



به‌زرعی کشاورزی

دوره ۱۹ ■ شماره ۲ ■ تابستان ۱۳۹۶
صفحه‌های ۴۰۱-۴۱۶

اثر رژیم‌های آبیاری و کاربرد اسیدهیومیک بر برخی ویژگی‌های فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی گیاه دارویی خرفه در شرایط گلخانه

سونامظفری^۱، سارا خراسانی‌نژاد^{۲*} و حسین گرگینی‌شبانکاره^۳

۱. دانش‌آموخته کارشناسی‌ارشد، گروه علوم باغبانی، دانشکده تولید گیاهی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران.
۲. استادیار، گروه علوم باغبانی، دانشکده تولید گیاهی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران.
۳. دانشجوی دکتری، گروه علوم باغبانی، دانشکده تولید گیاهی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران.

تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۵/۰۴/۲۶

تاریخ وصول مقاله: ۱۳۹۵/۰۳/۲۴

چکیده

به‌منظور بررسی اثر رژیم‌های آبیاری و کاربرد اسیدهیومیک بر برخی ویژگی‌های بیوشیمیایی گیاه دارویی خرفه (*Portulaca oleracea*) L. آزمایشی به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار در گلخانه دانشکده تولید گیاهی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان در سال ۹۴ به‌اجرا درآمد. تیمارهای آزمایش شامل چهار سطح رژیم‌های آبیاری (شامل ۱۰۰، ۷۵، ۵۰ و ۲۵ درصد ظرفیت زراعی) و چهار سطح محلول‌دهی اسیدهیومیک (شامل ۶۰۰، ۴۰۰، ۲۰۰ و صفر میلی‌گرم در لیتر) بودند. صفات مورد ارزیابی عبارت از پرولین، محتوای نسبی آب برگ، فنل، فلاونوئید، آنتی‌اکسیدان، قندهای محلول و کارتنوئید بودند. نتایج نشان داد افزایش میزان آبیاری سبب افزایش معنی‌دار فنل، فلاونوئید، آنتی‌اکسیدان، پرولین و قندهای محلول گردید. اثر تنش خشکی در بیشترین سطح، منجر به افزایش ۱/۰۹ درصدی پرولین و به‌ترتیب کاهش ۰/۱۸۳ و ۶/۵۳ درصدی کارتنوئید و محتوای نسبی آب برگ نسبت به شاهد گردید. اسید هیومیک نیز بر تمامی صفات مورد بررسی به‌جز کارتنوئید اثر معنی‌دار داشت و این اثر در ۴۰۰ میلی‌گرم در لیتر به‌حداکثر خود رسید. اثر متقابل رژیم آبیاری و کاربرد اسیدهیومیک به‌جز فنل برای سایر صفات مورد بررسی معنی‌دار بود. محلول‌پاشی ۴۰۰ میلی‌گرم در لیتر اسیدهیومیک به‌ترتیب در شرایط رژیم آبیاری ۲۵ و ۵۰ درصد ظرفیت زراعی موجب افزایش ۱۲/۳۴ درصدی آنتی‌اکسیدان و ۳۶/۹ درصدی قندهای محلول گردید. به‌طورکلی نتایج این آزمایش، کاربرد ۴۰۰ میلی‌گرم در لیتر اسیدهیومیک را در شرایط رژیم آبیاری ۲۵ درصد ظرفیت زراعی به‌عنوان بهترین تیمار از لحاظ صرفه‌اقتصادی معرفی می‌کند، زیرا با مصرف کمتر آب و اسیدهیومیک، می‌توان به همان میزان عملکرد متابولیت‌های ثانویه که سطوح بالاتر کاربرد این تیمارها دارند، دست یافت.

کلیدواژه‌ها: اسیدهیومیک، خرفه، رژیم آبیاری، صفات بیوشیمیایی، صفات فیزیولوژیکی.

۱. مقدمه

به تازگی استفاده از انواع اسیدهای آلی برای بهبود کمی و کیفی محصولات زراعی و باغی رواج فراوان یافته است. مقادیر بسیار کم از اسیدهای آلی به دلیل وجود ترکیبات هورمونی، اثرات قابل ملاحظه‌ای در بهبود خصوصیات فیزیکی، شیمیایی و زیستی خاک و افزایش تولید و بهبود کیفیت محصولات کشاورزی دارند [۷]. بنابراین، استفاده از انواع کودهای طبیعی از جمله اسیدهیومیک، بدون اثر مخرب زیست محیطی، جهت بالا بردن عملکرد می‌تواند مؤثر واقع شود. اسیدهیومیک ترکیب پلیمری طبیعی آلی است که در نتیجه پوسیدگی مواد آلی خاک، پیت، لیگنین و غیره به وجود می‌آید که می‌تواند جهت افزایش محصول و کیفیت آن به کار گرفته شود [۲۱]. از مزایای مهم اسیدهیومیک می‌توان به کلات‌کنندگی عناصر غذایی مختلف مانند سدیم، پتاسیم، منیزیم، روی، کلسیم، آهن، مس و سایر عناصر در جهت غلبه بر کمبود عناصر غذایی اشاره کرد که سبب افزایش طول و وزن ریشه و آغازش ریشه‌های جانبی می‌شود [۲۱]. اسیدهیومیک با اصلاح فیزیکی و بهبود دانه‌بندی خاک فضای بیشتری برای نفوذ آب ایجاد می‌کند. به علاوه، مولکول‌های اسیدهیومیک با مولکول‌های آب پیوندی تشکیل می‌دهند که تا حدود زیادی مانع تبخیر آب می‌شود [۳۸]. همچنین، اسیدهیومیک با افزایش فعالیت آنزیم روبیسکو، سبب افزایش فعالیت فتوسنتزی گیاه می‌شود [۲۹]. در انگور، تیمار محلول‌پاشی اسیدهیومیک سبب بهبود تحرک و کارایی عناصر غذایی و افزایش مقدار روی و آهن برگ و در نتیجه افزایش فتوسنتز و افزایش تولید کربوهیدرات و پروتئین شد [۱۰]. مطالعه اثر تنش خشکی و اسیدهیومیک بر روی گیاه چای‌ترش نشان داد که اسیدهیومیک سبب افزایش محتوای کلروفیل a و b و کارتنوئید و کاهش میزان پرولین می‌گردد [۱۰].

گیاه دارویی خرفه (*Portulaca oleracea L.*) از خانواده Portulacaceae، گیاهی چهارکربنه و یک‌ساله می‌باشد. این گیاه عمدتاً به عنوان علف‌هرز رشد نموده و در شرایط نسبتاً گرم و خشک گسترش می‌یابد [۵]. مصرف گیاه خرفه به دلیل وجود آنتی‌اکسیدان‌ها و همچنین فراوانی اسیدهای چرب امگا ۳ در آن باعث خنثی کردن رادیکال‌های آزاد و تقویت سیستم ایمنی بدن می‌گردد و بنابراین از بیماری‌های قلبی عروقی، سرطان، آسم، دیابت نوع یک و بیماری‌های عفونی جلوگیری می‌نماید [۵، ۹].

گیاهان طی دوران رشد خود با تنش‌های متعدد محیطی مواجه می‌شوند، که هریک از آنها می‌توانند با توجه به میزان حساسیت و مرحله رشدی گیاه اثرات متفاوتی بر رشد و عملکرد داشته باشند. کمبود آب از مهم‌ترین عوامل محیطی کاهش رشد و عملکرد بسیاری از گیاهان زراعی، باغی و دارویی به خصوص در مناطق خشک و نیمه‌خشک دنیاست [۶]. تنش طولانی‌مدت رطوبتی بر تمام فرآیندهای متابولیکی گیاه اثر می‌گذارد و اغلب موجب کاهش تولید گیاه می‌شود [۲۱].

در تحقیقات انجام‌شده روی گیاه دارویی آنیسون (*Pimpinella anisum L.*) مشخص شد که کم‌آبایی سبب کاهش خصوصیات مورفولوژیک و عملکرد اندام هوایی می‌گردد [۱۲]. در مطالعه اثر تنش خشکی بر میزان پرولین و قندهای محلول گیاهچه‌های کلزا (*Brassica nupus*) نشان داد که خشکی سبب افزایش میزان پرولین، گلوکز، مانوز و رامنوز در بافت‌های ارقام کلزا می‌شود [۱۶]. بررسی اثر اسیدسالیسیلیک و اسیدهیومیک به خصوص با اسیدهیومیک، بر پروتئین‌های محلول و آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی گیاه دارویی سیاهدانه تحت سطوح مختلف تنش شوری و خشکی نشان داد که غلظت پروتئین‌های محلول با افزایش تنش شوری و خشکی کاهش یافته و تولید آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و پرولین که نقش محافظتی در برابر تنش ایفا می‌کنند، افزایش یافت [۱]. بررسی اثرات تنش خشکی آخر فصل بر عملکرد و میزان انتقال کربوهیدرات‌های محلول در ساقه و عملکرد دانه دو رقم گندم نشان داد که در هر دو تیمار رژیم آبیاری (شاهد و ۵۰ درصد ظرفیت زراعی)، موجب کاهش غلظت قندهای محلول در میانگرم‌ها شد [۸]. همین‌طور بررسی اثر تنش خشکی بر رشد و سیستم آنتی‌اکسیدان در سه رقم نخود نشان داد که تنش خشکی سبب افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان می‌گردد [۱۹]. همچنین بررسی اثر تنش خشکی و اسیدهیومیک بر برخی ویژگی‌های فیزیولوژیک گیاه دارویی چای‌ترش نشان داد که با افزایش تنش خشکی و اسیدهیومیک از محتوای کارتنوئید (۷۹/۶۳ درصد) و محتوای رطوبت نسبی (۱۲/۵۹ درصد) کاسته شد، در حالی که بر غلظت پرولین (۲۶/۸ درصد) افزود که کاربرد اسیدهیومیک از شدت اثرات منفی تنش خشکی بر گیاه کاسته است [۱۰].

اثر رژیم‌های آبیاری و کاربرد اسیدهیومیک بر برخی ویژگی‌های فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی گیاه دارویی خرفه در شرایط گلخانه

۴۰۰ میلی‌گرم در لیتر، H_4 : ۶۰۰ میلی‌گرم در لیتر) معرفی گردید. از پودر اسیدهیومیک ۹۵٪ با نام تجاری هیومکس ساخت کشور امریکا (حاوی ۸۰٪ اسیدهیومیک و ۲۰٪ اسیدفولیک) جهت اعمال تیمار اسیدهیومیک استفاده گردید. در گلخانه تونلی پلاستیکی مورد استفاده در این تحقیق، سعی شده است دمای روز در محدوده دمایی ۳۰-۲۵ و دمای شب ۲۵-۲۰ نگهداری شود. بذر گیاه مورد نظر از شرکت پاکان بذر اصفهان تهیه و تعداد ۱۰ بذر در داخل هر کدام از گلدان‌ها (گلدان‌های پلاستیکی با قطر دهانه ۲۰ و ارتفاع ۲۰ سانتی‌متر) کشت گردید. کاشت پس از آبیاری گلدان‌ها با آب معمولی، اواخر پاییز (آذر ماه) در عمق ۱-۰/۵ سانتی‌متری صورت گرفت. در مجموع ۴۸ گلدان برای کشت استفاده شد. بعد از سبز شدن، بوته‌ها طی چند مرحله تنک شدند و در نهایت داخل هر گلدان سه بوته نگهداری شد. جهت شناسایی ویژگی‌های کمی و کیفی خاک محل آزمایش، نمونه خاکی به آزمایشگاه منتقل و تجزیه شیمیایی و فیزیکی انجام گرفته و نتایج حاصل از تجزیه خاک در جدول (۱) آورده شده است.

اعمال تیمارهای رژیم آبی بر اساس روش وزنی بود. به‌طوری‌که ابتدا در کف هر کدام از گلدان‌ها به مقدار مساوی سنگ‌ریزه (جهت انجام زهکشی) ریخته شد و با استفاده از ترازو به‌صورت هم وزن از خاک پر شدند (در داخل هر گلدان ۶ کیلوگرم خاک). سپس با افزودن آب، خاک هر گلدان را به‌درجه اشباع رسانده و به‌مدت ۴۸ ساعت روی سطح مشبک قرار دادند تا هر گلدان پس از زهکشی آب اضافی به ظرفیت زراعی برسد. در این مرحله گلدان‌ها به‌سرعت وزن شده و خاک آنها در دمای ۱۰۵ درجه به مدت ۴۸ ساعت کاملاً خشک گردید

باتوجه به این‌که خشکی و کم‌آبی در ایران همواره از مهمترین مسائل و مشکلات کشاورزی است و از این پدیده طبیعی و غیرقابل تغییر راه فراری نیست و با عنایت به تأثیر منفی خشکی در محدود نمودن تولید محصولات، استفاده از نظام‌های کشاورزی پایدار و معرفی روش‌های مدیریتی نظیر کاربرد کودهای زیستی و آلی از طریق چنین بررسی‌هایی ضروری است و از طرفی علی‌رغم خصوصیات دارویی منحصر به‌فرد گیاه خرفه که به‌طور عام، به‌عنوان یک گیاه هرز شناخته شده و مقاومت بالای این گیاه به شرایط تنش، هدف از انجام پژوهش حاضر، ارزیابی کاربرد اسیدهیومیک در جهت نیل به اهداف کشاورزی پایدار و تعیین نیاز آبی گیاه دارویی خرفه در شرایط رژیم‌های آبیاری برای افزایش کارایی مصرف آب، می باشد.

۲. مواد و روش‌ها

به‌منظور بررسی اثر رژیم‌های آبیاری و اسیدهیومیک بر برخی ویژگی‌های فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی گیاه دارویی خرفه، آزمایشی در سال ۱۳۹۴ در گلخانه تحقیقاتی دانشکده تولید گیاهی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان اجراء شد. در این تحقیق اثرات دو عامل رژیم آبیاری و اسیدهیومیک به‌صورت فاکتوریل بر پایه طرح کاملاً تصادفی در سه تکرار مورد بررسی قرار گرفت. محلول‌پاشی اسیدهیومیک در چهار غلظت ۶۰۰، ۴۰۰، ۲۰۰ و صفر میلی‌گرم در لیتر [۲۲] و رژیم‌های آبیاری در چهار سطح آبیاری در ۱۰۰، ۷۵، ۵۰ و ۲۵ درصد ظرفیت زراعی اعمال شدند. برای سهولت در جاگذاری تیمارها در جداول، حروف اختصاری به‌صورت تیمار خشکی (D_1 : ۱۰۰٪ ظرفیت زراعی (شاهد یا بدون تنش)، D_2 : ۷۵٪ ظرفیت زراعی، D_3 : ۵۰٪ ظرفیت زراعی و D_4 : ۲۵٪ ظرفیت زراعی مزرعه)، تیمار اسیدهیومیک (H_1 : صفر (شاهد)، H_2 : ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر، H_3 :

جدول ۱. خصوصیات فیزیکی و شیمیایی خاک

S.P (%)	T.N.V (%)	K (ppm)	P (ppm)	N (%)	EC (ds/m)	pH	بافت خاک
۲۲/۰۷	۴۳	۲۲۴	۸/۵	۰/۱۴	۰/۲۹	۷/۲۵	سیلتی-رسی-لوم

S.P: دانه‌بندی خاک

T.N.V: درصد کل مواد خنثی شونده

به‌زراعی کشاورزی

دوره ۱۹ ■ شماره ۲ ■ تابستان ۱۳۹۶

آب مقطر و ۱۰۰ میکرو فولین سیوکالتو به آن اضافه شد، بعد از ۸-۱ دقیقه استراحت، ۳۰۰ میکرو لیتر کربنات سدیم یک مولار به محلول افزوده و به مدت ۳۰ دقیقه در حمام بخار ۴۰ درجه سانتی گراد در تاریکی قرار گرفت. در شاهد متانول خالص جایگزین عصاره متانولی گردید. سپس نمونه‌ها در طول موج ۷۶۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر (مدل UNICO 2800) قرائت گردید. برای رسم منحنی کالیبراسیون از غلظت‌های متفاوت اسید گالیک (۲۵۰، ۲۰۰، ۱۵۰، ۱۰۰، ۵۰ میلی گرم بر لیتر) در متانول ۸۰٪ استفاده گردید. این مقدار برای یک گرم در لیتر محاسبه شد و فنل کل بر حسب میلی گرم اسید گالیک در ۱۰۰ گرم برگ خشک بدست آمد [۳۶].

برای محاسبه فلاونوئید از روش آلومینیوم کلرید استفاده شد. به صورتی که ۰/۵ میلی لیتر از عصاره متانولی با ۱/۵ میلی لیتر متانول، ۰/۱ میلی لیتر آلومینیوم کلرید ۱۰ درصد در اتانول، ۰/۱ میلی لیتر استات پتاسیم یک مولار و ۲/۸ میلی لیتر آب مقطر مخلوط شد. برای تهیه شاهد، متانول خالص جایگزین عصاره متانولی گردید. محلول حاصل ۳۰ دقیقه در تاریکی قرار داده شد و سپس در طول موج ۴۱۵ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر قرائت شد [۲۶].

برای اندازه گیری میزان مهار رادیکال‌های آزاد DPPH (دی فنیل پیکریل هیدرازیل)، ابتدا یک میلی لیتر از عصاره متانولی با یک میلی لیتر DPPH با غلظت ۰/۱ میلی مولار مخلوط گردید. برای نمونه شاهد یک میلی لیتر متانول خالص به جای یک میلی لیتر عصاره متانولی قرار داده شد و برای بلانک از متانول خالص استفاده شد. بعد از ۳۰ دقیقه تاریکی، نمونه‌ها در طول موج ۵۱۷ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر قرائت شدند. اعداد به دست آمده از جذب نمونه توسط رابطه ۱ به درصد مهار رادیکال آزاد تبدیل شد [۳۷].

رابطه (۱)

در ادامه پس از مشخص شدن درصد وزنی رطوبت خاک در ظرفیت زراعی مزرعه، میزان رطوبت موجود در خاک برای اعمال تیمارهای رطوبتی مختلف مشخص شده تا با توزین روزانه گلدان نمونه در هر بلوک، کسری آب محاسبه و مقدار آب مورد نیاز به گلدان‌ها اضافه گردید. برای کنترل وزن خشک بوته‌ها، هر تیمار رطوبتی دارای گلدان اضافی بود تا وزن خشک بوته‌ها به وزن خشک گلدان‌ها اضافه شده و مقدار صحیحی از آب در زمان اعمال تیمارهای رطوبتی به هر گلدان اختصاص یابد. تا ۲۰ روز پس از کاشت (مرحله ۶ تا ۸ برگی شدن بوته‌ها)، گلدان‌ها در رژیم‌های یکسان آبیاری گردیدند و از این مرحله به بعد، برای تعیین رژیم‌های آبیاری به‌طور روزانه رطوبت از هر کدام از گلدان‌ها اندازه گیری و رژیم‌هایی که درصد وزنی رطوبت خاک به درصد مورد نظر رسید آبیاری در هر تیمار انجام شد [۱۵]. مقدار مورد نیاز اسید هیومیک در این طرح برای هر تیمار محاسبه و در دو مرحله ۶ تا ۸ برگی و آغاز گلدهی، به صورت محلول، همراه با آب آبیاری اعمال گردید.

حدود ۸ هفته پس از شروع تیمارهای رژیم آبی (زمانی که ۵۰٪ بوته‌ها در مرحله گلدهی کامل بودند)، اقدام به اندازه گیری ویژگی‌های فیزیولوژیکی (رطوبت نسبی آب برگ، وزن خشک، پرولین و قند محلول) و بیوشیمیایی (آنتی اکسیدان کل، فنل کل، فلاونوئید کل و کارتنوئید) گردید به طوری که از هر تیمار، سه تکرار انتخاب شده، رطوبت نسبی آب برگ اندازه گیری گردید. بعد از حذف ریشه و خشک نمودن اندام‌های هوایی در دمای اتاق، اندازه گیری وزن خشک گیاه، عصاره متانولی تهیه و صفاتی نظیر آنتی اکسیدان کل، فنل کل، فلاونوئید کل، پرولین، قند محلول و کارتنوئید برای هر گلدان اندازه گیری شد.

میزان فنل کل به روش فولین سیوکالتو اندازه گیری شد. ابتدا ۲۰ میکرو لیتر از عصاره برداشته و با ۱/۱۶ میلی لیتر

قطعات از آب مقطر جهت حذف رطوبت اضافی سطح قطعات برگ آن‌ها را در بین دو لایه کاغذ صافی خشک نموده و سپس وزن آماس آن‌ها اندازه‌گیری شد. سپس وزن خشک با قرار دادن همان نمونه گیاهی در آون ۷۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت تعیین گردید و در نهایت رطوبت نسبی آب برگ (RWC^2) با استفاده از رابطه ۲ محاسبه شد [۴۴].

رابطه (۲):

$RWC (\%) = \frac{(\text{وزن خشک} - \text{وزن آماس}) / (\text{وزن خشک} - \text{وزن تر})}{100}$
تجزیه و تحلیل داده‌ها (تجزیه واریانس و مقایسه میانگین به روش LSD) با استفاده از نسخه ۹/۲ نرم‌افزار SAS و ترسیم نمودارها با استفاده از نرم‌افزار Excel انجام شد.

۳. نتایج و بحث

۳.۱. وزن خشک

وزن خشک به‌طور معنی‌داری ($p < 0.01$) تحت تأثیر رژیم‌های مختلف آبیاری قرار گرفت (جدول ۲). بیشترین مقدار برای این صفت در ۵۰ و ۷۵ درصد ظرفیت زراعی به‌دست آمد (جدول ۳). کاربرد اسیدهیومیک برای وزن خشک در سطح احتمال یک‌درصد معنی‌دار بود (جدول ۴). به‌طوری‌که بیشترین مقدار مربوط به کاربرد ۴۰۰ میلی‌گرم در لیتر اسیدهیومیک بود (جدول ۴). در تیمارهای ترکیبی با افزایش تنش خشکی وزن خشک کاهش یافت به‌طورکلی کاربرد ۲۰۰ میلی‌گرم اسیدهیومیک در شرایط آبیاری با ۵۰ و ۷۵ درصد ظرفیت زراعی بیشترین مقدار وزن خشک را به‌دنبال داشت (جدول ۵).

۳.۲. فنل، فلاونوئید و آنتی‌اکسیدان

صفات فنل، فلاونوئید و آنتی‌اکسیدان به‌طور معنی‌داری ($p < 0.01$) تحت تأثیر تیمارهای رژیم آبیاری و

(درصد جذب نمونه - درصد جذب شاهد) = درصد DPPH

درصد جذب شاهد ×

اعداد به‌دست آمده برابر با درصد مهار رادیکال‌های آزاد در عصاره متانولی (۰/۱ ppm) نمونه‌ها می‌باشد [۲۵]. استخراج قندهای محلول با استفاده از روش اوموکولو انجام شد [۴۰]. طبق این روش ۴۰ میلی‌گرم از بافت تر گیاهی با ۵ میلی‌لیتر اتانول ۸۰ درصد مخلوط و به مدت ۱۰ دقیقه در حمام آب‌گرم (بن‌ماری) با دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. عصاره الکلی به‌دست آمده به مدت ۱۵ دقیقه با دور ۱۰۰۰ g^۱ سانتریفیوژ گردید و محلول شفاف به‌دست آمده که حاوی قندهای محلول بود به یک بشر منتقل شد و عمل فوق ۴ مرتبه دیگر روی بقایای بافت به‌جا مانده تکرار گردید. در نهایت عصاره الکلی با حرارت غیرمستقیم تغلیظ شد به‌طوری‌که حجم آن به یک‌پنجم حجم اولیه رسید. برای حذف کلروفیل، عصاره به‌دست آمده به نسبت ۱ به ۵ با کلروفرم مخلوط گردید و بعد از هم‌زدن، محلول به مدت ۵ دقیقه به حال سکون رها شد. این عمل سبب جدا شدن کلروفیل از فاز آبی گردید. فاز آبی رویی به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۱۰۰۰۰ g سانتریفیوژ شد. فاز شفاف بالایی جدا شده و از آن برای اندازه‌گیری انواع قندهای محلول توسط دستگاه اسپکتروفتومتر استفاده گردید [۴۰].

همچنین برای پرولین از روش بیتز استفاده شد [۲۴] که برای تعیین درصد محتوای نسبی آب برگ، از قسمت انتهایی ساقه سه برگ توسعه یافته از تمام واحدهای آزمایشی جدا کرده، قطعاتی یک سانتی‌متری برگ تهیه و وزن تر آن‌ها به کمک ترازو دیجیتالی اندازه‌گیری شد. برای تعیین وزن شباع آن‌ها را به پتری‌دیش‌های درب‌دار حاوی آب مقطر منتقل کرده و به مدت ۲۴ ساعت در تاریکی و دمای ۴ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. پس از خارج کردن

2. Relative Water Content

1. gravity

موجب افزایش این صفت نسبت به شاهد گردید (جدول ۴). با کاهش سطح آبیاری، آنتی اکسیدان به طور معنی داری افزایش یافت (جدول ۳). تیمارهای آبیاری ۰،۷۵، ۵۰ و ۲۵ درصد ظرفیت زراعی با میانگین‌های ۸۱/۹۱، ۸۳/۷۵ و ۸۶/۰۸ درصد ظرفیت زراعی به ترتیب باعث افزایش ۱/۸۳، ۳/۶۷ و ۶ درصدی در میزان آنتی اکسیدان نسبت به شاهد گردید (جدول ۳). در شرایط تنش خشکی در سطوح بالا، کاربرد اسیدهیومیک توانست میزان صفات فلاونوئید و آنتی اکسیدان را افزایش دهد، به طوری که بیشترین مقدار فلاونوئید (۰/۰۵۹ میلی گرم بر گرم ماده خشک) و آنتی اکسیدان (۸۸/۶۷ میلی گرم بر گرم ماده خشک) به ترتیب از کاربرد ۴۰۰ میلی گرم اسیدهیومیک در ترکیب تیماری رژیم آبیاری در ۵۰ و ۲۵ درصد ظرفیت زراعی حاصل شد (جدول ۵).

اسیدهیومیک قرار گرفتند (جدول ۲). مقایسه میانگین داده‌ها نشان داد که بیشترین میزان فنل کل با میانگین ۰/۰۷۲ میلی گرم بر گرم ماده خشک مربوط به تیمار رژیم آبیاری در ۲۵ درصد ظرفیت زراعی و کمترین آن با میانگین ۰/۰۵۹ میلی گرم بر گرم ماده خشک مربوط به سطح اول تیمار رژیم آبیاری (۱۰۰ درصد ظرفیت زراعی) است (جدول ۳). کاربرد ۶۰۰ میلی گرم در لیتر اسیدهیومیک موجب افزایش معنی دار این صفت نسبت به شاهد گردید. البته کاربرد اسیدهیومیک با غلظت ۴۰۰ میلی گرم در لیتر نیز بهبود در این صفت را به عنوان صفت مثبت، نسبت به شاهد به دنبال داشت (جدول ۴). مقایسه میانگین داده‌ها نشان داد در سطوح اول تا چهارم آبیاری به ترتیب مقادیر فلاونوئید برابر با ۰/۰۴۶، ۰/۰۴۷، ۰/۰۵۶ و ۰/۰۵۵ میلی گرم بر گرم ماده خشک شد که نشان دهنده افزایش میزان فلاونوئید با کاهش میزان آبیاری است (جدول ۳). سطوح ۲۰۰، ۴۰۰ و ۶۰۰ میلی گرم در لیتر اسیدهیومیک

جدول ۲. تجزیه واریانس صفات فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی خرفه تحت رژیم‌های آبیاری و کاربرد اسیدهیومیک

میانگین مربعات								df	منابع تغییرات
وزن خشک برگ	کارتنوئید	محتوای نسبی آب	قند محلول	پروکلین	آنتی اکسیدان	فلاونوئید	فنل		
۰/۰۰۴**	۰/۰۷۸**	۱۰۶/۵۱**	۶۷۶/۸۳**	۲/۸۳**	۷۸/۹۷**	۰/۰۰۰۳**	۰/۰۰۱**	۳	خشکی
۰/۰۰۲**	۰/۰۰۱ ^{ns}	۵۰/۳۷**	۵۳۲/۳۱**	۰/۶**	۶۵/۸۶**	۰/۰۰۰۰۴**	۰/۰۰۰۰۵**	۳	اسیدهیومیک
۰/۰۰۱**	۰/۰۰۱*	۵/۷۰**	۶۸/۸۳**	۰/۰۵۹**	۵/۰۵*	۰/۰۰۰۰۰۹**	۰/۰۰۰۰۰۲ ^{ns}	۹	خشکی x اسیدهیومیک
۰/۰۰۰۳	۰/۰۰۰۶	۰/۱	۶/۲۷	۰/۰۲	۲/۱۲	۰/۰۰۰۰۰۲	۰/۰۰۰۰۰۱	۱۸	خطا
۱۹/۷۳	۸/۹۳	۰/۵۹	۶/۸۲	۶/۸۹	۱/۷۶	۲/۸۲	۱/۶۴		ضریب تغییرات

ns و **،* به ترتیب معنی دار در سطح احتمال ۵ و ۱ درصد و عدم معنی دار بودن می باشد.

1. Reaction oxygen species

به زراعی کشاورزی

اثر رژیم‌های آبیاری و کاربرد اسیدهیومیک بر برخی ویژگی‌های فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی گیاه دارویی خرفه در شرایط گلخانه

جدول ۳. مقایسه میانگین اثرات ساده رژیم‌های آبیاری بر صفات فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی گیاه دارویی خرفه

وزن خشک برگ (gt)	کارتوبید (mg g ⁻¹)	محتوای نسبی آب (%)	محتوای محلول (mg g ⁻¹)	پروتین (mM g ⁻¹)	آنتی‌اکسیدان (mg mL ⁻¹)	فلاونوید کل (mgQUE g ⁻¹)	قل کل (mgQUE g ⁻¹)	خشکی
۰/۰۷ ^c	۰/۳۲۷ ^a	۵۶/۱۴۹ ^a	۳۷/۸۱۶ ^d	۱/۴۹۴ ^d	۸۰/۰۸۳ ^d	۰/۰۴۶ ^b	۰/۰۵۲ ^d	۱۰۰ درصد ظرفیت زراعی
۰/۱۱ ^a	۰/۳۱۷ ^b	۵۲/۵۸۸ ^b	۳۸/۱۹ ^b	۱/۶۶ ^c	۸۱/۹۱۷ ^c	۰/۰۴۷ ^b	۰/۰۵۴ ^c	۷۵ درصد ظرفیت زراعی
۰/۱۱ ^a	۰/۲۶۳ ^c	۵۱/۳۴۳ ^c	۴۵/۹۱۱ ^a	۱/۸۸۳ ^b	۸۳/۸۵ ^b	۰/۰۵۶ ^a	۰/۰۶۶ ^b	۵۰ درصد ظرفیت زراعی
۰/۰۹ ^b	۰/۱۶۳ ^d	۴۹/۶۱۳ ^d	۳۸/۱۸۳ ^b	۲/۵۸۶ ^a	۸۶/۰۸۳ ^a	۰/۰۵۵ ^a	۰/۰۷۲ ^a	۲۵ درصد ظرفیت زراعی

در هر ستون، میانگین‌های دارای حروف مشترک در سطح احتمال ادرصد تفاوت معناداری ندارند.

جدول ۴. مقایسه میانگین اثرات ساده اسیدهیومیک بر صفات فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی گیاه دارویی خرفه

وزن خشک برگ (gt)	کارتوبید (mg g ⁻¹)	محتوای نسبی آب (%)	محتوای محلول (mg g ⁻¹)	پروتین (mM g ⁻¹)	آنتی‌اکسیدان (mg mL ⁻¹)	فلاونوید کل (mgQUE g ⁻¹)	قل کل (mgQUE g ⁻¹)	اسیدهیومیک
۰/۰۸ ^c	۰/۲۵۶ ^b	۵۰/۱۵۳ ^d	۲۹/۲۶۴ ^d	۱/۵۶ ^c	۷۹/۹۱۷ ^c	۰/۰۴۸ ^c	۰/۰۵۹ ^c	عدم کاربرد (شاهد)
۰/۱۱ ^a	^{ab} ۰/۲۷۴	۵۲/۹۲۳ ^c	۴۰/۸۸۶ ^b	۱/۸۷۶ ^b	۸۲/۴۱۷ ^b	۰/۰۵۱ ^b	۰/۰۶۰ ^b	۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر
۰/۱۰ ^{ab}	۰/۲۷۹ ^a	۵۵/۰۴۴ ^a	۴۳/۵۷۲ ^a	۲/۰۱ ^a	۸۵/۸۵ ^a	۰/۰۵۳ ^a	۰/۰۶۳ ^a	۴۰۰ میلی‌گرم در لیتر
۰/۰۹ ^{bc}	۰/۲۸ ^a	^b ۵۳/۵۷۳	۳۳/۰۸۸ ^c	۲/۰۶۳ ^a	۸۴/۸۵ ^a	۰/۰۵۱ ^b	۰/۰۶۳ ^a	۶۰۰ میلی‌گرم در لیتر

در هر ستون، میانگین‌های دارای حروف مشترک در سطح احتمال ادرصد تفاوت معناداری ندارند.

جدول ۵. مقایسه میانگین اثرات برهمکنش تنش خشکی و اسیدهیومیک بر صفات فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی گیاه دارویی خرفه

تیمار	فنل کل (mgGUE g ⁻¹)	فلاونوئید کل (mgQUE g ⁻¹)	آنتی‌اکسیدان (mg mL ⁻¹)	پرولین (mM g ⁻¹)	قند محلول (mg g ⁻¹)	محتوای نسبی آب (%)	کارتنوئید (mg g ⁻¹)	وزن خشک برگ (gr)
D1H1	۰/۰۵۰ ^k	۰/۰۴۶ ^g	۷۶/۳۳ ^h	۱/۲۷ ⁱ	۱۹/۸۶ ^g	۵۴/۵۰ ^{de}	۰/۳۴۶ ^{ab}	۰/۰۹ ^{b-e}
D1H2	۰/۰۵۱ ^k	۰/۰۴۸ ^{fg}	۷۹ ^g	۱/۶۰ ^{e-h}	۲۸/۵۹ ^f	۵۵/۴۰ ^c	ab, ۰/۳۴۶	۰/۰۹ ^{b-e}
D1H3	۰/۰۵۴ ^{hi}	۰/۰۴۶ ^g	۸۴ ^{c-e}	۱/۵۳ ^{f-h}	۳۶/۰۷ ^e	۵۸/۲۹ ^a	۰/۳۶۳ ^a	۰/۰۵ ^f
D1H4	۰/۰۵۴ ^{hi}	۰/۰۴۶ ^g	۸۱ ^{fg}	۱/۵۷ ^{e-h}	۲۶/۷۴ ^f	۵۶/۴۰ ^b	۰/۳۳۵ ^{ab}	۰/۰۴ ^f
D2H1	۰/۰۵۱ ^{jk}	۰/۰۴۶ ^g	۸۱ ^{fg}	۱/۴۴ ^{hi}	۲۷/۷۸ ^f	۵۳/۶۶ ^f	۰/۳۱۲ ^b	۰/۱۰ ^{b-d}
D2H2	۰/۰۵۳ ^{ij}	۰/۰۴۷ ^g	۸۱/۳۳ ^{fg}	۱/۷۰ ^{e-g}	۴۱/۲۳ ^{cd}	۵۴/۸۶ ^d	۰/۳۲۱ ^b	۰/۱۰ ^{b-d}
D2H3	۰/۰۵۴ ^h	۰/۰۴۸ ^{fg}	۸۲/۶۷ ^{ef}	۱/۷۸ ^{de}	۳۶/۵۳ ^e	۵۴/۲۱ ^e	۰/۳۲۰ ^b	۰/۱۴ ^a
D2H4	۰/۰۵۶ ^g	۰/۰۴۷ ^g	۸۲/۶۷ ^{ef}	۱/۷۲ ^{ef}	۳۴/۰۶ ^e	۵۵/۶۲ ^c	۰/۳۱۵ ^b	۰/۱۰ ^{b-d}
D3H1	۰/۰۶۲ ^f	۰/۰۵۲ ^{de}	۸۱ ^{fg}	۱/۴۹ ^{gh}	۳۴/۲۶ ^e	۴۸/۲۰ ^j	۰/۲۵۹ ^c	۰/۰۷ ^{ef}
D3H2	۰/۰۶۴ ^e	۰/۰۵۴ ^{cd}	۸۳/۳۳ ^{d-f}	۱/۶۹ ^{e-g}	۴۸/۹۷ ^b	۵۱/۲۱ ^h	۰/۲۶۸ ^c	۰/۱۴ ^a
D3H3	۰/۰۶۸ ^d	۰/۰۵۹ ^a	۸۵/۶۷ ^{cd}	۱/۹۴ ^{cd}	۵۶/۷۶ ^a	۵۲/۳۱ ^g	۰/۲۶۷ ^c	۰/۱۲ ^{ab}
D3H4	۰/۰۶۸ ^d	۰/۰۵۷ ^b	۸۵ ^{c-e}	۱/۹۷ ^{cd}	۴۳/۶۵ ^c	۵۳/۶۵ ^f	۰/۲۵۸ ^c	۰/۱۰ ^{b-d}
D4H1	۰/۰۷۰ ^c	۰/۰۵۰ ^{ef}	۸۱/۳۳ ^{fg}	۲/۰۶ ^c	۲۵/۷۶ ^f	۴۴/۲۵ ^k	۰/۱۱۲ ^f	۰/۰۷ ^{d-f}
D4H2	۰/۰۷۲ ^b	۰/۰۵۶ ^{bc}	۸۶ ^{bc}	۲/۵۱ ^b	۴۴/۷۵ ^c	۵۰/۲۱ ⁱ	۰/۱۶۴ ^e	۰/۰۹ ^{b-e}
D4H3	۰/۰۷۴ ^a	۰/۰۵۷ ^{ab}	۸۸/۶۷ ^a	۲/۷۹ ^a	۴۴/۹۳ ^{bc}	۵۱/۳۸ ^h	۰/۱۶۵ ^e	۰/۰۹ ^{b-e}
D4H4	۰/۰۷۳ ^{ab}	۰/۰۵۵ ^{bc}	۸۸/۳۳ ^{ab}	۲/۹۹ ^a	۷۳/۲۹ ^{de}	۵۲/۶۱ ^g	d, ۰/۲۱۰	۰/۱۰ ^{b-e}

در هر ستون برای هر تیمار، حروف مشابه نمایانگر عدم اختلاف معنی دار در سطح احتمال پنج درصد می باشد.

تیمار خشکی (D₁): ۱۰۰٪ ظرفیت زراعی (شاهد یا بدون تنش)، D₂: ۷۵٪ ظرفیت زراعی، D₃: ۵۰٪ ظرفیت زراعی و D₄: ۲۵٪ ظرفیت زراعی (مزرعه)،

تیمار اسیدهیومیک (H₁: صفر (شاهد)، H₂: ۲۰۰ میلی گرم در لیتر، H₃: ۴۰۰ میلی گرم در لیتر، H₄: ۶۰۰ میلی گرم در لیتر)

یکی از تغییرات بیوشیمیایی که در گیاهان تحت شرایط تنش خشکی اتفاق می افتد، تجمع گونه های فعال اکسیژن (ROS¹) است. در گزارش های متعددی بیان شده است که تنش خشکی میزان تولید ROS را افزایش می دهد. سلول های گیاهی قادرند از طریق القا سیستم دفاع آنتی اکسیدانی بر شرایط تنش اکسیداتیو ایجاد شده تحت تنش غلبه کنند. بنابراین، توانایی برای به دام انداختن گونه های فعال اکسیژن یک راهکار سازشی در گیاهان است که گونه های گیاهی از آن برای مقابله با تنش

اکسیداتیو استفاده می کنند [۳۱]. مقاومت گیاه به تنش های مختلف محیطی ممکن است با سطح فعالیت آنزیم های مسئول به دام انداختن رادیکال های آزاد اکسیژن مرتبط باشد. پاسخ آنتی اکسیدان ها به کمبود آب، به شدت تنش و نوع گونه گیاهی بستگی دارد. گونه های گیاهی مقاوم معمولاً ظرفیت حفاظتی کارآمدتری در مقابل تنش اکسیداتیو القا شده توسط تنش کم آبی دارند که می تواند از طریق بالا بردن میزان فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدان افزایش پیدا کند [۳۳]. از جمله مکانیسم های آنتی اکسیدانی

محققان معتقدند که افزایش میزان آنتی‌اکسیدان‌های کاتالاز، سوپراکسیددیسموتاز و پراکسیداز تحمل گیاه را به تنش‌های محیطی افزایش می‌دهند [۳۲]. با افزایش سطح اسیدهیومیک بر میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی افزوده شد (جدول ۳). نوع خاک و میزان ترکیبات هیومیکی موجود در خاک می‌تواند اثرات قابل توجهی داشته باشد به گونه‌ای که هرچه ترکیبات هیومیکی خاک بیشتر باشد، فعالیت آنتی‌اکسیدانی آن بیشتر است [۴۲]. در آزمایشی که در رابطه با تأثیر اسیدهیومیک بر فعالیت آنتی‌اکسیدانی و کیفیت میوه‌ی فلفل انجام شد، میزان فنل کل تحت تأثیر اسیدهیومیک قرار نگرفت، ولی فلاونوئید و فعالیت آنتی‌اکسیدانی افزایش یافت [۲۳].

۳.۳. قند محلول، کارتنوئید و پرولین

نتایج تجزیه واریانس در جدول ۲ نشان می‌دهد که تیمار رژیم آبیاری، اسیدهیومیک و اثر متقابل آنها تأثیر معنی‌داری بر میزان قند محلول داشت (جدول ۲). بیشترین میزان قند محلول با میانگین ۴۵/۹۱ میلی‌گرم بر گرم ماده خشک از تیمار آبیاری در ۵۰ درصد ظرفیت زراعی و کمترین آن با میانگین ۲۷/۸۱ میلی‌گرم بر گرم ماده خشک از سطح اول تیمار رژیم آبیاری (۱۰۰ درصد ظرفیت زراعی) حاصل شد (جدول ۳). کاربرد ۴۰۰ میلی‌گرم در لیتر اسیدهیومیک با میانگین ۴۳/۵۷۲ میلی‌گرم بر گرم ماده خشک موجب افزایش ۱۴/۳۸ درصدی این صفت نسبت به شاهد گردید (جدول ۴).

مقایسه میانگین داده‌ها نشان داد در سطوح اول تا چهارم رژیم آبیاری به ترتیب مقادیر کارتنوئید برابر ۰/۳۴۷، ۰/۳۱۷، ۰/۲۶۳ و ۰/۱۶۳ میلی‌گرم بر گرم ماده خشک شد که نشان‌دهنده کاهش میزان کارتنوئید با افزایش سطح رژیم آبیاری می‌باشد (جدول ۳). سطوح ۴۰۰ و ۶۰۰ میلی‌گرم در لیتر اسیدهیومیک موجب افزایش حدود ۸ درصدی این

گیاهان تحت تنش خشکی، افزایش سطوح ترکیبات فنلی است، چرا که این گونه ترکیبات به‌عنوان پالاینده‌های گونه‌های واکنش‌گر اکسیژن عمل کرده و در نتیجه سبب ثبات غشاهای سلولی و مانع از پراکسیداسیون لیپیدها می‌شوند [۲۷].

با افزایش سطوح رژیم آبیاری میزان فلاونوئید افزایش یافت. فلاونوئیدهای موجود در برگ به‌عنوان گیرنده رادیکال‌های آزاد عمل می‌کنند و گیاهان را در برابر تنش‌های اکسیداتیو محافظت می‌کنند. همچنین، فلاونوئیدها به دلیل داشتن نقش آنتی‌اکسیدانی، به‌طور مستقیم با وارد شدن در واکنش‌های احیایی و یا به‌طور غیرمستقیم به‌وسیله کلات کردن آهن، مانع تنش اکسیداتیو می‌شوند [۲۰]. در تحقیق دیگری روی اثر غلظت‌های مختلف ورمی‌کمپوست و اسیدهیومیک بر خصوصیات کمی و کیفی گل همیشه‌بهار دریافتند که غلظت ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر اسیدهیومیک می‌تواند سبب افزایش فنل کل گردد [۲۲]. همچنین، در شرایط تنش خشکی، به‌علت تضعیف سیستم ایمنی گیاه بادام‌زمینی (*Arachis L.*) *hypogea* مواد فنلی به‌همراه سایر آنزیم‌های دفاعی در مقاومت علیه میکروارگانیسم‌ها افزایش می‌یابند [۳۵]. همچنین، در بررسی اثر تنش خشکی ناشی از پلی‌اتیلن‌گلایکول در گندم مشخص شد که علت بالا رفتن سطوح ترکیبات فنلی، افزایش فعالیت و میزان آنزیم بیوستتزی فنل‌ها (فنیل‌آلانین‌آمونیاپاز) است [۴۳].

باتوجه به جدول مقایسه میانگین، با افزایش تنش خشکی میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی افزایش یافت به گونه‌ای که حداکثر مقدار آن در رژیم آبیاری در ۲۵ درصد ظرفیت زراعی به‌دست آمد (جدول ۳). در تحقیقی روی گندم نتیجه‌گیری شد که تنش خشکی به‌طور معنی‌داری سبب افزایش مقاومت روزنه‌ها و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در همه ژنوتیپ‌های گندم گردید [۳۴]. امروزه برخی از

اسیدهیومیک از طریق ایجاد شرایط مناسب برای افزایش محتوای نیتروژن گیاهان سبب افزایش عملکرد می‌شود. اسیدهیومیک با بالا بردن میزان تولید ترکیبات آلی نیتروژن‌دار همانند پروتئین و اسیدهای آمینه سرعت رشد و تولید بیوماس در گیاه بنت‌گراس (*Agrostis stolonifera*) را افزایش داد [۱۳]. نتایج مطالعه اثر اسیدهیومیک در شرایط تنش نشان داد که میزان تنظیم‌کننده‌های اسمزی نظیر پرولین در بالاترین سطح تنش خشکی و محلول‌پاشی اسیدهیومیک به میزان ۱/۵ تا ۳ لیتر در هزار لیتر آب بیشترین مقدار را دارد [۶]. پرولین، اسیدآمینه ذخیره‌شده در سیتوپلاسم بوده و احتمالاً در حفاظت از ساختمان ماکرومولکول‌های درون سلول طی تنش خشکی نقش مؤثری دارد. پرولین در واقع به‌عنوان یک شاخص در تعیین میزان حساسیت به تنش شوری و خشکی در گیاهان به‌شمار می‌رود. بالا رفتن میزان این ترکیب در بافت‌های گیاهان به‌نوعی بیانگر فعال شدن مکانیسم تنظیم اسمزی است که شرایط گیاه را برای جذب آب و املاح از محیط ریشه بهینه می‌کند.

با افزایش سطوح رژیم آبیاری تا ۵۰ درصد ظرفیت زراعی میزان قندهای محلول افزایش یافت و با میانگین ۴۵/۹۱ میلی‌گرم بر گرم ماده خشک به بیشترین سطح خود رسید درحالی‌که با کاهش آبیاری و رسیدن به ۲۵ درصد ظرفیت زراعی میزان قندهای محلول ۷/۷۲ درصد نسبت به بیشترین حالت خود کاهش یافت. کربوهیدرات‌ها در فرآیندهای فیزیولوژیکی مانند فتوسنتز، تعرق و تنفس، نقش مستقیم داشته و از این‌رو تغییر در مقدار آن‌ها از اهمیت بالایی برخوردار است. در گیاهان، قندهای فرآیند فتوسنتز تولید می‌شوند. نقش قندها به‌عنوان پیش‌ماده تولید مواد کربنی و انرژی شناخته شده است. حفاظت از گیاه در مقابل از دست دادن آب به افزایش قندها بستگی دارد. مطالعات نشان داده است که تنش خشکی تبدیل هگزوزها

صفت نسبت به شاهد گردید. میان تیمارهای ۴۰۰ و ۶۰۰ میلی‌گرم در لیتر اسیدهیومیک اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد (جدول ۴). همان‌گونه‌که در جدول ۳ نشان داده می‌شود تیمارهای ۲۵، ۵۰ و ۷۵ درصد ظرفیت زراعی با میانگین ۲/۵۸، ۱/۷۷ و ۱/۶۶ درصد ظرفیت زراعی باعث افزایش میزان پرولین نسبت به شاهد شدند. در شرایط سطح سوم رژیم آبیاری (۲۵ درصد ظرفیت زراعی) کاربرد هر سه سطح ۲۰۰، ۴۰۰ و ۶۰۰ میلی‌گرم در لیتر اسیدهیومیک موجب افزایش این صفت نسبت به شاهد گردید (جدول ۵). نتایج مقایسه میانگین‌ها نشان داد که بیشترین مقدار پرولین از برهمکنش رژیم آبیاری در ۲۵ درصد ظرفیت زراعی و کاربرد ۶۰۰ میلی‌گرم در لیتر اسیدهیومیک حاصل شد (جدول ۵).

در برخی از گیاهان ثابت شده است که تغییرات میزان پرولین با توانایی آنها برای تحمل یا سازش به شرایط تنش خشکی مرتبط است و می‌تواند به‌عنوان شاخصی برای انتخاب گیاهان مقاوم به تنش خشکی استفاده شود [۳۹]. هنگامی که گیاه در معرض تنش خشکی قرار می‌گیرد، تجزیه پروتئین‌ها و در نتیجه افزایش آمینواسیدها و آمیدها تسریع می‌شود که یکی از این آمینواسیدها پرولین است [۱۴]. همچنین، هنگامی که گیاهان تحت تأثیر تنش‌ها قرار می‌گیرند، غلظت اسمولیت‌هایشان را افزایش می‌دهند تا جذب آب تحت شرایط تنش ادامه یابد. در بین اسمولیت‌های آلی، پرولین احتمالاً فراوان‌ترین و عمومی‌ترین ماده حل‌شده سازگار است که تجمع می‌یابد [۱۰]. احتمالاً گیاه به دلایل یادشده پرولین خود را افزایش داده است. افزایش پرولین طی تنش خشکی در گیاه آویشن (*Thymus vulgaris*) نیز گزارش شده است [۲]. بررسی اثر تنش خشکی و اسیدهیومیک بر برخی ویژگی‌های فیزیولوژیک چای ترش (*Hibiscus sabdarifa*) نشان داد که تنش خشکی سبب افزایش تجمع پرولین می‌گردد [۱۰].

۴.۳. محتوای نسبی آب برگ

محتوای نسبی آب تحت تأثیر رژیم آبیاری، اسیدهیومیک و اثرمتقابل ($P < 0.01$) قرار گرفت (جدول ۲). مقایسه میانگین داده‌ها نشان داد بیشترین میزان محتوای نسبی آب برگ با میانگین $56/14$ درصد مربوط به تیمار 100 درصد ظرفیت زراعی و کمترین آن با میانگین $49/61$ درصد مربوط به سطح چهارم رژیم آبیاری (25 درصد ظرفیت زراعی) بود که باتوجه نوع گیاه منطقی به نظر می‌رسد (جدول ۳). کاربرد اسیدهیومیک در هر سه سطح (600 ، 400 و 200 میلی‌گرم در لیتر) موجب افزایش معنی‌دار این صفت نسبت به شاهد گردید. مقایسه میانگین داده‌ها نشان داد که در سطوح اول تا سوم رژیم آبیاری به ترتیب مقادیر محتوای نسبی آب برگ برابر با $54/58$ ، $51/34$ و $49/61$ درصد شد که نشان‌دهنده کاهش میزان این صفت با افزایش سطح خشکی می‌باشد (جدول ۳). سطوح 200 ، 400 و 600 میلی‌گرم در لیتر اسیدهیومیک موجب افزایش این صفت نسبت به شاهد گردید (جدول ۴).

کاربرد اسیدهیومیک در شرایط رژیم آبیاری اثر معنی‌داری بر محتوای نسبی آب داشت. به‌طوری‌که کاربرد 200 میلی‌گرم از این ماده در شرایط تنش خشکی، حداکثر مقدار این صفت را به دنبال داشت (جدول ۵). به‌طورکلی با افزایش تنش خشکی، محتوای نسبی آب برگ کاهش یافت. محتوای آب برگ، یک شاخص مناسب برای تنش آبی گیاه است. تنش خشکی با کاهش RWC و پتانسیل کل آب سبب کاهش رشد گیاهان می‌شود. سازوکار تنظیم اسمزی در گیاهان متحمل به خشکی، سبب حفظ و بالا نگه داشتن RWC در گیاه می‌شود. در آزمایشی محققین روی گیاه بادرشوبیه (*Dracocephalum moldavica*) نشان دادند با افزایش شدت تنش آبی، میزان محتوای نسبی آب برگ کاهش یافت [۴۱]. نتایج تحقیقات بر روی گیاه ارزن دم‌روباهی (*Setaria italica*) نشان داد که با کاهش میزان

و سایر کربوهیدرات‌ها مانند ساکارز و نشاسته را به الکل‌های قندی (پلی‌اول‌ها) و پرولین در پی دارد [۱۸]. توزیع مواد هیدروکربنی به‌طور مستقیم تحت تأثیر تنش‌هایی نظیر کمبود آب و به‌طور غیرمستقیم تحت تأثیر هورمون‌های گیاهی قرار می‌گیرد. کاربرد اسیدهیومیک به‌دلیل افزایش فتوسنتز و تولید هیدرات‌های کربن تحمل گیاه را به شرایط تنش افزایش می‌دهد [۱۰]. اسیدهیومیک در تیمار کامل آبیاری گیاه آکاسیا (*Acacia saligna*) بیشترین مقدار کربوهیدرات برگ را تولید کرد [۳۰].

مقایسه میانگین داده‌ها نشان داد که بیشترین میزان کارتنوئید از ترکیب تیماری آبیاری در 25 درصد ظرفیت زراعی و کاربرد 400 میلی‌گرم در لیتر اسیدهیومیک به دست آمد. خشکی سبب کاهش محتوای رنگیزه‌های سلول‌های گیاهی (کلروفیل و کارتنوئید) می‌گردد. کارتنوئیدها نقش حفاظتی در مقابل تنش اکسیداتیو دارند و در سمیت‌زدایی از کلروفیل نقش داشته و باعث کاهش اثرات سمی رادیکال‌های آزاد می‌شوند. گونه‌هایی که بتوانند محتوی کارتنوئید بیشتری داشته باشند، در مقابل گونه‌های اکسیژن فعال، دفاع موفق‌تری داشته و در شرایط تنش کمبود آب تحمل بیشتری از خود نشان می‌دهند [۳]. اسیدهیومیک موجود در خاک نیز از طریق قدرت کلات‌کنندگی عناصر غذایی و با کاهش تبخیر و تعرق و در نتیجه قرار دادن آب و مواد غذایی بیشتر و مناسب‌تر در اختیار گیاه می‌تواند ساخت رنگیزه‌ها را افزایش دهد [۱۷]. در تحقیقی روی اثر غلظت‌های مختلف ورمی کمپوست و اسیدهیومیک بر خصوصیات کمی و کیفی گل همیشه‌بهار مشخص شد اسیدهیومیک می‌تواند سبب افزایش میزان کارتنوئید گردد که این اثر را می‌توان به افزایش جذب عناصر ماکرو و میکرو تحت‌تأثیر اسیدهیومیک نسبت داد [۲۲].

می‌رسد با مصرف کودهای زیستی و بهبود شرایط فیزیکی خاک از جمله ظرفیت نگهداری آب در خاک، گیاه کمتر با شرایط خشکی مواجه شده و تمایل کمتری به سرمایه‌گذاری برای افزایش تولید غشاء نشان می‌دهد، همچنین با افزایش بهبود ساختمان خاک، تحریک بیشتر رشد گیاه را به دنبال دارد. از آن‌جاکه مکانیسم اثر اسیدهیومیک در گسترش ریشه و در نتیجه قابلیت جذب آب و عناصر غذایی کاراست، می‌توان تأثیر مثبت آن را انتظار داشت [۱۷]. در تحقیقی دیگر بررسی کاربرد کودهای زیستی در شرایط تنش خشکی بر روی گیاه کلزا نشان داد که افزایش سطح تنش (ملایم و شدید) سبب کاهش میزان محتوای نسبی آب برگ نسبت به آبیاری نرمال گشت که کاربرد چهار درصد کود زیستی ورمی کمپوست در شرایط آبیاری ملایم و شدید باعث افزایش محتوای نسبی آب و عملکرد گیاه گردید [۱۶].

۴. نتیجه‌گیری

باتوجه به نتایج به دست آمده از مطالعه پیش‌رو می‌توان اظهار داشت که در راستای کاهش مصرف کودهای شیمیایی و نیل به اهداف کشاورزی پایدار می‌توان بخش زیادی از اثرات تنش خشکی بر گیاه خرفه را با کاربرد اسیدهیومیک تعدیل نمود. همچنین نتایج این پژوهش نشان داد که با افزایش سطح تنش خشکی، از مقدار کارتنوئید، وزن خشک و محتوای آب نسبی کاسته می‌شود و در مقابل، محتوای پرولین، قندهای محلول، فنل‌کل، فلاونوئیدکل و آنتی‌اکسیدان افزایش می‌یابد که نوعی سازگاری گیاه با شرایط تنش محسوب می‌شود، اما وابستگی گیاهان در این شرایط به ترکیباتی مانند پرولین نیز برای گیاه هزینه‌بر است. همچنین در این پژوهش مصرف اسیدهیومیک در شرایط تنش‌های شدید به کاهش غلظت پرولین و افزایش غلظت قندهای محلول در برگ منجر شد.

آبیاری، میانگین صفت محتوای آب نسبی به‌طور معنی‌داری کاهش یافت [۴]. در همین راستا گزارش شده که بالاترین RWC در گیاه تاج‌خروس (*Amaranthus retroflexus*) در گیاه شاهد (۹۴/۰۷ درصد) و کمترین آن تحت شرایط تنش کم‌آبی شدید (۶۴/۰۳ درصد) کاهش یافته است [۲۸]. تنش خشکی، سبب کاهش RWC، پتانسیل کل آب و کاهش رشد گیاهان می‌شود. سازوکار تنظیم‌اسمزی در گیاهان متحمل به خشکی، سبب حفظ و بالا نگه‌داشتن RWC در گیاه می‌شود. در یک بررسی، تنش خشکی موجب کاهش محتوای نسبی آب گیاه بادرنجبویه (*Melissa officinalis*) شد [۱۱]. بنابراین به‌نظر می‌رسد گیاه مقاوم خرفه با حفظ مقادیر زیاد RWC به‌نحوی از عوامل محدودکننده غیرروزنه‌ای در شرایط تنش فرار می‌کند.

بررسی نتایج این پژوهش نشان داد که با کاربرد اسیدهیومیک از اثرات تنش خشکی کاسته می‌شود که همبستگی مثبت بین میزان محتوای نسبی آب برگ و رطوبت خاک را می‌توان به مصرف کودهای زیستی ربط داد چرا که اسیدهیومیک از یک طرف با بهبود خواص فیزیکی خاک، ایجاد فضای بیشتر برای نفوذ آب با اصلاح و دانه‌بندی خاک و از طرف دیگر با برقراری پیوند با مولکول‌های آب برای ممانعت از تبخیر آب، سبب افزایش محتوای نسبی آب برگ در شرایط تنش خشکی می‌گردد [۴۱]. بنابراین، با افزایش میزان محتوای نسبی برگ‌ها، فشار درون سلولی برای رشد سلول فراهم می‌شود و امکان اتساع دیواره سلولی را فراهم می‌سازد و در نهایت باعث افزایش انعطاف‌پذیری غشاء سلول می‌شود تا زمینه برای رشد سلول به‌دست آید.

باتوجه به این‌که شرایط رشد سلول فشار تورگر در حد ماکزیمم، شامل انعطاف‌پذیری دیواره سلولی و رسوب‌گذاری در دیواره سلولی می‌باشد بنابراین به‌نظر

italica) در شرایط آبیاری مطلوب و تنش خشکی. نشریه تولید گیاهان زراعی. ۷(۲): ۶۰-۴۳.

۵. حسینی س ا، فروزان م و پایه‌دار آ (۱۳۹۲) تأثیر عصاره هیدروالکلی گیاه خرفه بر غلظت سرمی استروژن، پروژسترون، پرولاکتین و گنادوتروپین‌ها در موش‌های صحرایی ماده بالغ. مجله دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد. ۱۵(۵): ۲۱-۱۲.

۶. حیدری م و میری‌آزادمینایی ح ر (۱۳۹۲) فعالیت آنتی‌اکسیدان و ترکیبات بیوشیمیایی گیاه گاوزبان اروپایی (*Borago officinalis L.*) در واکنش به تیمارهای تنش خشکی و اسیدهیومیک. ۶(۲): ۱۷۰-۱۵۹.

۷. سبزواری س، خزاعی ح و کافی م (۱۳۸۸) اثر اسیدهیومیک بر رشد ریشه و بخش‌های هوایی ارقام سایونز و سبلان گندم (*Triticum aestivum L.*)، مجله آب و خاک (علوم و صنایع کشاورزی). ۹۴: ۲۳-۸۷.

۸. سعیدی‌پور س (۱۳۹۲) بررسی اثرات تنش خشکی آخر فصل بر عملکرد و میزان انتقال کربوهیدرات‌های محلول در ساقه و عملکرد دانه دو رقم گندم. فصلنامه علمی پژوهشی فیزیولوژی گیاهان زراعی. ۵(۱۷): ۱۰۳-۱۱۲.

۹. سلطانی‌نژاد ف و، فلاح س ا و حیدری م (۱۳۹۲) اثر منابع و مقادیر مختلف نیتروژن بر رشد و تولید زیست‌توده گیاه دارویی خرفه. نشریه تولید گیاهان زراعی. ۶(۳): ۱۴۳-۱۲۵.

۱۰. سنجرمی‌میجانی م، سیروس‌مهر ع ر و فاخری ب (۱۳۹۴) اثر تنش خشکی و اسیدهیومیک بر برخی ویژگی‌های فیزیولوژیکی چای‌ترش (*Hibiscus sabdarifa*). به‌زراعی کشاورزی. ۱۷(۲): ۴۱۴-۴۰۳.

به‌طورکلی نقش حفاظتی و تعدیل‌کنندگی کاربرد اسیدهیومیک بر تنش خشکی را می‌توان، به تأثیر مثبت آن در بهبود شرایط تغذیه‌ای گیاهان و تنظیم اسمزی تحت رژیم آبیاری نسبت داد و مهم‌تر آن‌که کاربرد کود آلی اسیدهیومیک به جای کودهای شیمیایی، می‌تواند نویدبخش کشاورزی پایدار و کاهش آلودگی‌های زیست‌محیطی در آینده باشد.

منابع

۱. احمدپور دهکردی س و بلوچی ح ر (۱۳۹۱) اثر پرایمینگ بذر بر آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و پراکسیداسیون لیپیدهای غشای سلول گیاهچه سیاهدانه (*Nigella sativa L.*) تحت تنش شوری و خشکی. مجله الکترونیک تولید گیاهان زراعی. ۵(۴): ۸۵-۶۴.

۲. بابایی ک، امینی‌دهقی م، مدرس‌ثانوی س ع م و جباری ر (۱۳۸۹). اثر تنش خشکی بر صفات مورفولوژیک، میزان پرولین و درصد تیمول در آویشن (*Thymus vulgais L.*). فصلنامه علمی- پژوهشی تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران. ۲۶(۲): ۲۵۹-۲۵۱.

۳. تقی‌پور ز، اصغری‌زکریا ر، زارع ن و شیخ‌زاده پ (۱۳۹۳) ارزیابی برخی صفات فیزیولوژیکی در جمعیت‌هایی از *Aegilops triuncialis* تحت تنش خشکی. دو فصلنامه علمی- پژوهشی تحقیقات ژنتیک و اصلاح گیاهان مرتعی و جنگلی ایران. ۲۲(۱): ۶۶-۵۵.

۴. چهل‌گردی ع، صفاری م و عبدالشاهی ع ا (۱۳۹۳) بررسی تأثیر پلیمر سوپرجاذب، سولفات پتاسیم و کود دامی بر صفات فیزیولوژیکی ارزن دم‌روباهی (*Setaria*

۱۱. عباسزاده ب، شریفی عاشورآبادی ا، لباسچی م ح، نادری حاجی باقرکندی م و مقدمی ف (۱۳۸۶) اثر تنش خشکی بر میزان پرولین، قندهای محلول، کلروفیل و آب نسبی بادرنجبویه (*Melissa officinalis* L.). تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران. ۲۳(۴): ۵۱۳-۵۰۴.
۱۲. عربی ز، کابوسی ک، رضوان طلب ن و ترکلاله باغ ج (۱۳۹۴). اثر سطوح مختلف آبیاری و هیدروژل سوپرجاذب بر خصوصیات مورفولوژیک، عملکرد و اسانس آنیسون (*Pimpinella anisum* L.). نشریه تولید گیاهان زراعی. ۸(۴): ۶۶-۵۱.
۱۳. قربانی ص، خزاعی ح ر، کافی م و بنایان اول م (۱۳۸۹) اثر کاربرد اسیدهیومیک در آب آبیاری بر عملکرد و اجزاء عملکرد ذرت (*Zea mays* L.). نشریه بوم‌شناسی مشهد. ۲(۱): ۱۱۱-۱۱۸.
۱۴. کافی م، برزویی ا، صالحی م، کمندی ع، معصومی ع و نباتی ج (۱۳۸۸) فیزیولوژی تنش‌های محیطی در گیاهان. جهاد دانشگاهی مشهد. ۵۰۲ صفحه.
۱۵. کریمزاده اصل خ د، مظاهری س و پیغمبری ع (۱۳۸۲) اثر چهار دور آبیاری بر عملکرد و صفات کمی سه رقم آفتابگردان. مجله علوم کشاورزی ایران. ۳۴(۲): ۳۰۱-۲۹۳.
۱۶. میرزایی م، معینی ا و قناتی ف (۱۳۹۲) اثر تنش خشکی بر میزان پرولین و قندهای محلول گیاهچه‌های کلزا (*Brassica nupus*). مجله زیست‌شناسی ایران. ۲۶(۱): ۹۸-۹۰.
۱۷. ناسوتی میانداوآب ر، سماوات س و تهرانی م م (۱۳۸۹) خواص کود اسیدهیومیک بر گیاه و خاک. کشاورزی و غذا. ۱۰۱: ۵۵-۵۳.
۱۸. نجف‌زاده اصل س و احسانپور ع ا (۱۳۹۱) اثر تنش خشکی بر برخی از شاخص‌های فیزیولوژیکی دو رقم سیب‌زمینی (*Concord* و *Kenebec*) در شرایط کشت درون‌شیشه. دو فصلنامه علمی- پژوهشی خشک‌بوم. ۲(۱): ۸۲-۷۰.
۱۹. نصراصفهان‌ی م (۱۳۹۱) تأثیر تنش خشکی بر رشد و سیستم آنتی‌اکسیدان در سه رقم نخود. زیست‌شناسی گیاهی. ۵(۱۵): ۱۲۴-۱۱۱.
۲۰. یوسفی م، انتشاری ش و سعادت‌مند م (۱۳۹۳) بررسی تأثیر تیمار سیلیس بر برخی خصوصیات ریخت‌شناختی، تشریحی و فیزیولوژیک گاوزبان ایرانی (*Echium amoenum* Fisch & C.A. meyer). علوم و فنون کشت‌های گلخانه‌ای. ۵(۱۸): ۶۲-۵۲.
21. Abedi T and Pakniyat H (2010) Antioxidant enzyme changes in response to drought stress in ten cultivars of oilseed rape (*Brassica napus* L.). Czech Journal of Genetics and Plant Breeding. 46: 27-34.
22. Abedini T, Moradi P and Hani A (2015) Effect of organic fertilizer and foliar application of humic acid on some quantitative and qualitative yield of Pot marigold. Journal of Novel Applied Sciences. 4(10):1100-1103.
23. Aminifard M H, Aroiee H, Azizi M, Nemati H and Jaafar H Z (2012) Effect of humic acid on antioxidant activities and fruit quality of hot pepper (*Capsicum annum* L.). Journal of Herbs, Spices and Medicinal Plants. 18(4): 360-369.

24. Bates S, Waldern R P and Teare E D (1973) Rapid determination of free proline for water stress studies. *Plant and Soil*. 39: 205-207.
25. Bondet V, Brand-Williams W and Berset C (1997) Kinetics and Mechanisms of Antioxidant Activity using the DPPH Free Radical Method. *LWT - Food Science and Technology*. 30(6): 609-615.
26. Chang C, Yang M H, Wen H M, Chern, J C (2002) Estimation of Total Flavonoid Content in Propolis by Two Complementary Colorimetric Methods. *Journal of Food and Drug Analysis, Philadelphia*. 10(3): 178-182.
27. Chang W C, Kim S C, Hwang S S, Choi B K and Kim S K (2002) Antioxidant activity and free radical scavenging capacity between Korean medicinal plants and flavonoids by assay-guided comparison. *Plant Science*. 163: 1161-1168.
28. Cunhua S, Jian-jie S, Dan W, Bai-Wei L and Dong S (2011) Effects on physiological and biochemical characteristics of medicinal plant pig weed by drought stresses. *Journal of Medicinal Plants Research*. 5: 4041- 4048.
29. Delfine S, Tognetti R, Desiderio E and Alvino A (2005) Effect of foliar application of N and humic acids on growth and yield of durum wheat. *Agronomy for Sustainable Development*. 25: 183-191.
30. El-khateeb MA, El-lethy AS and Alyemaa BA (2011) Effect of mycorrhizal fungi inoculation and humic acid on vegetative growth of acacia (*Saligna iabill*). *Horticultural Science*. 3(3): 283-289.
31. Foyer, C. and Noctor, G. (2003) Redox sensing and signaling associated with reactive oxygen in chloroplasts, peroxisomes and mitochondria. *Physiologia Plantarum*. 119: 355-364.
32. Guo Z, Tan H, Zhu Z, Lu S and Zhou B (2005) Effects of intermediates on ascorbic acid and oxalate. *Research Journal of Agriculture and Biological Sciences*. 1(3): 210-215.
33. Hosseini Boldaji S A, Khavari-Nejad R A, Hassan Sajedi R, Fahimi H and Saadatmand S (2012) Water availability effects on antioxidant enzyme activities lipid peroxidation, and reducing sugar contents of alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Acta Physiologia Plantarum*. 34: 1177-1186.
34. Khazaie H R and A Borzooei (2006) Effects of water stress on antioxidant activity and physiological characteristics of wheat. The first international conference on the theory and practices in Biological Water Saving (ICTPB) Beijing China.
35. Latha P, Sudhakar P, and Sreenivasula Y (2007) Relationship between total phenol and aflatoxin production of peanut genotypes under end-of-

- season drought conditions. *Acta Physiologiae Plantarum*. 29: 563-566.
36. Li H B, Cheng W, Wong C C, Fan K W, Chen F and Jiang Y (2007) Evaluation of antioxidant capacity and total phenolic content of different fractions of selected microalgae. *Food Chemistry*. 102(3) : 771-776.
37. Miliauskas G, Venskutonis P R and Van Beek T A (2004) Screening of radical scavenging activity of some medicinal and aromatic plant extracts. *Food Chemistry*. 85(2): 231-237.
38. Milne C J, Kinniburgh DG, J C M. de Wit, van Riemsdijk WH and Koopal LK (1995) Analysis of proton binding by a peat humic acid using a simple electrostatic model. *Geochimica et Cosmochimica Acta*. 59(6):1101-1112.
39. Niknam V, Razavi N, Ebrahimzadeh H and Sharifizadeh B (2006) Effect of NaCl on biomass, protein and proline contents and antioxidant enzymes in seedlings and calli of two *Trigonella* Species. *Biologia Plantarum*. 50 (4): 591-5
40. Omokolo N D, Nankeu D J, Niemenak N and Djocgoue P F (2002) Analysis of amino acids and carbohydrates in the cortex of nine clones of *Theobroma cacao* L. in relation to their susceptibility to *Phytophthora megakarya* Bra. and Grif. *Crop Protection*. 21(5): 395-402.
41. Rahbarian, P., Afsharmanesh, G. and Shirzadi, M.H. 2010. Effects of drought stress and manure on relative water content and cell membrane stability in dragonhead (*Dracocephalum moldavica*). *Journal of Plant Ecophysiology*. 2(1):13-19.
42. Rimmer D L (2006) Free radicals, antioxidants, and soil organic matter recalcitrance. *European Journal of Soil Science*. 57:91-94.
43. Tian X and Y Lei (2006) Nitric oxide treatment alleviates drought stress in wheat seedlings. *Biologia Plantarum*. 50(4):775-778.
44. Yamasaki S and Dillenburg L R (1999) Measurements of leaf relative water content in *Araucaria angustifolia*. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*. 11(2): 69-75.