

اثر محلول پاشی اسید هیومیک بر برخی ویژگی‌های مورفوفیزیولوژیکی و بیوشیمیایی نعنای سبز (*Mentha spicata* L.) تحت تنش خشکی

قادر رستمی^۱، محمد مقدم^{۲*}، الهام سعیدی پویا^۱، لادن آزدانیان^۳

۱. دانشجوی دکتری گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران

۲. دانشیار گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران

۳. دانشجوی کارشناسی ارشد گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران

تاریخ دریافت: ۹۶/۰۸/۲۷؛ تاریخ پذیرش: ۹۶/۰۹/۲۵

چکیده

به منظور بررسی اثرات تعدیل‌کنندگی اسید هیومیک بر شدت تنش خشکی در گیاه دارویی نعنای سبز، آزمایشی گلدانی به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار اجرا شد. تیمارهای آزمایش شامل تنش خشکی در سه سطح (۲۰، ۷۰ و ۱۰۰ درصد ظرفیت زراعی) به عنوان فاکتور اول و محلول پاشی اسید هیومیک در چهار سطح (صفر، ۱۰۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر) به عنوان فاکتور دوم بودند. در این پژوهش نعنای سبز قادر نبود بیش از ۲ هفته تنش ۳۰ درصد ظرفیت زراعی را تحمل کند و به طور کامل گیاهان این سطح نابود شدند. صفات رویشی گیاه از قبیل ارتفاع بوته، تعداد شاخه فرعی، طول برگ، عرض برگ و وزن تر و خشک برگ و ساقه در تنش ملایم خشکی (۷۰ درصد ظرفیت زراعی) کاهش معنی‌داری نسبت به تیمار شاهد نشان دادند. محلول پاشی اسید هیومیک به ویژه غلظت ۱۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر تحت تنش خشکی سبب بهبود این صفات نسبت به گیاهان شاهد گردید. بیشترین مقادیر رنگیزه‌های فتوسنتزی در تنش خشکی ۷۰ درصد ظرفیت زراعی و محلول پاشی ۱۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر اسید هیومیک و کمترین آن‌ها در تیمار عدم تنش خشکی و کاربرد ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر اسید هیومیک مشاهده شد. بالاترین میزان فنل کل (۰/۶۲ میلی‌گرم/گرم وزن تر) و فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره برگ (۶۰/۱۶ درصد) در گیاهان حاصل از محلول پاشی ۱۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر اسید هیومیک تحت تنش ملایم خشکی مشاهده شد. بیشترین محتوی رطوبت نسبی برگ در شرایط عدم تنش و محلول پاشی ۱۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر اسید هیومیک حاصل شد؛ بنابراین می‌توان اظهار داشت که نعنای سبز گیاهی بسیار حساس به تنش خشکی است و با توجه به کاهش شاخص‌های رشد و فرایندهای فیزیولوژیکی ناشی از تنش خشکی کاربرد اسید هیومیک به ویژه در غلظت بالا (۱۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر) به صورت محلول پاشی می‌تواند به عنوان کود آلی هم‌راستا با کشاورزی پایدار در تنظیم پتانسیل اسمزی نعنای سبز تحت شرایط تنش خشکی ملایم تا حدودی مؤثر باشد.

واژه‌های کلیدی: پرولین، رطوبت نسبی برگ، کلروفیل، مواد آلی

مقدمه

نعناع از جمله گیاهانی است که توجه بیشتر محققان را به دلیل اهمیت اقتصادی و دارویی به خود جلب نموده است. نعنای سبز (خوراکی)^۱ متعلق به خانواده نعنائیان^۲، گیاهی چندساله و علفی، پایا با ساقه‌های چهارگوش و برگ‌های متقابل و دنداندار که پوشیده از کرک و بدون دم‌برگ هستند

(Omidbeagi, 2007). این گونه از لحاظ ترکیب اسانس، تفاوت‌هایی با دیگر گونه‌های نعنای دارد که اصلی‌ترین این تفاوت‌ها، عدم وجود منتول و تشکیل شدن ترکیبی به نام کاروون (Carvon) است که میزان بالای (۷۳٪) از اسانس را شامل می‌شود (De Feo et al., 1998). امروزه نیز از این

2. Labiatae (Lamiaceae)

1. *Mentha spicata*

گیاه در تهیه بسیاری از غذاها و همچنین در لوازم‌آرایی و بهداشتی استفاده می‌شود (Kumar et al., 2011). کم‌آبی از تنش‌های مهم محیطی است که تولید گیاهان را محدود می‌کند. تطابق با کم‌آبی نتیجه یک سری واکنش‌هایی بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی است که به حفظ آب، کلروپلاست و نگهداری هموستازی یون‌ها کمک می‌کند (Malcolm and Vaghuan, 2002). یکی از سازوکارهای کارآمدی که گیاه در شرایط کمبود آب از آن بهره می‌گیرد، تنظیم اسمزی است. از مهم‌ترین اسمولیت‌های سهیم در تنظیم اسمزی برای غالب شدن آثار سوء تنش خشکی، تجمع اسمولیت‌های سازگار نظیر پرولین و قندهای محلول است (Rajinder, 1987). در تحقیقی تأثیر معنی‌دار تنش خشکی بر عملکرد وزن تر و خشک، محتوای نسبی برگ، غلظت کلروفیل‌ها، میزان پرولین و کربوهیدرات محلول در گیاه نعنای فلفلی گزارش شده است. به طوری که بیشترین وزن تر و خشک، مقدار کلروفیل a و کل و محتوای رطوبت نسبی برگ در تیمار شاهد (عدم تنش)، بالاترین میزان کلروفیل b در تنش خشکی مربوط به ظرفیت زراعی ۲۰ درصد و بیشترین مقدار پرولین و قند در ظرفیت زراعی ۶۰ درصد مشاهده شد (Izadi et al., 2009). همچنین در آزمایشی بروز تنش خشکی (۴۰ درصد ظرفیت زراعی) در گیاه ترخون باعث کاهش صفات مورفولوژیکی و افزایش میزان پرولین و کربوهیدرات محلول گردید (Lotfi et al., 2014).

یکی از عوامل مهم حفظ ظرفیت فتوسنتزی، میزان کلروفیل در گیاهان زنده است که تحت شرایط کمبود آب، کاهش یافته و تنش خشکی باعث تولید اکسیژن فعال، همراه با کاهش و تجزیه کلروفیل می‌شود. در گیاه نوروک طی تنش خشکی (۸- بار)، کلروفیل در کلروپلاست تجزیه و ساختارهای تیلاکوئید ناپدید می‌شوند (Tarhamy et al., 2010). نتایج تحقیقات نشان داده که تنش خشکی ملایم بر مقدار کلروفیل دو گیاه سردسیری فستوکا^۱ و پوا^۲ اثری نداشت، ولی سطوح شدیدتر خشکی مقدار کلروفیل را در هر دو گیاه کاهش داد (Fu and Haung, 2001).

2007). به علاوه مولکول‌های اسید هیومیک با مولکول‌های آب، پیوندی تشکیل می‌دهند که تا حدود زیادی مانع تبخیر آن می‌شوند (Myrhajyan, 2012). همچنین اسید هیومیک با افزایش فعالیت آنزیم رویسکو، سبب می‌گردد میزان فعالیت فتوسنتزی افزایش یابد (Delfine et al., 2005). در آزمایشی گزارش شد که محلول‌پاشی اسید هیومیک باعث افزایش شاخص‌های رشد گیاه دارویی چای ترش شد (Ahmad et al., 2011). نتایج سنجری میانجی (Sanjari Mianjye et al., 2015) نشان داد مصرف اسید هیومیک در گیاه چای ترش در شرایط تنش رطوبتی موجب گردید، غلظت پرولین کاهش و کربوهیدرات محلول افزایش یابد. همچنین، محلول‌پاشی اسید هیومیک روی گیاه چای ترش سبب بهبود رشد ریشه و منجر به جذب بالاتر مواد و عناصر غذایی توسط ریشه شد (Guvence et al., 1999). یکی از اهداف اصلی در علوم گیاهی جدید برای سازگار کردن گیاهان به شرایط محیطی، درک مکانیسم‌های فیزیولوژیک مقاومت به تنش‌ها است. با توجه به این هدف و از آنجایی که مطالعات مختلف بیانگر اثرات مثبت مواد هیومیک بر رشد گیاه است، این آزمایش با هدف استفاده از یک کود آلی به‌عنوان منبع اسید هیومیک تحت شرایط تنش خشکی، به‌منظور بررسی برخی صفات فیزیولوژیکی، بیوشیمیایی و مورفولوژیکی گیاه نعنای سبز به‌عنوان یک عامل تعدیل‌کننده در مقابله با تنش خشکی انجام گرفت.

مواد و روش‌ها

با هدف بررسی اثرات اسید هیومیک به‌عنوان یک عامل رشدی و تعدیل‌کننده اثر تنش خشکی، بر روی گیاه نعنای سبز (*Mentha spicata* L.) آزمایشی گلدانی (در گلدان‌هایی با قطر دهانه ۳۰ و ارتفاع ۴۰ سانتی‌متر) در گلخانه تحقیقاتی دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد واقع در عرض جغرافیایی ۳۶ درجه و ۱۸ دقیقه شمالی و طول جغرافیایی ۵۹ درجه و ۳۱ دقیقه شرقی و ارتفاع ۹۸۵ متری از سطح دریا و به ترتیب با میانگین دمای روزانه و شبانه 27 ± 3 و 20 ± 2 درجه سانتی‌گراد و رطوبت نسبی ۷۰ درصد به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۳ تکرار انجام شد. فاکتور اول شامل سه سطح آبیاری (۳۰، ۷۰ و ۱۰۰ درصد ظرفیت زراعی) و فاکتور دوم شامل چهار سطح اسید هیومیک

تغذیه مطلوب گیاهی یکی از روش‌های مؤثر بر تواناسازی گیاهان در مقابله با شرایط خشکی معرفی شده است. اسید هیومیک یکی از کودهای پراهمیت در بخش کشاورزی است که با اصلاح فیزیکی و بهبود دانه‌بندی خاک فضای بیشتری برای نفوذ آب ایجاد می‌کند (Sardashti and Alidoust, 2014).

یکی از عوامل مهم حفظ ظرفیت فتوسنتزی، میزان کلروفیل در گیاهان زنده است که تحت شرایط کمبود آب، کاهش یافته و تنش خشکی باعث تولید اکسیژن فعال، همراه با کاهش و تجزیه کلروفیل می‌شود. در گیاه نوروک طی تنش خشکی (۸- بار)، کلروفیل در کلروپلاست تجزیه و ساختارهای تیلاکوئید ناپدید می‌شوند (Tarhamy et al., 2010). نتایج تحقیقات نشان داده که تنش خشکی ملایم بر مقدار کلروفیل دو گیاه سردسیری فستوکا^۱ و پوا^۲ اثری نداشت، ولی سطوح شدیدتر خشکی مقدار کلروفیل را در هر دو گیاه کاهش داد (Fu and Haung, 2001).

تغذیه مطلوب گیاهی یکی از روش‌های مؤثر بر تواناسازی گیاهان در مقابله با شرایط خشکی معرفی شده است. اسید هیومیک یکی از کودهای پراهمیت در بخش کشاورزی است که با اصلاح فیزیکی و بهبود دانه‌بندی خاک فضای بیشتری برای نفوذ آب ایجاد می‌کند (Sardashti and Alidoust, 2014).

فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی مختلف به شرح زیر اندازه‌گیری شد.

شاخص‌های رشد

صفات مورفولوژیکی اندازه‌گیری شده شامل ارتفاع بوته، تعداد شاخه فرعی، طول برگ، عرض برگ، وزن تر و خشک برگ، ساقه و ریشه بود. طول اندام هوایی برحسب سانتی‌متر و همچنین وزن خشک اندام هوایی و زیرزمینی (برگ، ساقه و ریشه) با ترازو با دقت ۰/۰۰۱ گرم سنجیده شد. برای به دست آوردن وزن خشک اندام هوایی، نمونه‌ها در آون در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۷۲ ساعت قرار گرفت و سپس برحسب گرم تعیین شد (Epstein and Rains, 1987).

محتوای کلروفیل

برای اندازه‌گیری میزان کلروفیل ابتدا ۰/۱ گرم برگ‌های جوان کاملاً توسعه‌یافته را جدا کرده و آن‌ها را در هاون چینی با ۱۰ میلی‌لیتر متانول ۹۹٪ برای استخراج رنگ‌دانه‌ها ساییده، سپس به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ با سرعت ۳۰۰۰ دور در دقیقه انجام گرفت. سپس عصاره استخراج‌شده را برداشته و با استفاده از اسپکتروفتومتر (مدل Bio Quest, CE 2502, UK) میزان جذب در طول موج‌های ۴۷۰، ۶۵۳ و ۶۶۶ نانومتر قرائت گردید. آنگاه با استفاده از روابط زیر محتوای کلروفیل محاسبه شد (Ders et al., 1998)

$$CHLa = 15.65A_{666} - 7.340A_{653} \quad [۲]$$

$$CHLb = 27.05 A_{653} - 11.21 A_{666} \quad [۳]$$

$$CHLx+c = 1000 A_{470} - 2.860 CHLa - 129.2 CHLb \quad [۴]$$

$$CHLt = CHLa + CHLb + CHLx+c \quad [۵]$$

که در آنها CHLa: میزان کلروفیل a، CHLb: میزان کلروفیل b، CHLx+c: کاروتنوئید کل، و CHLt: کلروفیل کل.

شاخص سبزی‌نگی

شاخص سبزی‌نگی برگ (عدد اسپد کلروفیل) با استفاده از دستگاه کلروفیل سنج (SPAD-502, Konica, Minolta, Tokyo) قرائت گردید.

(صفر، ۱۰۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر) بود. در این تحقیق از اسید هیومیک با خلوص ۹۵ درصد ساخت آمریکا (Humax 95-WSG, U.S.A) استفاده شد. بدین منظور ابتدا ریزوم‌های نعنای سبز به طول حدود ۱۰ سانتی‌متر با حداقل ۲ جوانه تهیه و در هر یک از گلدان‌ها حدود ۴ ریزوم در عمق ۵ سانتی‌متری خاک در اواسط اسفندماه کشت شد. به‌طوری‌که پس از استقرار کامل گیاه در هر گلدان ۴ بوته وجود داشت. خاک گلدان‌ها (۱۰ کیلوگرم) از ترکیب یکسان خاک زراعی، ماسه و خاک‌برگ تشکیل شده بود (جدول ۱).

جدول ۱. خصوصیات فیزیکیوشیمیایی خاک مورد استفاده

هدایت الکتریکی	اسیدیته کل	شن	سیلت رس	بافت خاک
EC (dS/m)	(pH)	Sand (%)	Silt (%)	Clay (%)
1.2	7.9	29	30	41
لومی رسی Loam Clay				

برای تعیین رطوبت خاک در حد ظرفیت زراعی، ابتدا مقداری خاک به‌عنوان نمونه از توده اصلی برداشته و به حد اشباع رسانیده شد. گلدان‌های موردنظر در طی روزهای متوالی وزن و در زمان ثابت شدن وزن گلدان، نمونه‌خاکی در داخل آون جهت خشک شدن قرار گرفت. در انتها نمونه خشک‌شده وزن شد و از طریق رابطه زیر، ظرفیت زراعی خاک محاسبه گردید:

$$\text{ظرفیت زراعی خاک} = (\text{وزن تر خاک} - \text{وزن خشک خاک}) / \text{وزن خشک خاک} \times 100 \quad [۱]$$

آبیاری تا زمان استقرار گیاه به‌صورت روزانه انجام شد و تیمارهای تنش، پس از استقرار کامل گیاهان یعنی زمانی که ارتفاع گیاه به حدود ۲۵ سانتی‌متر رسید آغاز گردید. به‌منظور اندازه‌گیری رطوبت خاک از سیستم توزین گلدان‌ها استفاده و آبیاری به‌صورت روزانه بر اساس تغییر وزن خاک گلدان‌ها نسبت به ظرفیت زراعی تعیین‌شده انجام گرفت. محلول پاشی با اسید هیومیک در طی سه مرحله (یک هفته پیش از اعمال تنش خشکی و مرحله بعدی یک و سه هفته پس از اعمال تنش خشکی) جهت جذب بهتر، اول صبح با استفاده از پمپ دستی روی سطح برگ نعنای سبز اعمال گردید. در رابطه با تیمار شاهد هیچ‌گونه محلول پاشی انجام نشد. حدود ۴ هفته بعد از اعمال تیمارها و در مرحله گلدهی صفات مورفولوژیکی،

کربوهیدرات محلول

عصاره رقیق شده را برداشته و ۱/۲ میلی‌لیتر کربنات سدیم ۷/۵٪ و ۱/۵ میلی‌لیتر فولین سیکالتو ۱۰٪ را به آن اضافه کرده و سپس نمونه‌ها را به مدت ۳۰ دقیقه در تاریکی قرار داده و پس از آن در طول موج ۷۶۵ نانومتر قرائت شد. مقادیر فنل کل با استفاده از منحنی استاندارد با گالیک اسید اندازه‌گیری شد (Singleton and Rossi, 1965).

فعالیت آنتی‌اکسیدانی

برای اندازه‌گیری ظرفیت تخریب رادیکال‌های فعال ۱۰۰ میلی‌گرم ماده برگ تازه را در نیتروژن مایع به صورت کامل هموژنایز کرده و عصاره‌گیری با اتانول ۹۶ درصد انجام شد. جهت جداسازی مواد جامد نامحلول به مدت ۵ دقیقه با ۳۵۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ انجام شد. مقدار مناسبی از محلول شفاف بالایی را با ۸۰۰ میکرولیتر از محلول نیم میلی-مولار DPPH (1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) مخلوط نموده و میزان جذب نور پس از آن که نمونه‌ها ۳۰ دقیقه تحت شرایط تاریکی نگهداری شدند در طول موج ۵۱۷ نانومتر قرائت گردید. ظرفیت تخریب رادیکال‌های فعال با استفاده از رابطه (۷) محاسبه گردید (Moon and Terao, 1998).

درصد تخریب رادیکال‌های فعال =

(جذب نمونه شاهد/ جذب نمونه مورد ارزیابی) - جذب نمونه شاهد) × ۱۰۰ [۷]

نشت الکتروولیت

جهت تعیین پایداری غشاء سلول‌های برگ، از شاخص نشت الکتروولیت (Electrolyte Leakage) استفاده گردید. در این روش ابتدا قطعات برگ با اندازه ۲ سانتی‌متر تهیه شد. این قطعات پس از شستشو، همراه با ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر، در داخل شیشه‌های ۵۰ میلی‌لیتری، به مدت ۲۴ ساعت در تاریکی قرار گرفتند. در این مرحله میزان نشت اولیه (E_1) به وسیله دستگاه هدایت سنج (EC متر) اندازه‌گیری و سپس شیشه‌ها به اتوکلاو با دمای ۱۲۰ درجه به مدت ۲۰ دقیقه منتقل و پس از سرد شدن محتویات داخل بطری‌ها، میزان نشت ثانویه (E_2) اندازه‌گیری شد. در نهایت نشت الکتروولیت از طریق رابطه (۸) محاسبه گردید (Marcum, 1998).

$$EL = \left(\frac{E_1}{E_2} \right) \times 100 \quad [8]$$

برای اندازه‌گیری کربوهیدرات‌های محلول، پس از افزودن ۱۰ میلی‌لیتر اتانول ۹۵ درصد به ۰/۲ گرم بافت تازه نمونه و قرار دادن آن در حمام بن ماری به مدت یک ساعت، با دمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد، ۱ میلی‌لیتر فنل ۰/۵ درصد و ۵ میلی‌لیتر اسیدسولفوریک ۹۸ درصد به ۱ میلی‌لیتر از این محلول اضافه شد و جذب آن در طول موج ۴۸۳ نانومتر با دستگاه اسپکتروفوتومتر قرائت شد. مقدار کربوهیدرات استخراجی بر اساس میلی‌گرم گلوکز بر گرم وزن تر نمونه و مطابق منحنی استاندارد گلوکز به دست آمد (Keles and Oncel, 2004).

پرولین

۰/۱ گرم برگ خشک شده را در هاون چینی همراه با ۱۰ میلی‌لیتر اسید سولفوسالیسیلیک ۳/۳٪ ابتدا به خوبی سائیده و در مرحله بعد ۲ میلی‌لیتر از معرف ناین‌هیدرین و ۲ میلی-لیتر اسید استیک خالص به هر یک از لوله‌های محتوی عصاره افزوده گردید (معرف ناین‌هیدرین با مخلوط نمودن ۱/۲۵ گرم ناین‌هیدرین به اضافه ۲۰ میلی‌لیتر اسید فسفریک ۶ مولار و همچنین ۳۰ میلی‌لیتر اسید استیک خالص و سپس حل نمودن آن‌ها در حمام آب گرم آماده شد). لوله‌ها به مدت یک ساعت در حمام آب جوش (بن ماری) در دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفته و سپس به منظور خنک شدن به داخل مخلوط آب و یخ منتقل شدند. در این مرحله در زیر هود ۶ میلی‌لیتر تولوئن به هر یک از لوله‌های آزمایش افزوده و به مدت ۱۵ تا ۲۰ ثانیه شدیداً تکان داده شدند. در نهایت میزان جذب نور در طول موج ۵۲۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر قرائت شد. مقدار پرولین با استفاده از منحنی استاندارد تعیین گردید (Bates et al., 1973). میزان پرولین موجود بر حسب میکرومول در هر گرم وزن خشک از رابطه (۶) محاسبه گردید:

= میکرومول پرولین در هر گرم وزن خشک

میزان تولوئن مصرفی (میلی‌لیتر) × میکروگرم پرولین در هر میلی‌لیتر

میکروگرم بر مول ۱۱۵/۱۷

[۶]

فنل کل

در ابتدا ۱۰۰ میلی‌گرم نمونه گیاهی را با ۱۰ میلی‌لیتر حلال (متانول) عصاره‌گیری نموده و محلول حاصل را با همان حلال به نسبت ۱ به ۱۰۰ رقیق نمودیم. آنگاه ۳۰۰ میکرولیتر از

را نشان دادند؛ ولی بین اثرات متقابل داده‌ها در صفات تعداد شاخه فرعی، طول برگ، عرض برگ و وزن خشک برگ اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد (جدول ۲ و ۳).

خصوصیات مورفولوژیکی

بر اساس نتایج به‌دست‌آمده مقایسه میانگین داده‌ها، تنش خشکی (۷۰ درصد ظرفیت زراعی) منجر به کاهش معنی‌دار صفات مورفولوژیکی شد. به‌طوری‌که کاربرد اسید هیومیک در این سطح تنش باعث کاهش اثرات سوء تنش بر این صفات گردید. شاخص‌های رشد گیاه نعناع سبز در شرایط عدم تنش (۱۰۰ درصد ظرفیت زراعی) افزایش و در تنش خشکی (۷۰ درصد ظرفیت زراعی) کاهش یافت. همچنین بر اساس مقایسه میانگین اثرات متقابل داده‌ها، ارتفاع گیاه (۱۰۱ سانتی‌متر)، وزن تر برگ (۲۴/۰۶ گرم در بوته)، وزن تر ساقه (۲۶/۱۵ گرم در بوته)، وزن خشک ساقه (۱۲/۶۴ گرم در بوته)، وزن تر ریشه (۱۲/۵۰ گرم در بوته) و وزن خشک ریشه (۶/۲۴ گرم در بوته) در تیمار بدون تنش خشکی (۱۰۰ درصد ظرفیت زراعی) و کاربرد اسید هیومیک به میزان ۱۰۰۰ میلی‌گرم نسبت به شاهد حالت افزایشی نشان داد (جدول ۴). همچنین نتایج مقایسه میانگین داده‌های مربوط به تعداد شاخه فرعی، طول برگ، عرض برگ و وزن خشک برگ نشان داد که تعداد شاخه فرعی، طول و عرض برگ و وزن خشک برگ در تیمار ۱۰۰ درصد ظرفیت زراعی بالا بوده به‌طوری‌که مقدار این صفات به ترتیب با ۲۳، ۷/۵، ۱۶/۰۵ و ۲۰ درصد نسبت به آن در تنش ۷۰ درصد ظرفیت زراعی کاهش یافت. همچنین اثر اصلی کاربرد اسید هیومیک نشان داد که با افزایش سطح این تیمار تعداد شاخه فرعی، طول و عرض برگ و وزن خشک برگ افزایش معنی‌داری نسبت به تیمار شاهد یافت. به‌طوری‌که بیشترین مقدار این صفات مربوط به تیمار ۱۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر اسید هیومیک حاصل شد (شکل ۱ و ۲).

رشد رویشی در گیاهان تحت تأثیر عوامل متعددی قرار می‌گیرد که از مهم‌ترین این عوامل میزان آب در دسترس است. یکی از اولین نشانه‌های کمبود آب، کاهش آماس و در نتیجه کاهش تقسیم و توسعه سلول به‌ویژه در ساقه و برگ‌ها است و به همین دلیل است که اولین اثر محسوس کم‌آبی بر روی گیاهان را می‌توان از اندازه کوچک‌تر برگ‌ها یا ارتفاع گیاهان تشخیص داد (Salahvarzi et al. 2008). به‌طوری‌که در مطالعه حاضر نیز در تنش خشکی (۷۰ درصد

محتوای رطوبت نسبی برگ

جهت بررسی وضعیت آب گیاه و برای اندازه‌گیری میزان محتوای رطوبت نسبی برگ (Relative Water Content) از روش بارس و ویتزلی (Barrs and Weaterley, 1962) استفاده شد. برای این منظور پس از تهیه نمونه‌های برگ از گیاه، ابتدا وزن تر آن‌ها (FW) اندازه‌گیری و سپس وزن آماس (TW) نمونه‌ها که به مدت ۲۴ ساعت در دمای اتاق در آب مقطر غوطه‌ور شدند، محاسبه گردید. در نهایت نمونه‌ها به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۷۵ درجه سانتی‌گراد در آون قرار داده شدند و وزن خشک (DW) آن‌ها اندازه‌گیری و برای تعیین میزان محتوای رطوبت نسبی برگ از فرمول (۹) استفاده شد:

$$RWC\% = [(FW-DW)/(TW-DW)] \times 100 \quad [9]$$

تجزیه آماری

داده‌های به‌دست‌آمده با استفاده نرم‌افزار Minitab17 مورد تجزیه آماری قرار گرفت. مقایسه میانگین‌ها نیز بر اساس آزمون LSD در سطح احتمال ۵ درصد انجام شد.

نتایج و بحث

با توجه به این‌که گیاهان نعناع سبز قادر نبودند بیش از ۲ هفته تنش ۳۰ درصد ظرفیت زراعی را تحمل کنند و به‌طور کامل گیاهان این سطح نابود شدند. لذا نتایج بر مبنای دو سطح باقیمانده یعنی تنش خشکی (۷۰ درصد ظرفیت زراعی) و شرایط عدم تنش (۱۰۰ درصد ظرفیت زراعی) ارائه شده است؛ بنابراین هر قسمتی از متن که صحبت از تنش به میان آمده منظور تنها سطح تنش خشکی (۷۰ درصد ظرفیت زراعی) است و منظور از شرایط عدم تنش، آبیاری در حد ۱۰۰ درصد ظرفیت زراعی است.

اثر اصلی تنش خشکی و کاربرد اسید هیومیک روی تمامی صفات مورفولوژیکی، فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی در سطح احتمال یک درصد و اثر متقابل تنش خشکی و کاربرد اسید هیومیک به‌غیر از وزن تر ساقه در بقیه صفات مورفولوژیکی در سطح احتمال ۵ درصد معنی‌داری شد. همچنین، اثر متقابل تنش خشکی و کاربرد اسید هیومیک بر میزان کلروفیل *a*، *b* و کل، میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی، فنل کل، کربوهیدرات محلول کل، محتوای رطوبت نسبی برگ (RWC) و نشت الکتروولیت در سطح احتمال یک درصد و بر میزان پرولین در سطح احتمال پنج درصد اختلاف معنی‌داری

کاربرد اسید هیومیک موجب کاهش اثرات تنش خشکی و افزایش جذب مواد غذایی و تحریک فعالیت هورمون‌های رشد می‌شود. احتمالاً اسید هیومیک با تأثیر بر غشاء سلول و رشد آن بر افزایش شاخص‌های رشدی از جمله ارتفاع گیاه با گذشت زمان مؤثر بوده است. همچنین مولکول‌های فولیک اسید (بخش ریز مولکول از اسید هیومیک) که به درون بافت‌های گیاهی نفوذ می‌کنند، با پیوند شدن به مولکول‌های آب تعریق و تعرق گیاه را کاهش داده و به حفظ آب در درون گیاه کمک می‌کنند (Mirhajian, 2012). در نتیجه باعث افزایش شاخص‌های رشدی و توسعه گیاه می‌شوند. به طوری که در پژوهش حاضر نیز اسید هیومیک از طریق تغییرات فیزیولوژیکی گیاه اثرات تنش خشکی را کاهش داده و سبب افزایش جذب آب و مواد غذایی و در نتیجه باعث افزایش وزن تر و خشک بوته شد.

ظرفیت زراعی) شاخص‌های رشدی گیاه نعنای سبز کاهش معنی‌داری یافت. کاهش معنی‌دار ماده خشک ریشه در اثر افزایش تنش خشکی، دلالت بر تحت تأثیر قرار گرفتن ریشه به عنوان یکی از مهم‌ترین اجزاء گیاه در اثر این پدیده محیطی دارد. در واقع با پیشرفت تنش خشکی همچنان که فتوسنتز برگ کاهش پیدا می‌کند، احتیاجات قندی برای تنظیم اسمزی در گیاهان زیاد شده و به دنبال آن رشد ریشه به طور اجتناب‌ناپذیری متوقف می‌گردد (Mokhtari and Bradaran, 2011). همچنین مقایسه میانگین داده‌ها بیانگر آن است که میزان شاخص‌های رشد نعنای سبز در گیاهان شاهد (۱۰۰ درصد ظرفیت زراعی) همراه با محلول پاشی اسید هیومیک به ویژه غلظت ۱۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر افزایش پیدا کرده که با نتایج آزمایشی که چمنی و همکاران (Chamani et al., 2014) روی گیاه پروانش داشتند مطابقت دارد. به طوری که در این آزمایش نیز احتمال می‌رود

جدول ۲. نتایج تجزیه واریانس اثر تنش خشکی و کاربرد اسید هیومیک بر برخی صفات مورفولوژیکی نعنای سبز

Table 2. The results of variance analysis of drought stress and humic acid application on some of morphological traits in spearmint

Sources of variation	منابع تغییرات	درجه	ارتفاع بوته	تعداد شاخه فرعی	طول برگ	عرض برگ	وزن تر برگ
		آزادی	Plant height	Number of branches	Leaf length	Leaf width	Leaf fresh weight
Drought stress	تنش خشکی	1	2147.04**	112.66**	1.08**	0.27**	64.71**
Humic acid	اسید هیومیک	3	400.48**	27.88**	1.90**	0.17**	51.41**
Drought stress × Humic acid	خشکی × اسید هیومیک	3	29.819*	6.77 ^{ns}	0.011 ^{ns}	0.02 ^{ns}	3.64*
Error	خطا	16	7.62	2.66	0.017	0.02	0.83

Table 2. Continued

جدول ۲. ادامه

Sources of variation	منابع تغییرات	درجه	وزن تر ساقه	وزن تر ریشه	وزن خشک برگ	وزن خشک ساقه	وزن خشک ریشه
			Stem fresh weight	Root fresh weight	Leaf dry weight	Stem dry weight	Root dry weight
Drought stress	تنش خشکی	1	49.96**	29.52**	18.20**	9.04**	6.09**
Humic acid	اسید هیومیک	3	41.52**	13.69**	16.30**	10.28**	3.87**
Drought stress × Humic acid	خشکی × اسید هیومیک	3	5.69**	0.74*	1.21 ^{ns}	0.64*	0.23*
Error	خطا	16	0.52	0.17	0.94	0.15	0.06

^{ns}، * و ** به ترتیب نشانگر عدم اختلاف معنی‌دار و معنی‌دار بودن در سطح احتمال ۵ و ۱ درصد است. ns, *, and ** represent non-significance, significance at 5%, and significance at 1%, respectively.

جدول ۳. نتایج تجزیه واریانس اثر تنش خشکی و کاربرد اسید هیومیک بر برخی صفات بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی نعنای سبز
Table 3. The results of variance analysis of drought stress and humic acid application on some biochemical and physiological traits in spearmint

Sources of variation	منبع تغییرات	درجه آزادی Df	کلروفیل a	کلروفیل b	کلروفیل کل	شاخص سبزینگی	کربوهیدرات محلول
			Chlorophyll a	Chlorophyll b	Total chlorophyll	SPAD	Soluble carbohydrate
Drought stress	تنش خشکی	1	138.43**	31.83**	83.10**	69.83**	0.51**
Humic acid	اسید هیومیک	3	11.35**	28.08**	60.65**	43.83**	0.30**
Drought stress × humic acid	خشکی × اسید هیومیک	3	11.03**	13.22**	103.43**	9.57**	0.38**
Error	خطا	16	2.07	2.25	2.17	0.93	0.02

جدول ۳. ادامه
Table 3. Continued

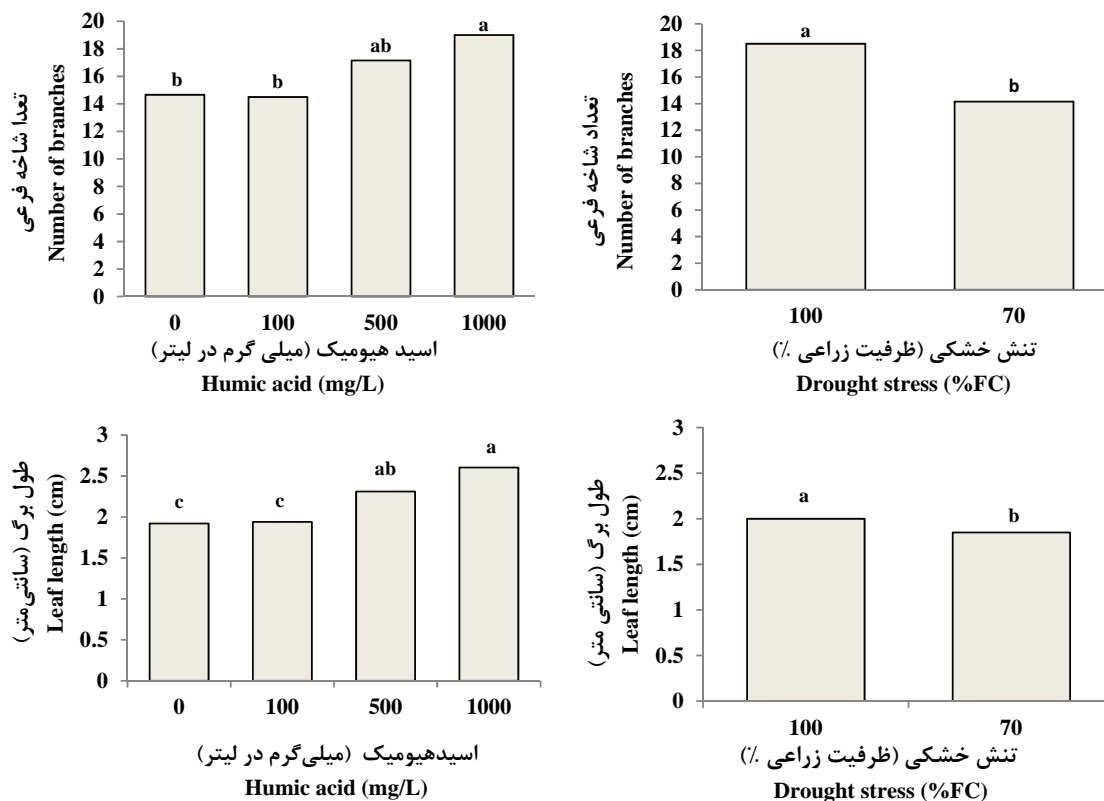
Sources of variation	منبع تغییرات	درجه آزادی df	پرولین	فنل کل	فعالیت آنتی‌اکسیدانی	نشت الکترولیت	محتوای رطوبت نسبی برگ
			Proline	Total phenol	Antioxidant activity	Electrolyte Leakage	Relative water content
Drought stress	تنش خشکی	1	3.40**	0.31**	3085.54**	1926.57**	1755.65**
Humic acid	اسید هیومیک	3	1.09**	0.03**	389.63**	201.54**	263.97**
Drought stress × humic acid	خشکی × اسید هیومیک	3	0.04*	0.003**	17.54**	30.23**	304.62**
Error	خطا	16	0.01	0.001	0.74	2.84	3.04

ns, *, and ** represent non-significance, significance at 5%, and significance at 1%, respectively.

جدول ۴. مقایسه میانگین سطوح مختلف تنش خشکی و محلول پاشی اسید هیومیک بر صفات مورفولوژیکی گیاه نعنای سبز
Table 4. Mean comparison of different levels of drought stress and foliar application of humic acid on morphological traits of spearmint

تنش خشکی	هیومیک (میلی‌گرم در لیتر)	ارتفاع گیاه (سانتی‌متر)	وزن تر برگ (گرم در بوته)	وزن تر ساقه (گرم در بوته)	وزن تر ریشه (گرم در بوته)	وزن خشک ساقه (گرم در بوته)	وزن خشک ریشه (گرم در بوته)
Drought stress (%FC)	Humic acid (mg/L)	Plant height (cm)	Leaf fresh weight (g/plant)	Stem fresh weight (g/plant)	Root fresh weight (g/plant)	Stem dry weight (g/plant)	Root dry weight (g/plant)
100	0	76.33 ^c	16 ^d	18.50 ^c	8.53 ^d	9.16 ^{cd}	3.98 ^{ef}
	100	87 ^b	17.66 ^c	18.75 ^c	9.12 ^{cd}	9.50 ^c	4.56 ^{cd}
	500	91.33 ^b	19.91 ^b	21.31 ^b	11 ^b	10.41 ^b	5.48 ^b
	1000	101 ^a	24.06 ^a	26.15 ^a	12.50 ^a	12.64 ^a	6.24 ^a
70	0	63.33 ^d	13 ^e	16.50 ^d	6.54 ^f	8 ^e	3.32 ^g
	100	66.66 ^d	15.33 ^d	17.21 ^d	7.76 ^e	8.66 ^{ed}	3.85 ^f
	500	72.66 ^c	17.68 ^c	19.08 ^c	8.47 ^{de}	9.68 ^c	4.31 ^{de}
	1000	77.33 ^c	18.50 ^{bc}	20.38 ^b	9.50 ^c	10.47 ^b	4.75 ^c

میانگین‌های دارای حرف مشابه در هر ستون بر اساس آزمون LSD در سطح احتمال پنج درصد تفاوت معنی‌داری با یکدیگر ندارند.
* Means followed by similar letter in each column are not significantly different on LSD test ($p \leq 0.05$).



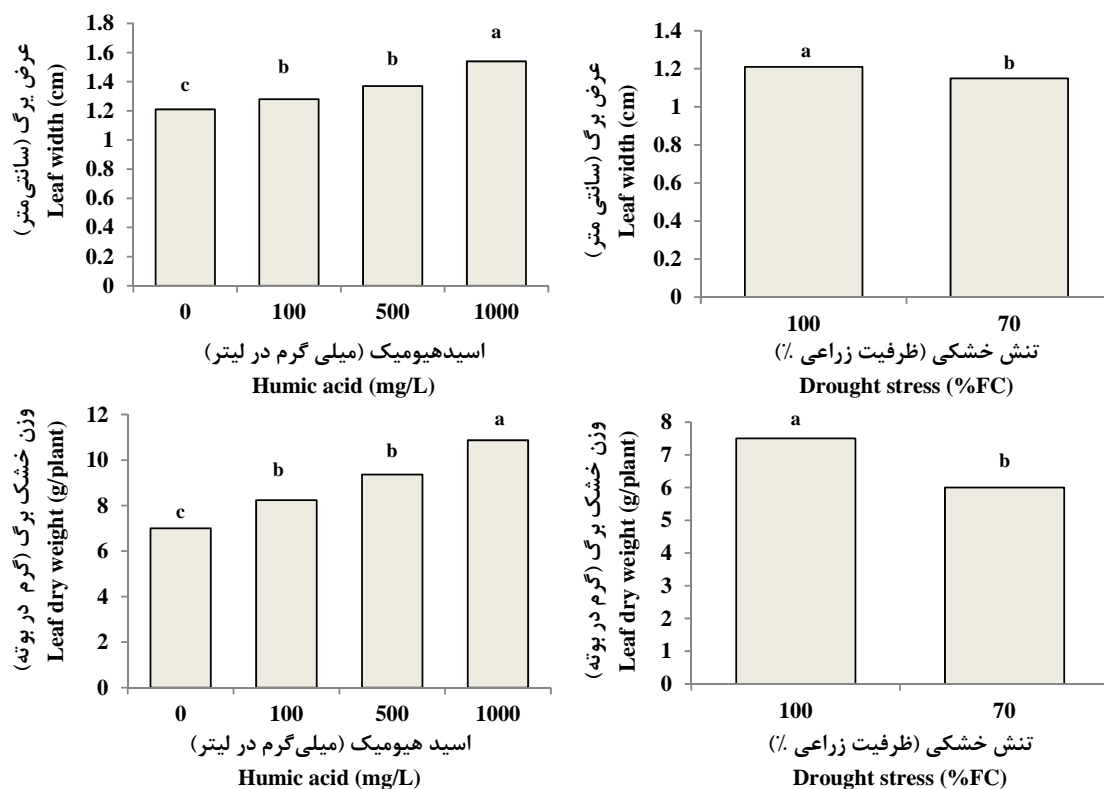
شکل ۱. اثر اصلی تنش خشکی و کاربرد اسید هیومیک بر تعداد شاخه فرعی و طول برگ نعنای سبز. حروف غیرمشابه روی ستون‌ها نشان‌دهنده معنی‌دار بودن اختلاف بین تیمارها در سطح یک درصد است.

Fig. 1. Main effect of drought stress and foliar application of humic acid on number of branches and leaf length of spearmint. Non-similar letters in each column represent significantly difference based on LSD test at 1% level.

محتوای کلروفیل

اعمال تنش خشکی و کاربرد اسید هیومیک (۱۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر) نسبت به شاهد افزایش (۲۲/۵۶ میلی‌گرم بر گرم وزن تر) پیدا کرد، گرچه با افزایش سطوح اسید هیومیک تحت تیمار تنش خشکی روند منظمی مشاهده نشد؛ اما لازم به ذکر است که مقادیر کلروفیل *b* و کل در تیمار عدم اعمال تنش و محلول‌پاشی ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر اسید هیومیک کاهش یافت. طبق نتایج جدول ۵، میزان شاخص سبزیگی در شرایط تنش خشکی و محلول‌پاشی ۱۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر اسید هیومیک نسبت به تیمار شاهد (عدم تنش خشکی و مصرف اسید هیومیک) افزایش پیدا کرده است. در واقع استفاده از اسید هیومیک با غلظت ۱۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر موجب افزایش معنی‌دار شاخص سبزیگی در هر دو شرایط تنش ملایم خشکی و عدم آن، نسبت به تیمار شاهد گردید.

مقایسه میانگین اثر متقابل داده‌ها نشان داد (جدول ۵) که در بین دو سطح اعمال تنش خشکی و عدم آن و غلظت‌های مختلف اسید هیومیک، میزان کلروفیل *a* در تنش ۷۰ درصد ظرفیت زراعی و محلول‌پاشی ۱۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر اسید هیومیک افزایش پیدا کرد، اگرچه به لحاظ آماری نسبت به تیمار عدم مصرف اسید هیومیک در همین سطح تنش، تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد. همچنین میزان کلروفیل *a* در تیمار عدم تنش و عدم کاربرد اسید هیومیک (شاهد) کاهش یافت. برحسب نتایج جدول ۵ اثرات متقابل تنش خشکی و اسید هیومیک نشان داد که میزان کلروفیل *b* (۸ میلی‌گرم بر گرم وزن تر) در تنش ۷۰ درصد ظرفیت زراعی تحت عدم تیمار اسید هیومیک بالا بوده و همچنین میزان کلروفیل کل با



شکل ۲. اثر اصلی تنش خشکی و کاربرد اسید هیومیک بر میزان عرض برگ و وزن خشک برگ نعناع سبز. حروف غیرمشابه روی ستون‌ها نشان‌دهنده معنی‌دار بودن اختلاف بین تیمارها در سطح یک درصد است.

Fig. 2. Effect of drought stress and foliar application of humic acid on leaf width and leaf dry weight of spearmint. Non-similar letters in each column represent significantly difference based on LSD test at 1% level.

ظرفیت زراعی) حاصل شد؛ ولی با تشدید تنش، از مقدار این رنگیزه‌ها نسبت به گیاهان شاهد کاسته شد (Rassam et al., 2014). کاهش سنتز کمپلکس اصلی رنگ‌دانه کلروفیل، تشدید فعالیت آنزیم‌های کلروفیل‌از و پراکسیداز، تولید ترکیبات فنلی، افزایش رادیکال‌های فعال اکسیژن و آسیب رساندن به غشاء کلروپلاست و اختلال در جذب نیترژن از خاک به‌عنوان مهم‌ترین عوامل کاهش غلظت کلروفیل در تنش‌های شدید شناخته شده است (Smirnoff, 1993). در مطالعه ایاس و گالسر (Ayas and Gulser, 2005) افزایش میزان سطح برگ و تولید بیشتر مقدار کلروفیل را در برگ‌های لوبیا با استفاده از تیمار اسید هیومیک گزارش کردند. چنانکه مشاهده می‌شود، در این مطالعه حفظ محتوای کلروفیل در تنش خشکی ملایم (۷۰ درصد ظرفیت زراعی) که از طریق تیمار اسید هیومیک حاصل شده است، به ثبات فتوسنتز در این وضعیت کمک می‌کند. همچنین در این آزمایش احتمال

میزان کلروفیل در گیاهان زنده یکی از عوامل مهم حفظ ظرفیت فتوسنتزی است. قابل‌ذکر است که برخی محققان افزایش نسبت کلروفیل *a/b* را موجب تیره شدن برگ‌ها و افزایش شاخص سبزیگی می‌دانند (Salehi et al., 2003). در پژوهش حاضر به نظر می‌رسد که محتمل‌ترین علت افزایش غلظت کلروفیل در تنش ۷۰ درصد ظرفیت زراعی، افزایش وزن مخصوص برگ باشد. بدین ترتیب وقوع تنش ملایم (۷۰ درصد ظرفیت زراعی) با کاهش اندازه سلول سبب کاهش سطح برگ می‌گردد که نتیجه آن تجمع سلول‌های بیشتری در واحد وزن برگ و افزایش غلظت کلروفیل برگ است. باین‌وجود در تنش‌های شدید ترکیباتی تولید و فرایندهایی فعال می‌شوند که علیرغم افزایش وزن مخصوص برگ به کاهش غلظت کلروفیل نسبت به گیاهان شاهد می‌انجامند. به‌طوری‌که در آزمایشی در گیاه زوفا^۱ حداکثر مقدار کلروفیل *a*، *b* و کلروفیل کل در تنش خشکی (۷۰ درصد

به شمار می‌رود. بالا رفتن میزان این دو ترکیب در بافت‌های گیاهان به‌نوعی بیانگر فعال شدن مکانیسم تنظیم اسمزی است که شرایط را برای جذب بیشتر آب و املاح از محیط ریشه فراهم می‌آورد (Munns, 2002). در این آزمایش نیز تجمع ترکیباتی همانند پرولین و اسیدهای آمینه و قندهای محلول در بافت سبز گیاه نعنای سبز 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 احتمالاً این هزینه را از طریق کاهش عملکرد ادا می‌کند. استفاده از ترکیبات آلی نظیر اسید هیومیک از طریق ایجاد شرایط مناسب برای افزایش در محتوای نیتروژن گیاهان سبب افزایش رشد و عملکرد آن‌ها می‌شود (Ayas and Gulser, 2005). همچنین دیده‌شده اسید هیومیک با بالا بردن میزان تولید ترکیبات آلی نیتروژن‌دار همانند پروتئین و اسیدهای آمینه سرعت رشد و تولید بیوماس در گیاه بنت‌گراس را افزایش می‌دهد (Sharif et al., 2002). در گیاه گل‌گاوزبان اروپایی اثر متقابل تنش خشکی و اسید هیومیک بر میزان تجمع کربوهیدرات‌های محلول و پرولین تأثیر معنی‌داری داشت (Heidari et al., 2015). نتایج محققان نشان داد که اسید هیومیک جذب نترات و فعالیت آنزیم‌های ATP 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 است و مواد هیومیکی در افزایش فعالیت چندین آنزیم درگیر در سنتز ترکیبات آلی در گیاهان نقش مثبت و مؤثری دارند (Malcolm and Vaghan, 1979).

میزان فنل کل و فعالیت آنتی‌اکسیدانی

مقایسه میانگین داده‌ها نشان داد که با افزایش تنش خشکی میزان فنل کل و فعالیت آنتی‌اکسیدانی افزایش معنی‌داری یافت به‌طوری‌که میزان فنل کل (۰/۶۲ میلی‌گرم/گرم وزن تر) و فعالیت آنتی‌اکسیدانی (۶۰/۱۶ درصد) در تنش خشکی (۷۰ درصد ظرفیت زراعی) و کاربرد ۱۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر اسید هیومیک افزایش یافته که نسبت به گیاهان شاهد (عدم تنش و محلول‌پاشی اسید هیومیک) حالت افزایشی نشان داده است. از سوی دیگر میزان فنل کل (۰/۲۳ میلی‌گرم/گرم وزن تر) و فعالیت آنتی‌اکسیدانی (۱۹/۵۷ درصد) در تیمار شاهد (۱۰۰ درصد ظرفیت زراعی) و عدم کاربرد اسید هیومیک حالت

می‌رود اسید هیومیک سبب تداوم بافت‌های فتوسنتز کننده شده و عملکرد گیاهان را افزایش می‌دهد. از طرفی 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).

کربوهیدرات کل و پرولین

از نتایج مقایسه میانگین داده‌ها (جدول ۵ و ۶) چنین برمی‌آید که در شرایط بدون تنش خشکی (۱۰۰ درصد ظرفیت زراعی) محلول‌پاشی اسید هیومیک در دو سطح ۱۰۰ و ۵۰۰ میلی-گرم در لیتر تأثیر چندانی بر محتوای کربوهیدرات کل برگ نسبت به گیاهان شاهد نداشت؛ اما کاربرد بیشترین سطح (غلظت ۱۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر) اسید هیومیک باعث کاهش معنی‌دار محتوای کربوهیدرات برگ نسبت به تیمار شاهد شد. از سوی دیگر با اعمال تنش خشکی (۷۰ درصد ظرفیت زراعی) و کاربرد اسید هیومیک در غلظت‌های مختلف، روند نامنظمی در محتوای قند برگ مشاهده شد. به‌طوری‌که میزان قند در شرایط تنش خشکی، با محلول‌پاشی ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر حالت افزایشی و در غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر اسید هیومیک حالت کاهش‌ی نشان داد.

همچنین از طرفی نتایج جدول ۶ را می‌توان چنین بیان کرد که در هر دو سطح وجود و عدم وجود تنش خشکی، کاربرد اسید هیومیک موجب کاهش مقادیر پرولین برگ شد. به بیانی دیگر، در شرایط عدم تنش، کاربرد اسید هیومیک منجر به روند کاهش پرولین گیاه نسبت به تیمار شاهد شد. گرچه اختلاف معنی‌داری بین سطوح اسید هیومیک نسبت به یکدیگر دیده نشد. همچنین، در شرایط تنش خشکی با کاربرد اسید هیومیک، محتوای پرولین برگ کاهش یافت و بیشترین کاهش در این شرایط در غلظت ۱۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر اسید هیومیک مشاهده شد. در یک نگاه کلی‌تر، میزان پرولین نعنای سبز در شرایط تنش خشکی و عدم کاربرد اسید هیومیک افزایش و در شرایط عدم تنش خشکی (۱۰۰ درصد ظرفیت زراعی) و کاربرد ۱۰۰۰ و ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر اسید هیومیک کاهش یافت (جدول ۶). پرولین اسیدآمینه ذخیره‌شده در سیتوپلاسم بوده و احتمالاً در حفاظت از ساختمان ماکرومولکول‌های درون سلول در طی تنش خشکی نقش مؤثری دارد. پرولین در واقع به‌عنوان یک شاخص در تعیین میزان حساسیت به تنش شوری و خشکی در گیاهان

کاهش یافته است (جدول ۶). امروزه استفاده از گیاهان دارویی و ترکیبات مؤثره آن‌ها، به‌عنوان منابع طبیعی که دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانی هستند، مورد توجه محققین قرار گرفته است. آنتی‌اکسیدان‌ها ترکیباتی هستند که به‌طور مؤثر و به‌طریق مختلف از واکنش رادیکال‌های آزاد دارای اکسیژن و نیتروژن فعال با بیومولکولها (نظیر پروتئین، آمینواسید و DNA) جلوگیری کرده و منجر به کاهش آسیب به سلول‌ها می‌شوند. رادیکال دی فنیل پیکرین هیدرازیل (DPPH) یک رادیکال آزاد است که به‌طور وسیع برای آزمایش پاک کردن رادیکال‌های آزاد مورد بررسی قرار می‌گیرد (Schutz and Fangmeier, 2001). مطابق نتایج محققان فعالیت آنتی‌اکسیدانی گیاه پونه در شرایط تنش خشکی افزایش یافت (Perez-Murcia et al., 2006) که این با پژوهش حاضر مطابقت دارد. همچنین ترکیب‌های فنلی شامل گروه بزرگی از متابولیت‌های ثانویه هستند که بسیاری از ترکیب‌های حلقوی مثل فنل، فلاون‌ها، فلاونوئیدها، تانن‌ها و لیگنین‌ها و حتی اسیدهای آمینه حلقوی، مثل تریپتوفان، تیروزین و پرولین را شامل می‌شوند. این ترکیب‌ها دارای نقش‌های متعدد اکولوژیکی و فیزیولوژیکی نظیر نقش‌های دفاعی و آنتی‌اکسیدانی می‌باشند (Andre et al., 2009). افزایش سنتز این ترکیب‌ها، در اثر محرک‌های متعددی نظیر حملات میکروبی، پرتوهای فرابنفش و تنش‌های فیزیکی و

شیمیایی گزارش شده است. به‌عنوان مثال بررسی روی اکالیپتوس نشان داد که تحت تنش خشکی ترکیب‌های فنلی در این گیاه افزایش می‌یابد (Babaian et al., 2008). قربانلی و همکاران (Ghorbanli et al., 2011) بر روی کتان روند افزایشی فنل کل را در تیمار خشکی نسبت به گیاهان شاهد گزارش کردند. در پژوهش حاضر افزایش میزان ترکیب‌های فنلی بر اثر افزایش تنش خشکی می‌تواند ارتباط مستقیم با ظرفیت آنتی‌اکسیدانی آن‌ها داشته باشد (Kim et al., 1997). تحقیقاتی که روی سیب‌زمینی انجام شد نشان داد که ژن تولیدکننده فنل در گیاه در شرایط تنش خشکی، بیان شده و میزان این ترکیب‌ها افزایش می‌یابد (Andre et al., 2009). افزایش میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی و فنل کل نعنای سبز در تنش خشکی (۷۰ درصد ظرفیت زراعی) توسط تخفیف‌دهنده (اسید هیومیک) نسبت به تیمار شاهد احتمالاً به دلیل افزایش مقاومت گیاه است. همچنین علت بالا رفتن سطوح ترکیبات فنولی در اثر افزایش فعالیت و میزان آنزیم بیوسنتزی فنل‌ها (فنیل آلانین آمونیلایز) گزارش شده است (Tian and Lei, 2006)، به‌طوری‌که در تحقیقی کاربرد ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر اسید هیومیک باعث افزایش فنل کل در گیاه همیشه‌بهار گردید (Abedini et al., 2015).

جدول ۵. مقایسه میانگین سطوح مختلف تنش خشکی و کاربرد محلول پاشی اسید هیومیک بر صفات فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی گیاه نعنای سبز

Table 5- Mean comparison of different levels of drought stress and foliar application of humic acid on physiological and biochemical traits of spearmint

تنش خشکی Drought stress (%FC)	اسید هیومیک Humic acid (mg/L)	کلروفیل a Chlorophyll a (mg/g FW)	کلروفیل b Chlorophyll b (mg/g FW)	کلروفیل کل Total chlorophyll (mg/g FW)	شاخص سبزیبندی (SPAD)	کربوهیدرات کل Total carbohydrate (mg/g FW)
100	0	6.74 ^d	7.67 ^a	21.19 ^a	27.03 ^c	0.53 ^c
	100	7.67 ^{cd}	3.98 ^{bc}	11.65 ^{cd}	26.76 ^c	0.57 ^c
	500	6.75 ^d	0.7 ^{de}	7.46 ^e	27.56 ^c	0.59 ^c
	1000	7.67 ^{cd}	2.47 ^{cd}	10.15 ^d	30.73 ^b	0.25 ^d
70	0	13.51 ^a	8 ^a	14.75 ^b	31.93 ^b	0.61 ^c
	100	9.23 ^{bc}	3.19 ^{bc}	12.43 ^c	32.06 ^b	0.25 ^d
	500	10.34 ^b	5.26 ^b	15.6 ^b	27.26 ^c	1.30 ^a
	1000	14.97 ^a	7.58 ^a	22.56 ^a	34.9 ^a	0.95 ^b

* میانگین‌های دارای حروف مشابه در هر ستون بر اساس آزمون LSD در سطح احتمال پنج درصد تفاوت معنی‌داری با یکدیگر ندارند.

* Means followed by similar letters in each column are not significantly different on LSD test ($p \leq 0.05$).

جدول ۶. مقایسه میانگین سطوح مختلف تنش خشکی و محلول پاشی اسید هیومیک بر صفات فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی گیاه نعناع سبز

Table 6- Mean comparison of drought stress and foliar application of humic acid on physiological and biochemical traits of spearmint

تنش خشکی Drought stress (%FC)	اسیدهیومیک Humic acid (mg/L)	پرولین Proline ($\mu\text{mol/g FW}$)	فنل کل Total phenol (mg/g FW)	فعالیت آنتی اکسیدانی (%) Antioxidant activity (%)	نشت الکترولیت (%) Electrolyte leakage (%)	محتوای رطوبت نسبی (%) Relative water content (%)
100	0	0.97 ^b	0.23 ^e	19.57 ^f	24.06 ^{d,c}	43.54 ^b
	100	0.11 ^d	0.24 ^e	20.06 ^f	21.91 ^d	40.26 ^c
	500	0.10 ^d	0.29 ^{fc}	34.16 ^e	18.86 ^e	60.11 ^a
	1000	0.07 ^d	0.36 ^e	36.20 ^d	15/57 ^f	61 ^a
70	0	1.66 ^a	0.40 ^d	44.1 ^c	47.83 ^a	22.57 ^e
	100	1.12 ^b	0.46 ^c	44.72 ^c	41 ^b	31.67 ^d
	500	0.77 ^c	0.54 ^b	51.73 ^b	33 ^c	37.28 ^c
	1000	0.71 ^c	0.62 ^a	60.16 ^a	30.25 ^c	43.63 ^b

میانگین‌های دارای حرف مشابه در هر ستون بر اساس آزمون LSD در سطح احتمال پنج درصد تفاوت معنی‌داری با یکدیگر ندارند.

* Means followed by similar letter in each column are not significantly different on LSD test ($p \leq 0.05$).

نشت الکترولیت

از نتایج مقایسه میانگین داده‌ها (جدول ۶) چنین برمی‌آید که در شرایط عدم تنش، کاربرد اسید هیومیک می‌تواند از میزان نشت الکترولیت نعناع سبز بکاهد. گرچه این کاهش با محلول‌پاشی ۱۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر اسید هیومیک بسیار بیشتر بوده است. از سوی دیگر، با افزایش غلظت اسید هیومیک در شرایط تنش خشکی، تأثیر معنی‌داری در کاهش نشت الکترولیت نسبت به تیمار شاهد (عدم تنش و عدم محلول‌پاشی اسید هیومیک) دیده شد. تنش خشکی یک سری تغییرات را در فسفولیپیدهای غشاء ایجاد می‌کند، این تغییرات مشابه تنش سرما در دنباله‌های اسید چرب ایجاد می‌شود، در نتیجه آن، اسیدهای چرب غیراشباع، افزایش می‌یابند. در تنش‌های شدید بعضی از قسمت‌های فسفولیپیدهای دولایه‌ای غشاء حالت هگزاگونال (شش‌وجهی) پیدا کرده و ساختار غشاء به ساختار منفذدار تبدیل و نشت مواد رخ می‌دهد. به‌طور کلی تنش خشکی باعث افزایش پراکسیداسیون چربی‌ها و در نهایت کاهش شاخص پایداری غشاء سلول در گیاهان مختلف می‌شود (Bhatt and Srinvasa Roa, 2005) به‌طوری‌که در بررسی اثر تنش خشکی بر روی چهار رقم سورگوم مشخص شد که میزان پایداری غشاء سیتوپلاسمی در بین ارقام مختلف متفاوت بوده و با افزایش

تنش خشکی کاهش می‌یابد و نیز مشخص شد که پایداری غشاء سیتوپلاسمی تحت تأثیر میزان موم اپی‌کوتیکولی، ضخامت کوتیکول و پتانسیل آب برگ‌ها قرار می‌گیرد (Estill et al., 1991). همچنین در این آزمایش تنش خشکی باعث افزایش نشت یونی شد؛ بنابراین به نظر می‌رسد که افزایش پراکسیداسیون لیپید یا نشت یونی در گیاه مورد مطالعه در شرایط تنش خشکی ناشی از افزایش تولید گونه‌های فعال اکسیژن در شرایط تنش اکسیداتیو باشد که حذف، جاروب کردن و یا خاموش نمودن آن‌ها خارج از توان گیاه بوده است و نشان می‌دهد که مکانیسم‌های دفاعی ایجاد شده در گیاه در مقابل تنش اکسیداتیو کافی نبوده است. در صورتی که استفاده از اسید هیومیک به‌ویژه ۱۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر باعث کاهش اثر سوء این تنش شده است.

محتوای رطوبت نسبی برگ

اثر متقابل داده‌ها نشان داد (جدول ۶) که میزان رطوبت نسبی برگ در تیمار عدم تنش (۱۰۰ درصد ظرفیت زراعی) و محلول‌پاشی ۱۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر اسید هیومیک (۶۱ درصد) و شرایط تنش ۷۰ درصد ظرفیت زراعی و عدم محلول‌پاشی اسید هیومیک (۲۲/۵۷ درصد) به ترتیب حالت افزایشی و کاهشی داشته است. در واقع در شرایط تنش ۷۰

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 اسید هیومیک در گسترش ریشه و در نتیجه قابلیت جذب عناصر غذایی کاراست، می‌توان تأثیر مثبت آن را انتظار داشت (Nassotti et al., 2000). در آزمایشی دیگری که روی گیاه خرفه انجام شده بود مقایسه میانگین داده‌ها نشان داد که بیشترین میزان محتوای نسبی آب برگ با میانگین ۵۶/۱۴ درصد مربوط به تیمار ۱۰۰ درصد ظرفیت زراعی و کمترین آن با میانگین ۴۹/۶۱ درصد مربوط به رژیم آبیاری (۲۵ درصد ظرفیت زراعی) بود. به طوری که کاربرد اسید هیومیک در هر سه سطح (۶۰۰، ۴۰۰ و ۲۰ میلی‌گرم در لیتر) موجب افزایش این میزان صفات گردید (Mozafari et al., 2017).

نتیجه‌گیری

این تحقیق نشان داد که نعناع سبز گیاهی بسیار حساس به تنش خشکی است. به طوری که تنش شدید (۳۰ درصد ظرفیت زراعی) را حتی برای مدت کوتاهی نتوانست تحمل کند. به طور کلی تنش خشکی باعث کاهش معنی‌دار صفات مورفولوژیکی نعناع سبز شد. محلول پاشی اسید هیومیک به‌ویژه ۱۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر بیشترین تأثیر را در افزایش شاخص‌های رشد آن داشت. با توجه به کاهش فرایندهای فیزیولوژیکی حاصل از تنش خشکی در گیاه نعناع سبز با محلول پاشی اسید هیومیک به‌ویژه در غلظت ۱۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر می‌توان استفاده از آن را به صورت محلول پاشی به‌عنوان کود آلی در تنظیم پتانسیل اسمزی تحت شرایط تنش خشکی تا حدودی مؤثر دانست و مهم‌تر از آن، کاربرد کود آلی اسید هیومیک به جای کود شیمیایی می‌تواند نویدبخش کشاورزی پایدار و کاهش آلودگی‌های زیست‌محیطی باشد. با این حال پیشنهاد می‌گردد که واکنش گیاه مذکور به اثر محلول پاشی اسید هیومیک در تعدیل اثر سوء تنش خشکی و سایر تنش‌های غیرزیستی در شرایط مزرعه نیز بررسی شود.

درصد ظرفیت زراعی کاربرد اسید هیومیک تنها در سطح ۱۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر توانست محتوای رطوبت نسبی برگ نعناع سبز را در حد گیاهان شاهد حفظ کند. محققان یکی از مهم‌ترین عوامل حفظ بقا در شرایط تنش را، قدرت بالای گیاه در حفظ آب سلولی می‌دانند. به طوری که در این پژوهش نیز در تنش خشکی محتوای نسبی آب برگ کاهش یافت. مقایسه محتوای نسبی آب برگ در ارقام گوجه‌فرنگی، بهترین شاخص برای تمایز ارقام حساس و غیرحساس بوده و این پارامتر همبستگی خوبی با سایر پارامترهای فیزیولوژیک نظیر آنتی-اکسیدان‌ها و شاخص‌های رشدی داشته است (Shrififar et al., 2007). هر عامل فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی در گیاهان که در حفظ آب گیاه نقش داشته باشد، می‌تواند یکی از عوامل مؤثر در معرفی رقم متحمل باشد. بسیاری از محققان در رابطه با انواع گیاهان گزارش کرده‌اند که ارقام مقاوم دارای محتوای نسبی آب بالاتری نسبت به ارقام حساس هستند (Du et al., 1998; Holm, 2002). تنش خشکی، سبب کاهش محتوای نسبی آب، پتانسیل کل آب و کاهش رشد گیاهان می‌شود. در یک بررسی، تنش خشکی موجب کاهش محتوای نسبی آب گیاه بادنجه‌بویه^۲ شد (Abbaszadeh et al., 2007). به نظر می‌رسد که گیاهان در شرایط تنش خشکی میزان آب سلول‌های خود را از طریق افزایش مواد اسمزی در درون بافت‌ها به حداقل می‌رسانند تا آب از بافت خاک با نیروی بیشتری وارد آن‌ها شود. این امر موجب کاهش میزان آب نسبی در شرایط تنش خشکی می‌گردد. بررسی نتایج پژوهش حاضر نشان داد که با کاربرد اسید هیومیک از اثرات تنش خشکی کاسته می‌شود؛ 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 به دست آید. با توجه به این که شرایط رشد سلول فشار تورگر در حد ماکزیمم، شامل انعطاف‌پذیری دیواره سلولی و رسوب‌گذاری در دیواره سلولی است؛ بنابراین به نظر 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

منابع

- Abbaszadeh, B., Sharifi Ashourabadi, E., Lebaschi, M.H., Naderi Hajibagher Kandy, M., Moghadami, F., 2007. The effect of drought stress on proline contents, soluble sugars, chlorophyll and relative water contents of balm (*Melissa officinalis* L.). Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants. 23(4), 504-513. [In Persian with English summary].
- Abedini, T., Moradi, P., 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.
- Ahmad, Y.M., Shahlabby, E.A., Shnan, N.T., 2011. The use of organic and inorganic cultures in improving vegetative growth, yield characters and antioxidant activity of roselle plants (*Hibiscus sabdariffa* L.). African Journal of Biotechnology 10(11), 1988-1996.
- Andre, C.M., Schafleitner, R., Legay, S., Lefevre, I., Aliaga, C.A.A., Nomberto, G., Hoffmann, L., Hausman, J.F., Larondelle, Y., Evers, D., 2009. Gene expression changes related to the production of phenolic compounds in potato tubers grown under drought stress. Phytochemistry. 70(90), 1107-1116.
- Ayas, H., Gulser, F., 2005. The effect of sulfur and humic acid on yield components and macronutrient contents of spinach. Journal of Biological Sciences. 5(6), 801-804.
- Babaian, M., Heidari, M., Ghanbari, A., 2008. Effects of foliar micronutrient application on osmotic regulation, yield and yield components of sunflower seeds var. Alster during of three stages of drought. Science and Technology of Agriculture and Natural Resources. 12, 119-128. [In Persian with English summary].
- Barrs, H.D., Weaterley, P.E., 1962. A re-examination of the relative turgidity techniques for the estimating water deficit in leaves. Australian Journal of Biological Sciences. 15, 413-428.
- Bates, I.S., Waldern, R.P., Terare, I.D., 1973. Rapid determination of free proline for water stress studies. Plant and Soil. 39, 205-207.
- Bhatt, R.M., Srinvasa Roa, N.K., 2005. Influence of pod load response of okra to water stress. Indian Journal of Plant Physiology. 10, 54-59.
- Chimenti, C., 2000. Activity and mechanism of action of natural antioxidants in lipids. Recent Research, Development Oil Chemistry. 2, 1-14.
- Chamani, A., Bonyadi, M., Ghanbari, A., 2014. Effect of salicylic acid and humic acid on growth indices of ornamental plant (*Catharanthus roseus* L.). Journal of Horticultural Science. 4, 631-641.
- Delfine, S., Togenetti, R., Desiderio, E., Alivino, 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.
- Ders, S., Gunes, T., Sivaci, R., 1998. Spectrophotometric determination of chlorophyll a, b and total carotenoids contents of some algae species using different solvents. Journal of Botany. 22, 13-17.
- Du, Y.C., Nose, A., Wasano, K., Uchida, Y., 1998. Response to water stress of enzyme activities and metabolite levels in relation to sucrose and starch synthesis, the Calvin cycle and the C₄ pathway in sugarcane (*Saccharum* sp.) leaves. Functional Plant Biology. 25, 253-260.
- De Feo, V., Ricciardi, A.I., Biscardi, D., Senatore, F., 1998. Chemical composition and antimicrobial screening of the essential oil of *Minthostahys verticillate* (Griseb) Ep1 (Lamiceae). Journal of Essential Oil Research. 10(1), 61-65.
- Fu, J., Haung, B., 2001. Involvement of antioxidants and lipid peroxidation in the adaptation two cool seasons to localized drought stress. Environmental and Experimental Botany. 45, 105-114.
- Guvence, I., Dursun, A., Turan, M., Tuzel, Y., Burrage, S.W., Bailey, B.J., Gul, A., Smith, A.R., Tuncay, O., 1999. Effect of different foliar fertilizers on growth, yield and nutrient content of lettuce and crisp lettuce. Acta Horticulturae. 491, 247-252.
- Ghorbanli, M., Bakhshi Khaniki, Gh., Zakeri, A., 2011. Investigation on the effects of water stress on antioxidant compounds of *Linum usitatissimum* L. Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants. 27(4), 647-658. [In Persian with English summary].
- Heidari, M., Reza Miri, H., Minaie, A., 2015. Activities of antioxidant enzymes and biochemical compounds of borage plant

- (*Borago officinalis*) in response to drought stress treatments and humic acid. *Journal of Environmental Stresses in Crop Sciences*. 2(6), 159-170. [In Persian with English summary].
- Izadi, Z., Asnaashari, M., Ahmadvand, G.H., 2009. The effect of drought stress on yield, proline, soluble sugars, relative water content and the essential oil of peppermint (*Mentha piperita*). *Iranian Horticultural Science and Technology*. 10(3), 223-234. [In Persian with English summary].
- Kumar, P., Mishra, S., Malik, A., Satya, S., 2011. Insecticidal properties of *Mentha* species: A review. *Industrial Crops and Products*. 34(1), 802-817.
- Kim, B.J., Kim, J.H., Kim, H.P., Heo, M.Y., 1997. Biological screening of 100 plant extracts for cosmetic use (II): Antioxidative activity and free radical scavenging activity. *International Journal of Cosmetic Science*. 19(9), 299-307.
- Lotfi, M., Abbaszadeh, B., Mirza, M., 2014. The effect of drought stress on morphology, proline content and soluble carbohydrates of tarragon (*Artemisia dracuncululus* L.). *Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants*. 1, 19-29 [In Persian with English summary].
- Malcolm, R.E., Vaghuan, D.V., 1979. Humic substance and phosphates actives in plant tissues. *Soil Biology and Biochemistry*. 11, 253-259.
- Monakhova, O.F., Chernyad'ev, I.I., 2002. Protective role of kartolin-4 in wheat plants exposed to soil drought. *Prikladnaia Biochemiia Microbiologiia*. 38, 373-380.
- Marcum, K.B., 1998. Cell membrane the removability and whole-plant heat tolerance of Kentucky bluegrass. *Crop Science*. 38, 1214-1218.
- Mirhajian, A., 2012. What is humic acids? News, Analysis, Training and Agricultural Engineering of Monthly. 33, 7-16.
- Mokhtari, A., Baradaran, R., 2011. Effect of drought stress on some growth indices of *Satureja hortensis*. *The First Regional Conference on Ecophysiology of Crop Plants*. Islamic Azad University of Shushtar. Shushtar, Iran. 317-319. [In Persian].
- Moon, J.H., Terao, J., 1998. Antioxidant activity of caffeic acid and dihydrocaffeic acid in lard and human low-density lipoprotein. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 46, 5062-5065.
- Munns, R., 2002. Comparative physiology of salt and water stress. *Plant, Cell and Environment*. 25, 239-250.
- Mozafari, S., Khorasani Nejad, Ghorgin Shabankareh, H., 2017. The effect of irrigation regimes and the application of humic acid on some of the physiological and biochemical characteristics of purple herb in greenhouse conditions. *Journal of Crop Improvement*. 19(2); 401-416. [In Persian with English summary].
- Nassotti Miandab, R., Samawat, S., Tehrani, M.M., 2000. Properties of humic acid on plant and soil. *Agriculture and Food*. 101, 53-55.
- Nardi, S., Pizzeghello, D., Muscolo, A., Vianello, A., 2002. Physiological effects of humic substances on higher plants. *Soil Biology and Biochemistry*. 34, 1527-36.
- Omidbigi, R., 2007. *Production and Processing of Medicinal Plants*. Second volume. Astan Quds Razavi Publishing. 438 pp. [In Persian].
- Perez-Murcia, M.D., Moral, R., Moreno-Caselles, J., Perez-Espinosa, A., Paredes, C., 2006. Use of composted untreated waste municipal in growth media for broccoli. *Journal of Bioresource and Technology*. 97, 123-130.
- Parvazi Shandi, S., Puzkhi, A., Asgharzadeh, A., Azadi, A., Pazhnezhad, F., 2013. The Effect of Humic Acid Irrigation and Growth Stimulating Bacteria on Physiological Characteristics of Wheat Cultivar in the City of Ray. *Crops Physiology Journal*. 17, 19-33. [In Persian with English summary].
- Rajinder, S.D., 1987. Glutathione status and protein synthesis during drought and subsequent dehydration in *Torula rulis*. *American Society of Plant Physiologists*. 83, 816-819.
- Rassam, G., Dadkhah, A., Khoshnod Yazdi, A., 2014. Estimation of the impact of water shortages on morphological and physiological traits of herb hyssop. *Journal of Agriculture*. 10, 1-12. [In Persian with English summary].
- Salehi, M., Nassiri Mahallati, A., Koocheki, M., 2003. Leaf nitrogen and chlorophyll as indicators for salt stress. *Iranian Journal of Field Crops Research*. 1(2), 199-205. [In Persian with English summary].

- Sanjari Mianjye, M., Cirrus Mehr, A., Fakhery, B., 2015. Effect of drought stress on some physiological characteristics of *Hibiscus sabdarifa*. Journal of Crop Improvement. 17(2), 403-414. [In Persian with English summary].
- Sardashti, A., Alidoust, A., 2007. Identify the compounds of humic acid in forest soils in northern Iran. Fifteenth Congress of Crystallography and Mineralogy of Iran. Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad. 361 pp.
- Schutz, M., Fangmeier, A., 2001. Growth and yield responses of spring wheat (*Triticum aestivum* L. cv. Minaret) to elevated CO₂ and water limitation. Environmental Pollution. 114, 187-194.
- Salahvarzi, Y., Tehranifar, A., Ghazanchian, A., 2008. Investigation of physiomorphologic changes of native and foreign green foliage, in drought stress and irrigation again. Iranian Journal of Horticultural Engineering. 9, 193-204. [In Persian with English summary].
- Sharif, M., Riaz, A., Khattak, M., Sarir, M., 2002. Effect of lignitic coal derived humic acid on growth of maize Plants. Communications in Soil Science and Plant Analysis. 33, 3567-3580.
- Shrififar, F., Moshafi, M.H., Mansouri, S.H., 2007. In vitro evaluation of antibacterial and antioxidant of the essential oil and methanol extract of endemic *Zataria multiflora* Boiss. Food Control. 18, 800-805.
- Singleton, V.L., Rossi, J.A., 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. American Journal of Enology and Viticulture. 16, 144-158.
- Smirnoff, N., 1993. The role active oxygen in the response of plants to water deficit and desiccation. New Phytologist. 125, 27-28.
- Sultana, N., Ikeda, T., Itoh, R., 1999. Effect of NaCl salinity on photosynthesis and dry matter accumulation in developing rice grains. Environmental and Experimental Botany. 42(3), 211-220.
- Tian, X., Lei, Y., 2006. Nitric oxide treatment alleviates drought stress in wheat seedlings. Biologia Plantarum. 50(4), 775-778.
- Tarahomy, G.H., Lahooti, M., Abbasi, F., 2010. The effect of drought stress on soluble sugars, chlorophyll and potassium *S. leriifolia* Journal of Biological Sciences, Islamic Azad University of Zanjan. 3(2), 1-7. [In Persian with English summary].