effect of methanol foliar application on pigment content in plants under drought conditions. *Journal of Plant Stress Biology*, 6(2), pp.101-109.
- Rai, G.K., Kumar, R.R., Bagati, S., 2021. Abiotic stress tolerance mechanisms in plants. CRC Press. <https://doi.org/10.1201/9781003163831>
- Ramirez, I., Dorta, F., Espinoza, V., Jimenez, E., Mercado, A. and Pena-Cortes, H., 2006. Effects of foliar and root applications of methanol on the growth of arabidopsis, tobacco and tomato plants. *Journal Plant Growth Regulation*, 25, pp.30-44. <https://doi.org/10.1007/s00344-005-0027-9>
- Ramroudi, M., Chezgi, M. and Galavi, M., 2016. Effect of methanol spraying on quantitative traits and osmotic adjustments in Moldavian (*Dracocephalum moldavica* L.) under low irrigation conditions. *Iranian Journal of Field Crop Science*, 48(1), pp.149-158. [In Persian].
- Rezaie Allolo, A., Sanikhani, M., Kheiry, A. and Yaghoobi, M., 2024. Effect of ethanol and methanol foliar application on biochemical indices of *Digitalis purpurea* L. *Journal of Plant Process and Function*, 13(60), pp.367-382. [In Persian].
- Ritchie, S.W., Nguyen, H.T. and Holaday, A.S., 1990. Leaf water content and gas exchange parameters of two wheat genotypes differing in drought resistance. *Crop Science*, 30, pp.105-111. <https://doi.org/10.2135/cropsci1990.0011183X003000010025x>
- Sen, S.K., Chouhan, D., Das, D., Ghosh, R. and Mandal, P., 2020. Improvisation of salinity stress response in mung bean through solid matrix priming with normal and nano-sized chitosan. *International Journal of Biological Macromolecules*, 145, pp.108-123. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.12.170>
- Shukla, V., Kumar, S. and Kumar, N., 2017. Plant Adaptation Strategies in Changing Environment. Published Springer, 386p. <https://doi.org/10.1007/978-981-10-6744-0>
- Simova-Stoilova, L., Demirevska, K., Petrova, T., Tsenov, N. and Feller, U., 2008. Antioxidative protection in wheat varieties under severe recoverable drought at seedling stage. *Plant Soil and Environment*, 54, pp.529-536. <https://doi.org/10.17221/427-pse>
- Xiao-Tang, J., Feng-Chun, C., Chun-Gian, L., Rong-Feng, J., Christie, P. and Fu-Suo, Z., 2008. Yield and nicotine content of flue cured tobacco as affected by soil nitrogen mineralization Pedosphere. *Field Crops Research*, 18(2), pp.227-235. [https://doi.org/10.1016/s1002-0160\(08\)60011-9](https://doi.org/10.1016/s1002-0160(08)60011-9)
- Yamori, M., Hikosaka, K. and Way, D.A., 2013. Temperature response of photosynthesis in C3, C4, and CAM plants: temperature acclimation and temperature adaptation. *Photosynthesis Research*, 13, pp.74-76. <https://doi.org/10.1007/s11120-013-9874-6>
- Yang, X., Lu, M., Wang, Y., Wang, Y., Liu, Z. and Chen, S., 2021. Response mechanism of plants to drought stress. *Horticulture*, 7, pp.50-61. <https://doi.org/10.3390/horticulturae7030050>
- Yordanov, I., Velikova, V. and Tsonev, T., 2003. Plant responses to drought and stress tolerance. *Bulgarian Journal of Plant Physiology*, 2, pp.187-206.