تنش‌های محیطی در علوم زراعی
Environmental Stresses in Crop Sciences

مجله تنش‌های محیطی در علوم زراعی
جلد ششم، شماره دوم، نیمه دوم ۹۲
۱۷۰-۱۵۹

فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدان و ترکیبات بیوشیمیایی گیاه گاوزبان اروپایی (*Borago officinalis* L.) در واکنش به تیمارهای تنش خشکی و اسید هیومیک

مصطفی حیدری[1*]، حمید رضا میری[2]، آزاد مینایی[3]

۱. دانشیار گروه زراعت و اصلاح نباتات- دانشگاه شاهرود، ۲. استادیار گروه زیست شناسی دانشگاه زابل،
۳. دانشجوی کارشناسی ارشد باغبانی- دانشگاه زابل

تاریخ دریافت: ۹۲/۰۱/۲۱؛ تاریخ پذیرش: ۹۲/۰۶/۵

چکیده

تاثیر تنش خشکی بر گیاهان پیچیده و از جنبه‌های مختلفی قابل بررسی است. در این راستا مطالعه واکنش‌های فیزیولوژیکی می‌تواند به شناسایی موثر در مقاومت به خشکی مفید و تاثیرگذار باشد. به منظور بررسی اثرات تنش خشکی و تیمارهای مختلف اسید هیومیک بر رنگدانه‌های فتوسنتزی، آنزیم‌های آنتی اکسیدان و ترکیبات بیوشیمیایی درگیر در تنظیم اسمزی (پرولین و کربوهیدرات محلول) در گیاه گاوزبان اروپایی، آزمایشی به صورت کرت‌های خرده شده و در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی با سه تکرار در سال زراعی ۹۱-۱۳۹۰ در مزرعه تحقیقاتی دانشگاه زابل اجرا گردید. تیمارهای خشکی شامل شاهد یا ۹۰ درصد ظرفیت زراعی (W_1)، ۷۰ درصد ظرفیت زراعی (W_2) و ۵۰ درصد ظرفیت زراعی مزرعه (W_3) به عنوان عامل اصلی و چهار سطح محلول پاشی اسید هیومیک شامل صفر=H_1 ، ۱/۵=H_2، ۳ =H_3 و ۴/۵ =H_4 لیتر در هزار لیتر آب به عنوان عامل فرعی در نظر گرفته شدند. نتایج تجزیه آماری داده‌ها نشان داد تنش خشکی تاثیر معنی‌داری بر میزان کلروفیل a و b، کربوهیدرات محلول، پرولین و فعالیت دو آنزیم آنتی اکسیدان اسکوربات پراکسیداز (APX) وگایاکول پراکسیداز (GPX) در بافت سبز برگ‌های گیاه گاوزبان دارد. با افزایش سطح تنش خشکی از شاهد به W_3 بر میزان کربوهیدرات محلول، فعالیت آنزیم‌های APX و GPX افزوده و از مقادیر کلروفیل a و b کاسته شدند. در این بین افرایش پرولین تنها تا سطح خشکی W_2 معنی‌دار بود. تیمار اسید هیومیک در سطوح مختلف تیمار خشکی بجز آنزیم کاتالاز، کلروفیل b و رنگدانه کارتنوئید تاثیر معنی‌دار و مثبتی بر کلیه فاکتورهای مورد مطالعه فوق داشت. براساس نتایج این آزمایش، در بالاترین سطح خشکی (W_3) محلول پاشی اسید هیومیک به میزان ۱/۵ تا ۳ لیتر در هزار لیتر آب از بیشترین تاثیر بر تنظیم کننده‌های اسمزی، رنگدانه‌های فتوسنتزی و آنزیم آنتی کسیدان APX برخودار و در مقاومت به خشکی موثرتر بود.

واژه‌های کلیدی: **آنزیم های اکسایشی، اسمولیت‌ها، پرولین، کلروفیل، کم آبیاری.**

مقدمه

ایران با دارا بودن اقلیمی خشک و نیمه خشک با عوامل محدود کننده محیطی متعدد در جهت تولید محصولات زراعی، باغی و دارویی روبروست. در این بین خشکی در راس عوامل محدود کننده تولید محصولات کشاورزی قرار دارد. خشکی از طریق عوامل روزنه‌ای و غیر روزنه‌ای بر شدت فتوسنتز تاثیر می‌گذارد. از آنجایی که برای عمل فتوسنتز و تبادلات گازی باز بودن روزنه‌ها ضروری است، بنابراین در اثر کمبود آب و بسته شدن روزنه‌ها تبادلات گازی کاهش یافته و دی اکسید کربن کمتری در دسترس گیاهان قرار می گیرد (Liang et al., 1996). مون و آلگر (Munne and Alegre, 1999) در بررسی اثر تنش خشکی بر گیاه بادرنجبویه (*Melissa officinalis* L.) گزارش کردند که تنش خشکی باعث کاهش ۳ مگاپاسکالی پتانسیل آب گیاه، کاهش ۳۴ درصدی محتوی آب برگ،

نگارنده پاسخگو: مصطفی حیدری. آدرس: شاهرود- دانشکده کشاورزی دانشگاه شاهرود- کد پستی ۳۶۱۹۹۹۵۱۶۱
پست الکترونیک: Haydari2005@gmail.com

بسته شدن روزنه‌ها و در نتیجه سبب پائین آمدن جذب دی اکسید کربن و کاهش عملکرد گیاه گردید.

شناسایی مکانیسم‌های مقاومت به تنش‌ها از اهمیت زیادی در نحوه و چگونگی مقابله با آنها برخوردار است. در شرایط بروز تنش خشکی، گیاهان به منظور ادامه جذب آب، از طریق تجمع ترکیبات اسمزی از جمله کربوهیدرات و پرولین پتانسیل اسمزی خود را کاهش می‌دهند. در فرآیند تنظیم اسمزی تورژسانس ادامه می‌یابد، از این رو تنظیم اسمزی به توسعه سلولی و رشد گیاه در طی بروز تنش کمک می‌کند (Pessarkli, 1999). سید (Sayed, 1992) در آزمایش بروی گیاه فلفل بیان داشت که میزان پرولین گیاه در شرایط تنش خشکی بخصوص در ریشه‌ها افزایش می‌یابد. بالا رفتن میزان پرولین و کربوهیدرات‌ها در بخش-های مختلف گیاهان به نوعی بیانگر فعال شدن سیستم تنظیم اسمزی می‌باشد.

تنش خشکی همچنین موجب تغییر در متابولیسم گیاهان می‌شود، این امر بر تعادل هورمونی تاثیر خواهد گذاشت و نیز منجر به تولید گونه‌های اکسیژن فعال (ROS) که مسؤل یک نوع تنش ثانویه به نام تنش اکسیداتیو هستند می‌شوند. تمام این تغییرات تاثیر خود را بر رشد و نمو از طریق تجمع یون‌های سمی، ROSها، عدم تعادل روابط آبی و عناصر غذایی بر گیاهان اعمال خواهند کرد. ROSها دارای خاصیت اکسیدکنندگی قوی‌ای هستند و می‌توانند سبب خسارت به چربی‌ها، پروتئین‌ها، اسیدهای نوکلئیک و حتی خود غشاء سلول‌ها شوند. بنابراین مقاومت به شوری و دیگر تنش‌های محیطی از جمله خشکی، عناصر سنگین، ازون و سرما که با افزایش تولید ROS همراه هستند، وابسته به گسترش مکانیسم از بین بردن ROSها دارد. در جهت تخفیف خسارت اکسیداتیو ناشی از تولید ROSها، گیاهان از یک‌سری ترکیبات آنزیمی و غیرآنزیمی به عنوان سیستم آنتی‌اکسیدانی استفاده می‌نمایند. در بین ترکیبات غیرآنزیمی، ترکیبات آب‌دوست[1] همانند آسکوربات و ترکیبات چربی‌دوست[2]، همانند توکوفرول‌ها و کارتنوئیدها قابلیت از بین بردن ROSها را دارند. از ترکیبات آنزیمی می‌توان به سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز و پراکسیدازها اشاره کرد (Jain et al., 2001).

در مطالعات صورت گرفته توسط محققین از جمله گراتان و گریو (Grattan and Grieve, 1999) مشخص شد که تنش شوری و خشکی باعث برهم زدن تعادل تغذیه‌ای در گیاهان می‌شوند. آنها بیان کردند با تکمیل عناصر مورد نیاز از طریق خاک یا محلول‌پاشی می‌توان وضعیت رشد را تا حدی بهبود بخشید. امروزه با توجه به ملاحظات زیست محیطی استفاده از انواع اسیدهای آلی برای بهبود خصوصیات کمی و کیفی محصولات زراعی و باغی رواج پیدا کرده است. اسید هیومیک یکی از این ترکیبات است. مقادیر بسیار کم از اسیدهای آلی اثرات قابل ملاحظه‌ای در بهبود خصوصیات فیزیکی، شیمیایی و بیولوژیکی خاک داشته و به دلیل وجود ترکیبات شبه هورمونی اثرات مفیدی در افزایش تولید و بهبود محصولات کشاورزی دارند. استفاده از اسید هیومیک باعث رشد اندام هوایی و افزایش تولید محصولات زراعی و باغی می‌شود، که دلیل آن افزایش جذب عناصری نظیر ازت، کلسیم، فسفر، پتاسیم ، منگنز، آهن، روی و مس می‌باشد (Harper et al., 2000). مطالعات نشان داده که کاربرد اسید هیومیک بر روی گیاه توتون و گیاهان دارویی موجب زیاد شدن میزان آلکالوئیدها در برگها می‌شود، همچنین اسید هیومیک موجب انتقال گلوکز از بین غشاهای سلولی در گیاهان پیاز، چغندرقند و آفتابگردان و موجب افزایش میزان کربوهیدرات در سیب زمینی، چغندرقند و گوجه فرنگی می‌شود (Tan, 2003). طاهر و همکاران (Taher et al., 2011) اثر سطوح مختلف اسید هیومیک را بر روی گندم مورد مطالعه قرار دادند. نتایج آنها نشان داد سطوح مختلف اسید هیومیک اختلاف معنی‌داری بین وزن ساقه و ارتفاع بوته و میزان جذب نیتروژن در رشد گندم دارد. همچنین نتایج آنها نشان داد اسید هیومیک موجب بهبود افزایش جذب فسفر، پتاسیم، منیزیم ، مس و روی می‌گردد.

در بین گیاهان دارویی، گیاه گاوزبان اروپایی (*Borago officinalis* L.) از جایگاه ویژه‌ای در طب سنتی برخودار است. این گیاه از تیره گاوزبان، علفی، یک‌ساله، به ارتفاع ۴۵ تا ۷۰ سانتی‌متر، رنگ گلهای آن آبی و به ندرت سفید یا گلی است. زمان مناسب برای کشت این گیاه اوایل بهار بوده، همچنین با توجه به شرایط محیطی امکان کشت آن در پاییز و اواخر زمستان نیز وجود دارد. این گیاه امروزه در غالب نقاط دنیا به منظور استفاده‌های درمانی پرورش می‌یابد. از

[1]. Hydrophilic
[2]. Lipophilic

گل و برگ این گیاه به عنوان یک ماده معرق، آرام کننده و تصفیه کننده خون استفاده می‌شود (Zargari, 2006).

اگرچه تاکنون تحقیقات وسیعی در رابطه با تاثیر تنش خشکی بر روی گیاهان زراعی انجام شده، اما رفتار گیاهان دارویی و معطر تحت شرایط کمبود آب به خوبی مطالعه نشده است. لذا هدف از این آزمایش بررسی اثرات تنش خشکی و اسید هیومیک بر فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانی، تغییر در میزان ترکیبات بیوشیمیایی درگیر در تنظیم اسمزی و رنگدانه‌های فتوسنتزی در گیاه دارویی گاوزبان اروپایی بوده است.

مواد و روش‌ها

این آزمایش در سال زراعی ۹۱- ۱۳۹۰ در مزرعه تحقیقاتی دانشگاه زابل با طول جغرافیایی ۶۱ درجه و ۲۹ دقیقه شرقی، عرض جغرافیایی ۳۱ درجه و ۲ دقیقه شمالی و ارتفاع ۴۸۷ متر از سطح دریا انجام گرفت. متوسط بارندگی سالانه منطقه ۶۳ میلی‌متر، متوسط حداقل و حداکثر دمای سالانه آن به ترتیب ۱۶ و ۳۰ درجه سانتی‌گراد و بر اساس طبقه‌بندی آمبرژه از لحاظ اقلیمی جزو مناطق گرم و خشک به شمار می‌رود. نتایج حاصل از تجزیه شیمیایی خاک محل آزمایش قبل از کاشت در جدول ۱ ارائه شده است.

جدول ۱. خصوصیات فیزیکی و شیمیایی خاک محل آزمایش در عمق ۳۰-۰ سانتیمتری.

Table1: Physical and chemical characters of soil (0-30 cm).

بافت خاک Soil texture	شن Sand	رس Clay	لای Loam	منگنز Mn	روی Zn	آهن Fe	پتاسیم K	فسفر P	نیتروژن N	pH	هدایت الکتریکی EC (ds m^{-1})
	درصد (٪)			mg.kg^{-1}							
لومی- شنی Sandy loam	41	32	27	0.31	1.04	1.14	155	3.6	2.4	7.8	3.1

آزمایش به صورت کرت‌های خرد شده و در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی با سه تکرار اجرا شد. تیمارهای خشکی به عنوان عامل اصلی شامل شاهد یا ۹۰ درصد ظرفیت زراعی (W_1)، ۷۰ درصد ظرفیت زراعی (W_2) و ۵۰ درصد ظرفیت زراعی مزرعه (W_3) و چهار سطح محلول پاشی اسید هیومیک شامل صفر=H_1، ۱/۵=H_2، ۳=H_3 و ۴/۵=H_4 لیتر در هزار لیتر آب به عنوان عامل فرعی در نظر گرفته شدند. در این آزمایش، از گونه گاوزبان اروپایی و اسید هیومیک ۸۰ درصد با نام تجاری هیومکس ساخت شرکت کشاورزی هامون استفاده گردید. مقدار مورد نیاز اسید هیومیک در این طرح برای هر کرت محاسبه و در طی دو مرحله رشد رویشی (۳۰ روز بعد از کاشت) و اوایل گلدهی (۵۰ روز بعد از کاشت) بصورت محلول پاشی بر روی گیاهان در کرت‌ها اعمال گردید.

قطعه زمین مورد نظر برای این طرح توسط گاو آهن برگردان‌دار شخم، سپس برای نرم کردن کلوخه‌ها دوبار دیسک زده شد. قطعه آزمایشی با استفاده از گچ خط‌کشی، نهرهای اصلی و فرعی تعبیه و در نهایت کرت‌های اصلی و فرعی مرزبندی، تسطیح و خطوط کشت به صورت جوی و پدر آنها ایجاد شدند. عملیات کاشت در ۱۵ اسفند ماه ۱۳۹۰ انجام گرفت. ابعاد هر کرت ۳×۲ متر، فاصله بوته روی ردیف‌ها ۲۵ سانتی‌متر و فاصله بین ردیف‌ها ۳۵ سانتی‌متر در نظر گرفته شدند. قبل از کاشت معادل ۷۵ کیلوگرم در هکتار فسفر از منبع سوپر فسفات تریپل و ۵۰ کیلوگرم در هکتار پتاسیم از منبع سولفات پتاسیم به خاک اضافه گردید. مقدار ۷۵ کیلوگرم در هکتار نیتروژن از منبع اوره برای تامین نیتروژن مورد نیاز گیاهان در این آزمایش لحاظ گردید که نصف آن قبل از کاشت و نصف باقیمانده قبل از شروع اعمال تنش خشکی در اختیار گیاهان قرار داده شدند. بعد از کاشت آبیاری با استفاده از سیفون انجام گرفت. اعمال تنش خشکی در این آزمایش از ۲۰ روز بعد از سبزشدن گیاهان آغاز و تا انتهای دوره رشد ادامه یافت. جهت تعیین دور آبیاری در تیمارهای مختلف تنش از دستگاه TDR مدل دلتا ساخت کشور انگلستان استفاده گردید.

در این آزمایش جهت تعیین مقادیر رنگدانه‌های فتوسنتزی، فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدان و ترکیبات بیوشیمیایی ده روز قبل برداشت نهایی نمونه‌هایی از برگ-های جوان تهیه و پارامترهای فوق اندازه‌گیری شدند. مقادیر کلروفیل a و b با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر و روش آرنون (Arnon, 1967) تعیین شدند. برای این منظور مقدار ۰/۲ گرم از بافت سبز برگ‌های جوان در ۱۰ میلی‌لیتر استون ۸۰ درصد سائیده، نمونه‌ها به مدت ده دقیقه و با

سرعت ۱۶۰۰ دور سانتریفوژ شدند. سپس مقدار کلروفیل a در طیف جذبی ۶۶۳ نانومتر، کلروفیل b در طیف جذبی ۶۴۵ نانومتر و کارتنوئید در طیف ۴۷۰ نانومتر قرائت و اندازه‌گیری شدند. برای کارتنوئید هم از روش آرنون (Arnon, 1967) استفاده شد. مقادیر کربوهیدرات محلول در برگ‌ها، با استفاده از اتانول ۹۵٪ و بر اساس روش اسید سولفوریک صورت گرفت (Irrigoyen et al., 1992). همچنین برای پرولین از روش بیتز و همکاران (Bates et al., 1973) استفاده شد.

استخراج عصاره وروش اندازه گیری آنزیم‌ها

مواد و محلول‌ها:

تهیه بافر Ice–Cold Extraction: این محلول شامل محلول بافر پتاسیم فسفات ۱۰۰ میلی‌مولار با pH=۷ و محلول EDTA 0.1 mM درحجم cc ۴ بود. برای محلول پتاسیم فسفات از دو نمک KH_2PO_4 و K_2HPO_4 استفاده شدند. جهت تهیه محلول ابتدا محلول ۱ مولار از هر کدام از این نمک‌ها تهیه شد، سپس cc ۲۵ از آنها برداشت، با هم مخلوط و به حجم ۱۰۰ سی‌سی رسانده شدند. pH این محلول در حد ۷ تنظیم گردید.

تهیه محلول EDTA: این محلول در حجم ۵۰ سی‌سی و با غلظت ۰/۲ مولار تهیه شد. برای تهیه بافر Ice–Cold Extraction، ۱۶۰۰ میکرولیتر از بافر پتاسیم فسفات به همراه ۲۰ میکرولیتر EDTA برداشته و به حجم ۴cc رسانده شد. در نهایت برای اندازه‌گیری آنزیم‌های آنتی اکسیدان، ۰/۲ گرم از بافت سبز برگ برداشت و با ۴ سانتی-متر مکعب بافر Ice–cold extraction در هاون سرد کاملاً ساییده و به صورت همگن در آورده شدند. مخلوط همگن از کاغذ صافی عبور و به مدت ۱۵ دقیقه با دور ۱۶۰۰۰ سانتریفوژ شدند. سپس فاز بالایی به عنوان عصاره پروتئینی برای سنجش فعالیت آنزیمی مورد استفاده گردید. همه این عملیات در دمای ۴ درجه سانتیگراد انجام گرفت. در نهایت جهت اندازه گیری فعالیت آنزیم کاتالاز (CAT) از روش بیر و سیزر (Beers and Sizer, 1952)، آنزیم آسکوربات پراکسیداز (APX) از روش ناکانو و آساد (Nakano and Asada, 1981) و گایاکول پراکسیداز (GPX) از روش یوربانک و همکاران (Urbanek et al., 1991) استفاده شدند.

در پایان داده‌های حاصل با استفاده از نرم‌افزار SAS تجزیه و مقایسه میانگین‌ها براساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح ۵٪ انجام پذیرفت. برای رسم نمودار و جداول از EXCEL استفاده گردید.

نتایج و بحث

بیوماس، فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدان و مجموع آنزیم-های آنتی اکسیدان

نتایج تجزیه آماری داده‌ها در جدول ۲ نشان می‌دهد به جز آنزیم کاتالاز (CAT)، تیمار تنش خشکی تاثیر معنی‌داری بر میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدان اسکوربات پراکسیداز (APX)، گایاکول پراکسیداز (GPX)، مجموع کل آنزیم‌های آنتی اکسیدان و میزان بیوماس تولیدی دارا بودند. مقایسه میانگین داده‌ها براساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح ۵ درصد نشان داد با بالا رفتن سطح تنش خشکی از تیمار شاهد به W_3 (۵۰ درصد ظرفیت زراعی مزرعه)، بر میزان فعالیت هر دو آنزیم APX و GPX و مجموع کل آنزیم‌های آنتی اکسیدان به طور معنی‌داری افزوده شد. در این بین بالاترین میزان بیوماس در تیمار W_2 حاصل شد و با افزایش سطح تنش به W_3 از مقدار بیوماس تولیدی کاسته شد. این افزایش برای APX، GPX و مجموع کل آنزیم‌های آنتی اکسیدان به ترتیب معادل ۳۴/۶ ، ۴۶/۵ و ۱۱/۵درصد بودند (جدول ۳). در این آزمایش هر چند تنش خشکی سبب افزایش میزان فعالیت دو آنزیم APX و GPX گردید، اما همبستگی معنی‌دار و مثبتی با بیوماس تولیدی از خود نشان ندادند (جدول ۴).

تنش‌های غیر زنده نظیر شوری و خشکی تولید و تجمع گونه‌های فعال اکسیژن را القاء می‌کنند که در غلظت‌های بالا برای سلول زیان‌آور هستند. تولید این ترکیبات نظیر رادیکال سوپر اکسید (O_2^-)، پراکسید هیدروژن (H_2O_2) و رادیکال هیدروکسیل (OH^-) باعث پراکسیداسیون کردن چربی‌ها، غیرفعال شدن آنزیم‌ها، خسارت به اسیدهای نوکلئیک و تخریب غشاء سلول می‌شوند (Bailly, 2004). در این بین تولید آنزیم‌های آنتی اکسیدانت نظیر کاتالاز (CAT)، پراکسیداز (POD)، اسکوربات پراکسیداز (APX)، سوپراکسید دسموتاز (SOD) و گلوتاتیون ریدکتاز (GR) باعث حذف و غیر فعال کردن گونه‌های فعال اکسیژن می-شوند (McDonald, 1999).

جدول ۲. نتایج تجزیه واریانس آنزیم های آنتی اکسیدان، رنگدانه های فتوسنتزی و ترکیبات بیوشیمیایی گاوزبان در تیمارهای تنش خشکی و اسید هیومیک.

Table 2. Analysis of variance on antioxidant enzymes, photosynthetic pigments and biochemical components in *Borago officinalis* under water stress and humic acid.

منابع تغییرات S.O.V	درجه آزادی df	ماده خشک Biomass	آنزیم های آنتی اکسیدان Antioxidant enzymes				اسمولیت ها Osmolites		رنگدانه های فتوسنتزی Photosynthetic pigments		
			اسکوربات پراکسیداز APX	گایاکول پراکسیداز GPX	کاتالاز CAT	مجموع آنزیم های آنتی اکسیدان Total antioxidant enzymes	پرولین Proline	کربوهیدرات Carbohydrate	کلروفیل a Chlorophyll a	کلروفیلb Chlorophyll b	کارتنوئید Carotenes
تکرار Replicate	2	5220.2^{ns}	0.0011^{ns}	0.000019^{ns}	0.006^{ns}	0.0116	1.62^{*}	0.255^{*}	1.67^{ns}	0.11^{ns}	2.07^{ns}
خشکی Water stress (W)	2	115550.6^{**}	0.03^{**}	0.082^{*}	0.003^{ns}	0.152	15.48^{**}	0.352^{*}	3.04^{*}	5.27^{*}	0.045^{ns}
خطای a Error a	4	1774.4	0.0034	0.011	0.005	0.0138	0.454	0.0186	0.76	1.01	0.69
اسید هیومیک Humic acid (H)	3	30401.6^{**}	0.0031^{*}	0.017^{*}	0.0058^{ns}	0.0194	1.11^{*}	0.177^{*}	2.63^{*}	5.31^{*}	0.25^{ns}
خشکی* اسید هیومیک W*H	6	18227.2^{**}	0.0027^{*}	0.095^{**}	0.0056^{ns}	0.0104	4.39^{**}	0.145^{*}	4.81^{**}	1.49^{ns}	0.66^{ns}
خطای b Error b	18	4360.03	0.0007	0.0041	0.0058	0.01001	0.44	0.064	1.08	2.64	0.21
	CV %	*19.8*	*12.6*	*7.3*	*5.6*	*5.4*	*14.5*	*8.88*	*17.8*	*7.5*	*20.1*

ns، *، ** به ترتیب غیر معنی دار، معنی دار در سطح احتمال ۵ و ۱ درصد

*, **, ns are significant at 5 and 1% level and not significant, respectively.

جدول ۳. مقایسه میانگین‌های تیمار تنش خشکی و اسید هیومیک بر میزان آنزیم های آنتی اکسیدان، رنگدانه های فتوسنتزی و ترکیبات بیوشیمیایی گاوزبان.

Table 3. Mean comparisons of the effect of water stress and humic acid on antioxidant enzymes, photosynthetic pigments and biochemical components in *Borago officinalis*

تیمار Treatment	ماده خشک Biomass	آنزیم های آنتی اکسیدان Antioxidant enzymes				اسمولیت ها Osmolites		رنگدانه های فتوسنتزی Photosynthetic pigments		
		اسکوربات پراکسیداز APX	گایاکول پراکسیداز GPX	کاتالاز CAT	مجموع آنزیم های آنتی اکسیدان Total antioxidant enzymes	پرولین Proline	کربوهیدرات Carbohydrate	کلروفیل a Chlorophyll a	کلروفیل b Chlorophyll b	کارتنوئید Carotenes
	$g.m^{-2}$	----------($\mu mol\ H_2O_2\ min^{-1}\ mg^{-1}$ prot)----------				(μ mol. g^{-1}. Fw)	(μg Glucose. g^{-1}.Fw)	----------($mg.g^{-1}$. FW) ----------		
Water stress خشکی										
۹۰٪ ظرفیت زراعی 90% FC	322.7b	0.164b	0.190b	1.381a	1.73b	3.30b	2.67b	5.91a	2.57a	2.24a
۷۰٪ ظرفیت زراعی 70% FC	434.3a	0.250a	0.261ab	1.352a	1.86ab	5.52a	2.967a	5.82a	2.37a	2.35a
۵۰٪ ظرفیت زراعی 50% FC	238.7c	0.252a	0.355a	1.353a	1.96a	4.81a	2.969a	4.79b	2.07b	2.27a
اسید هیومیک (لیتر در هزار لیتر آب) **Humic acid (l.1000 l^{-1})**										
0	325.8b	0.245a	0.237b	1.40a	1.88a	2.74b	4.13b	5.58b	2.08ab	2.31a
1.5	411.7a	0.217ab	0.333a	1.3499a	1.90a	3.06a	4.40ab	5.56b	3.46a	2.15a
3	317.4b	0.224ab	0.246b	1.3497a	1.82a	2.79ab	4.77ab	5.80b	1.66b	2.18a
4.5	272.6b	0.20b	0.256b	1.3496a	1.81a	2.87ab	4.89a	6.43a	2.43ab	2.51a

در هر ستون و برای هر تیمار، دارای حداقل یک حرف مشترک، بر اساس آزمون چند دامنه ای دانکن در سطح احتمال ۵ درصد تفاوت معنی‌داری ندارند.

Means, in each column and for each treatment, followed by at least one similar letter are not significantly different at 5% probability level- using Duncan Multiple Range Test.

جدول ۴. ضرائب همبستگی بین بیوماس و میزان آنزیم های آنتی اکسیدان، رنگدانه های فتوسنتزی و ترکیبات بیوشیمیایی در گاوزبان

Table 4.Relationship between biomass, antioxidant enzymes, photosynthetic pigments and biochemical components in *Borago officinalis*

	بیوماس Biomass	کربوهیدرات Carbohydrate	پرولین Proline	کلروفیل a Chlorophyll a	کلروفیلb Chlorophyll b	کارتنوئید Carotenes	گایاکول پراکسیداز GPX	اسکوربات پراکسیداز APX	کاتالاز CAT
بیوماس Biomass	1								
کربوهیدرات Carbohydrate	-0.066^{ns}	1							
پرولین Proline	-0.05^{ns}	-0.11^{ns}	1						
کلروفیل a Chlorophyll a	0.063^{ns}	-0.122^{ns}	-0.135^{ns}	1					
کلروفیلb Chlorophyll b	0.056^{ns}	-0.121^{ns}	-0.1357^{ns}	0.083^{ns}	1				
کارتنوئید Carotenes	0.058^{ns}	0.925**	-0.116^{ns}	-0.106^{ns}	0.028^{ns}	1			
گایاکول پراکسیداز GPX	-0.058^{ns}	-0.1079^{ns}	0.549**	-0.1137^{ns}	-0.125^{ns}	-0.0747^{ns}	1		
اسکوربات پراکسیداز APX	-0.066^{ns}	-0.089^{ns}	-0.1250^{ns}	0.431*	-0.1307^{ns}	-0.105^{ns}	0.0024^{ns}	1	
کاتالاز CAT	-0.0716^{ns}	-0.1118^{ns}	-0.1058^{ns}	-0.077^{ns}	0.799**	-0.098^{ns}	-0.126^{ns}	-0.123^{ns}	1

^{ns}، *، ** به ترتیب عدم معنی داری، معنی دار در سطح ۵ و ۱ درصد

*, **, ns are significant at 5 and 1% level and not significant, respectively.

تیمار اسید هیومیک در این آزمایش تاثیر معنی‌داری بر بیوماس تولیدی و میزان فعالیت دو آنزیم APX و GPX در گیاه گاوزبان داشت، اما تاثیر آن بر فعالیت آنزیم CAT و مجموع کل آنزیم‌های آنتی اکسیدان معنی‌دار نبود (جدول ۲). مقایسه میانگین داده‌ها نشان داد بیشترین میزان فعالیت GPX و بیوماس تولیدی در تیمار H_2 (۱/۵ لیتر اسید هیومیک در هزار لیتر آب) و APX در تیمار شاهد (بدون مصرف اسید هیومیک) بود (جدول ۳). اسید هیومیک می‌تواند با بهبود جذب عناصر سدیم، پتاسیم، کلسیم و منیزیم و نیز برخی از عناصر ریزمغذی سبب افزایش فتوسنتز، رشد و تولید برخی از آلکالوئیدها در گیاهان شود (Santiago, et al., 2008).

اثر متقابل تنش خشکی و تیمار اسید هیومیک بر میزان فعالیت دو آنزیم APX و GPX و بیوماس تولیدی معنی‌دار و تاثیر آن بر فعالیت آنزیم CAT و مجموع کل آنزیم‌های آنتی اکسیدان معنی‌دار نبود (جدول ۲). در زمان قرارگیری گیاه گاوزبان در معرض سطوح مختلف تنش خشکی و اسید هیومیک (شکل‌های ۱ تا ۳) مشاهده گردید بر میزان فعالیت دو آنزیم APX و GPX در تمامی سطوح تنش خشکی افزوده شد، اما بیشترین تاثیر اسید هیومیک بر میزان فعالیت GPX در تیمار H_2 و APX در تیمار H_3 بود. در این بین بیشترین میزان بیوماس تولیدی در تیمار خشکی W_2 و با مصرف و محلول‌پاشی ۱/۵ لیتر در هزار لیتر آب (W_2H_2) حاصل شد. افزایش فعالیت دو آنزیم GPX و APX در گیاه گاوزبان به نوعی بیانگر فعال شدن سیستم آنتی اکسیدانی برای از بین بردن رادیکال‌های آزاد اکسیژن در این گیاه در مواجهه با تنش خشکی بوده است. در طی بروز تنش خشکی به سبب بسته شدن روزنه‌ها و در نتیجه کاهش میزان هدایت روزنه‌ای تغییراتی در چرخه انتقال الکترون در فتوسیستم‌های I و II به وجود می‌آید. در این بین به سبب کاهش میزان تولید قند، انرژی حاصل از فوتون‌های جذب شده در کلروپلاست صرف تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن می‌گردد. گونه‌های مختلف رادیکال اکسیژن همانند O_2^-، H_2O_2 و رادیکال هیدروکسیل (OH^-) می توانند به طور مستقیم سبب خسارت به چربی‌های موجود در غشاء سلول، غیر فعال کردن آنزیم‌ها و خسارت به اسیدهای نوکلئیک شوند (Stepien and Klobus, 2005).

استفاده از اسید هیومیک نیز در این بین بر تقویت این سیستم در گاوزبان موثر بود، اما بیشترین تاثیر آن در محلول‌پاشی ۳ لیتر در هزار لیتر آب یا تیمار H_3 بود. در خصوص نحوه تاثیر اسید هیومیک گزارش‌های متعددی وجود دارد، اما می‌توان آن را به عنوان یک ترکیب شبه هورمونی تلقی کرد که از طریق حفظ نفوذپذیری غشاء و افزایش متابولیسم سلولی، رشد گیاهان را در شرایط متفاوت محیطی افزایش می‌دهد (Cooper et al., 1998). هیومیک اسید می‌تواند با بهبود جذب نیتروژن سبب افزایش میزان آنزیم‌ها، انواع پروتئین‌ها بخصوص آنزیم‌ها و پروتئین‌های شرکت کننده در چرخه فتوسنتزی نظیر سیتوکروم‌ها، فردوکسین‌ها، پلاستوسیانین و آنزیم رابیسکو شده و از این طریق رشد را افزایش دهد (Dordas and Sioulas, 2008).

پرولین و کربوهیدرات محلول

نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده‌ها در این آزمایش نشان داد تنش خشکی تاثیر معنی‌داری بر میزان تجمع کربوهیدرات و پرولین در بافت سبز برگ‌های گیاه گاوزبان دارد (جدول ۲). مقایسه میانگین داده‌ها براساس میانگین‌های چند دامنه‌ای دانکن در سطح ۵ درصد نشان داد با افزایش سطح تنش خشکی از شاهد به ۵۰ درصد ظرفیت زراعی بر میزان کربوهیدرات افزوده شد. این افزایش برای پرولین تنها تا سطح W_2 (۷۰ درصد ظرفیت زراعی مزرعه) بود. میزان این افزایش برای کربوهیدرات و پرولین به ترتیب معادل ۹/۸ و ۴۰/۲ درصد بود (جدول ۳). تحقیقات هیر (Heuer, 1994) نشان داد در طی بروز تنش خشکی بر میزان تجمع ترکیبات آلی همانند پرولین و قندهای محلول در اندام‌های گیاهان افزوده می‌شود. پرولین اسیدآمینه ذخیره شده در سیتوپلاسم بوده و احتمالا در حفاظت از ساختمان ماکرومولکول‌های درون سلول در طی تنش خشکی نقش موثری دارد. پرولین در واقع به عنوان یک شاخص در تعیین میزان حساسیت به تنش شوری و خشکی در گیاهان به شمار می‌رود. بالا رفتن میزان این دو ترکیب در بافت‌های گیاهان به نوعی بیانگر فعال شدن مکانیسم تنظیم اسمزی است که شرایط را برای جذب بیشتر آب و املاح از محیط ریشه فراهم می‌آورد (Munns, 2002). براساس نظر گود و زاپلاچینسکی (Good and Zaplachiniski, 1994) تجمع ترکیباتی همانند پرولین و

اسیدهای آمینه و قندهای محلول در بافت سبز گیاه کلزا تحت تنش خشکی می‌تواند تا حدی شرایط لازم برای ادامه جذب آب از محیط ریشه را برای گیاه فراهم آورد، اما اتکای گیاهان به این ترکیبات آلی برای تنظیم اسمزی هزینه‌بر بوده و گیاه این هزینه را از طریق کاهش عملکرد ادا می‌کند. در این آزمایش هر چند همبستگی بین کربوهیدرات و پرولین به صورت منفی بود، اما از لحاظ آماری این رابطه معنی‌دار نبود (جدول ۴)

استفاده از اسید هیومیک در این آزمایش تاثیر معنی-داری بر میزان تجمع کربوهیدرات محلول و پرولین در بافت سبز گیاه گاوزبان داشت (جدول ۲) و سبب افزایش آنها گردید. این افزایش برای کربوهیدرات محلول تنها تا تیمار H_2 و برای پرولین تا بالاترین سطح تیمار اسید هیومیک مصرفی (H_4) ادامه داشت و موجب افزایش مقادیر کربوهیدرات و پرولین به ترتیب معادل ۱۰/۴ و ۱۵/۵ درصد گردید (جدول ۳). براساس نظر آیاس و گاستر (Ayas and Gulser, 2005) اسید هیومیک از طریق ایجاد شرایط مناسب برای افزایش در محتوای نیتروژن گیاهان سبب افزایش رشد و عملکرد می‌شود. همچنین اسید هیومیک با بالا بردن میزان تولید ترکیبات آلی نیتروژن‌دار همانند پروتئین و اسیدهای آمینه سرعت رشد و تولید بیوماس در گیاه بنت گراس را افزایش داد (Sharif, 2002).

اثر متقابل تنش خشکی و اسید هیومیک بر میزان تجمع دو ترکیب کربوهیدرات محلول و پرولین تاثیر معنی‌داری داشت (جدول ۲). همان طور که در شکل‌های ۴ و ۵ مشاهده می‌شود، خشکی سبب افزایش میزان دو ترکیب کربوهیدرات و پرولین در بافت سبز گیاه گاوزبان گردید، اما بیشترین میزان کربوهیدرات، در تیمار W_2H_2 و پرولین در تیمار W_3H_3 حاصل شد.

تاثیر تنش خشکی بر گیاهان معمولا همراه با بروز یکسری مکانیسم‌های مقاومت است. یکی از مکانیسم‌های کارآمد که به هنگام مواجه شدن با خشکی برای حفظ تورژسانس و آماس سلولی در گیاهان به وجود می‌آید، تنظیم اسمزی است. تنظیم اسمزی در اثر انباشت ترکیبات آلی و معدنی در بافت‌ها بوجود می‌آید (Good and Zaplachiniski, 1994). در این بین کربوهیدرات محلول و پرولین از اهمیت فراوانی برخوردارند. سید (Sayed, 1992) در آزمایشی روی فلفل بیان داشت که میزان پرولین گیاه در شرایط تنش خشکی به خصوص در ریشه‌ها افزایش می‌یابد. بالا رفتن میزان پرولین و کربوهیدرات‌ها در بخش‌های مختلف گیاهان به نوعی بیانگر فعال شدن سیستم تنظیم اسمزی در طی مواجه شدن با تنش می‌باشد. در این اثناء استفاده از ترکیبات آلی و نیز مواد معدنی مورد نیاز رشد می‌تواند تا حدی بر بهبود سیستم‌های مقاومتی گیاهان موثر باشد. نتایج محققان نشان داد که اسید هیومیک جذب نیترات و فعالیت آنزیم‌های ATPآز و نیز سنتز ترکیبات آلی نیتروژن‌دار را در گیاهان افزایش می‌دهد. به نظر می‌رسد فعال شدن پروتون غشاء پاسخ اولیه به اسید هیومیک در جذب عناصر غذایی و بالا بردن سنتز ترکیبات آلی پروتئینی باشد. مالکولم و واگان (Malcolm and Vaghuan, 1979) نشان دادند که مواد هیومیکی در افزایش فعالیت چندین آنزیم درگیر در سنتز ترکیبات آلی در گیاهان نقش مثبت و موثری دارند.

کلروفیل a، b و کارتنوئید

نتایج تجزیه واریانس داده‌ها در جدول ۲ نشان می‌دهد تنش خشکی تاثیر معنی‌داری بر میزان کلروفیل a و b در برگ-های گیاه گاوزبان داشت، اما تاثیر آن بر کارتنوئید معنی‌دار نبود. مقایسه میانگین داده‌ها نشان داد با افزایش تنش خشکی از تیمار شاهد به W_3، از میزان کلروفیل a و b کاسته شدند. این کاهش برای کلروفیل a و b به ترتیب معادل ۱۸/۹ و ۱۹/۴ درصد بودند (جدول ۳). میزان کلروفیل در گیاهان زنده یکی از فاکتورهای مهم برای فتوسنتز به شمار می‌رود. در این بین بسته به شدت، مدت و مرحله رشدی، تاثیر خشکی بر مقادیر کلروفیل‌ها در گیاهان متفاوت می‌باشد. کاهش کلروفیل a در اثر تنش خشکی مربوط به افزایش تولید رادیکال‌های اکسیژن در سلول می-باشد. این رادیکال سبب پراکسیداسیون و در نتیجه تجزیه این رنگیزه می‌شوند (Sheteawi andTawfik. 2007).

تاثیر استفاده از سطوح مختلف اسید هیومیک بر مقدار رنگیزه‌های کلروفیل a و b معنی‌دار بود، اما تاثیر معنی‌داری بر مقدار کارتنوئید موجود در برگهای گاوزبان نداشت (جدول ۲). در این بین بیشترین میزان کلروفیل a از تیمار H_4 و کلروفیل b از تیمار H_2 حاصل شد (جدول ۳). مشابه نتایج این آزمایش، آستارایی و ایوانی (Astaraei and Ivani, 2008) افزایش میزان سطح برگ و تولید مقدار کلروفیل بیشتر در برگهای گیاه لوبیا را در استفاده از تیمار اسید هیومیک گزارش کردند. اسید هیومیک سبب تداوم

بافت‌های فتوسنتز کننده شده و عملکرد گیاهان را افزایش می‌دهد. همچنین اسید هیومیک از طریق اثرات مثبت فیزیولوژیکی از جمله اثر بر متابولیسم سلول‌های گیاهی و افزایش غلظت کلروفیل برگ باعث افزایش عملکرد در گیاهان می‌شود (Nardi et al., 2002).

در بین رنگیزه‌های کلروفیل a، b و کارتنوئید، اثر متقابل خشکی و اسید هیومیک تنها تاثیر معنی‌داری بر میزان کلروفیل a داشت (جدول ۲). همان طور که در شکل ۶ مشاهده می‌شود، با بالا رفتن سطح خشکی از شاهد به W_3 از میزان کلروفیل a کاسته شد، اما در حضور تیمار اسید هیومیک بیشترین میزان کلروفیل a در تیمار W_1H_3 به دست آمد. پسرکلی (Pessarkli, 1999) بیان می‌دارد که دوام سطح برگ و حفظ کلروفیل برگ تحت شرایط تنش از جمله شاخص های فیزیولوژیکی مقاومت به تنش می‌باشد. در این بین کاستریلو و همکاران (Kulshreshtha et al., 1987) اعلام کردند که مقدار کلروفیل موجود در برگ گیاهان از جمله گوجه فرنگی تحت تاثیر تنش خشکی قرار گرفته و از مقدار آن کاسته می‌شود. براساس نتایج تحقیقات صورت گرفته اسید هیومیک بطور معنی‌داری سرعت فتوسنتز، توسعه ریشه و محتوای مواد غذایی در گیاهان را افزایش می‌دهد، لذا اسید هیومیک می‌تواند در بهبود سنتز کلروفیل در شرایط متفاوت محیطی موثر باشد (Liu et al., 1996).

نتیجه گیری

از نتایج حاصله در این آزمایش می‌توان بیان کرد که خشکی تاثیر معنی‌داری بر گیاه دارویی گاوزبان دارد و این تاثیر از جنبه‌های مختلفی قابل بررسی می‌باشد. در طی بروز تنش خشکی از میزان کلروفیل a و b کاسته شد که این امر می‌تواند بر کاهش تولید مواد فتوسنتزی در این گیاه تاثیر سوء داشته باشد. در این آزمایش بالا رفتن فعالیت دو آنزیم APX و GPX به نوعی بیانگر فعال شدن سیستم آنزیمی آنتی اکسیدان در گیاه جهت مقابله با تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن می‌باشد. همچنین در این گیاه بر میزان دو ترکیب پرولین و کربوهیدرات محلول در بافت سبز برگها افزوده شد که این فرآیند در جهت تنظیم اسمزی و ایجاد شرایط مناسب برای جذب آب از محیط خاک موثر است. استفاده از اسید هیومیک اثرات مثبت و معنی‌داری بر گیاه گاوزبان در مواجهه با تنش خشکی داشت، به طوری که سبب بهبود سنتز کلروفیل a و b و نیز افزایش تولید ترکیبات پرولین، کربوهیدرات و آنزیم آنتی کسیدان APX در برگ‌های گیاه گاوزبان گردید. به طور کلی می‌توان بیان کرد که محلول‌پاشی ۱/۵ تا ۳ لیتر اسید هیومیک در شرایط کاهش میزان آب قابل دسترس برای گیاه گاوزبان تا حد ۵۰ درصد ظرفیت زراعی، برای مقابله با بروز تنش خشکی می‌تواند موثر و مفید باشد. از کارهای تکمیلی که می‌توان برای این گیاه جهت تحقیقات بعدی پیشنهاد کرد، مصرف مقادیر مختلف اسید هیومیک در خاک و ارزیابی چگونگی تاثیر آن بر واکنش‌های فیزیولوژیکی، بیوشیمیایی و عملکرد کمی و کیفی گونه‌های مختلف گاوزبان در تیمارهای مختلف تنش خشکی است. تا بتوان بصورت دقیق‌تر به تاثیر اسید هیومیک بر این گیاه پرداخت.

منابع

Arnon, A.N., 1967. Method of extraction of chlorophyll in the plants. Agron. J. 23, 112-121.

Astaraei, A.R., Ivani, R., 2008. Effect of organic sources as foliar spray and root madia on nutrition in cowpea plant. Am. Eurasian J. Agric. Environ. Sci. 3(3), 352-356.

Ayas, H., Gulser, F., 2005. The effect of sulfur and humic acid on yield components and macronutrient contents of spinach. J. Biosci. 5(6), 801-804.

Bailly, C., 2004. Active oxygen species and antioxidants in seed biology. Seed Sci. Res. 14, 93- 107.

Bates, S., Waldern, R.P., Teare, E.D., 1973. Rapid determination of free proline for water stress studies. Plant Soli. 39, 205-207.

Beers, G.R., Sizer, I.W., 1952. Aspectrophotometric method for measuring the breakdown to hydrogen peroxide by catalase. J. Biol. Chem. 195, 133 - 140 .

Cooper, R. J., Liu, C. H., Fisher, D. S., 1998. Influence of humic substances on rooting and nutrient content of creeping bentgrass. Crop Sci. 38, 1639-1644.

Dordas, C., Sioulas, S., 2008. Safflower yield, chlorophyll content, photosynthesis and water efficiency response to nitrogen fertilization under rainfed conditions. Crop Prod. 27, 78-85.

Good, A., Zaplachiniski, S., 1994. The effects of drought on free amino acid accumulation and protein syntesis in *Brassica napus*. Physiol. Plant. 90: 9–14.

Grattan, S.R., Grieve, C.M., 1999. Salinity-mineral nutrient relations in horticultural crops. Sci. Hortic. 78, 127-157.

Harper, S.M., Kerven, G.L., Edwards, D.G., Ostatek-Boczynski, Z., 2000. Characterisation of fulvic and humic acids from leaves of *Eucalyptus camaldulesis* and from decomposed hay. Soil Biochem. 32, 1331-1336.

Heuer, B., 1994. Osmoregulatory role of proline in water stress and salt-stressed plants. pp 363-481. In: M. Pessarkli (Ed), Handbook of Plant and Crop stress. Marcel Dekker pub. New York.

Irrigoyen, J.H., Emerich, D.W., Sanchez Diaz, M., 1992. Water stress induced changes in concentration of proline and total soluble sugars in nodulated alfalfa plant. Physiol. Plant. 84, 55-66.

Jain, M., Mathur, G., Koul, S., Sarin, N.B., 2001. Ameliorative effects of proline on salt stress induced lipid peroxidation in cell lines of groundnut (*Arachis hypogeal* L.). Plant Cell Rep. 20, 463-468.

Kulshreshtha, S., Mishra, D.P., Gupta, R.K., 1987. Changes in content of chlorophyll, proteins and lipid in whole chloroplast and chloroplast membrane fractions at different leaf water poteintials in drought resistant and sensitive genotypes wheat. Photosynthetica. 21(1), 65-70.

Liang, J., Zahng, J., Wong, M. H., 1996. Stomatal conductance in relation to xylem sap ABA concentrations in two tropical trees, *Acacia confuse* and *Litsea glutisa*. Plant Cell Environ. 19, 93-100.

Liu, C., Cooper, R.J., Bowman, D.C. 1996. Humic acid application affects photosynthesis, root development and nutrient content of creeping bentgrass. Crop Sci. 33, 1023-1025.

Malcolm, R. E., Vaghuan, D. V., 1979. Humic substance and phosphatase activies in plant tissues. Soil Biol. Biochem. 11, 253-259.

McDonald, M. B., 1999. Seed deterioration: physiology, repair and assessment. Seed Sci. Technol. 27 (11), 177-237.

Munns, R., 2002. Comparative physiology of salt and water stress. Plant Cell Environ. 25, 239-250.

Munne, S., Alegre, L., 1999. Role of dew on the recovery of water stressed *Melissa officinalis* L. J. Plant Physiol. 154 (5-6), 756-766.

Nakano, Y., Asada, K., 1981. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate–specific peroxidases in spinach chloroplasts. Plant Cell Physiol. 22, 867–880.

Nardi, S., Pizzeghello, D., Muscolo, A., Vianello, A., 2002. Physiological effects of humic substances on higher plants. Soil Biol. Biochem. 34, 1527-1536.

Pessarkli, M., 1999. Hand book of plant and crop stress. Marcel Dekker Inc. New York. 697 pages.

Santiago, A., Lose, M., Carmona, E., Delgado, A., 2008. Humic substances increase the effectiveness of iron sulfate and vivianite preventing iron chlorosis in white lupin. Bio. Fertil. Soils. 44, 875-883.

Sayed, H., 1992. Proline metabolism during water stress in sweet pepper *(Capsicum annum* L.*)*. Plant Physiol. 32, 255-261.

Sharif, M., 2002. Effect of lignitic coal derived humic acid on growth yield wheat, maize in alkaline soil. Political Sci. 171.

Sheteawi, S.A., Tawfik, K.M., 2007. Interaction effect of some biofertilizers and irrigation water regime on Mungbean *(Vigna radiate)* growth and yield. J. Appl. Sci. Res. 3(3), 251-262.

Stepien, P., Klobus, G., 2005. Antioxidant defense in the leaves of C3 and C4 plant under salinity stress. Physiol. Plant. 125, 31-40

Tahir, M.M., Khurshid, M., Khan, M.Z., Abbasi, M.K., Kazmi, H.M., 2011. Lignite-drived humic acid effect on growth of wheat plants in different soils. Pedosphere. 21, 124-131.

Tan, K. H., 2003. Humic matter in soil and the environment. Marcel Dekker, New York.

Tan, K. H., Nopamornbodi, V., 1979. Effect if different levels of humic acid on nutrient content and growth of corn. Plant Soil. 51, 283-287.

Urbanek, H., Kuzniak–Gebarowska, E., Herka, K., 1991. Elicitation of defense responses in bean leaves by Botrytis cinerea polyglacturonase. Acta Physiol. Plant. 13, 43–50.

Zargari, A., 2006. Plant Medicine. Fifth edition, Institute of Tehran University press. 951p. [In Persian].