

## اثر تنش خشکی و محلول‌پاشی اسید هیومیک بر برخی از شاخص‌های فیزیولوژیکی لوبیا لیما (*Phaseolus lunatus* L.)

صدیقه بهشتی و علی تدین\*

گروه زراعت، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهرکرد.

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۰۲/۲۸، تاریخ پذیرش نهایی: ۱۳۹۴/۰۸/۱۳)

### چکیده:

به منظور بررسی اثر سطوح مختلف آبیاری و محلول‌پاشی اسید هیومیک بر برخی از صفات فیزیولوژیکی لوبیا لیما آزمایشی به صورت کرت‌های خرد شده در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی در سه تکرار در مزرعه تحقیقاتی دانشگاه شهرکرد در سال ۱۳۹۳ اجرا شد. فاکتور اصلی شامل چهار سطح تنش خشکی (۵۰، ۷۰، ۹۰ و ۱۱۰ میلی‌متر تبخیر از تشتک تبخیر کلاس A) و فاکتور فرعی شامل محلول‌پاشی چهار سطح اسید هیومیک (صفر، ۱، ۳ و ۶ لیتر در هکتار) بود. در این آزمایش صفات کلروفیل a، کلروفیل b، کارتنوئیدها، پایداری غشاء، میزان نسبی آب برگ پرولین و قندهای محلول مورد بررسی قرار گرفتند. نتایج نشان داد تنش خشکی باعث کاهش معنی‌دار کلیه صفات مورد بررسی گردید. اما اسید هیومیک باعث افزایش معنی‌دار این صفات گردید. اثر متقابل تنش خشکی و محلول‌پاشی اسید هیومیک بر میزان کارتنوئیدها و میزان پرولین معنی‌دار بود، ولی در سایر صفات تفاوت معنی‌داری ایجاد نکرد. محلول‌پاشی اسید هیومیک با افزایش غلظت اسمولیت‌هایی از جمله قندهای محلول و پرولین و در نتیجه کمک به حفظ فشار اسمزی در سلول‌ها، در تحمل تنش خشکی به گیاه کمک کرد.

کلمات کلیدی: پایداری غشاء، پرولین، آبیاری، لوبیا، میزان نسبی آب برگ.

### مقدمه:

حداقل رساندن افت محصول و بهبود امنیت غذایی در مناطق زیر کشت لوبیا در برابر تغییرات آب و هوایی است (رشیدی‌پور، ۱۳۸۷). خشکی همچنین باعث طیف وسیعی از واکنش‌های فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی در گیاهان می‌شود که شامل بسته شدن روزنه‌ها، ممانعت از رشد سلول و فتوسنتز و فعالیت تنفس می‌باشند که در مقابل گیاهان نیز دارای مکانیسم‌های پاسخ و سازگاری در این شرایط در هر دو سطح سلولی و مولکولی هستند، به عنوان مثال توسط تجمع اسمولیت‌ها و پروتئین به طور خاص در تحمل به تنش دخالت دارند (Shinozaki and Yamaguchi-Shinozaki, 2007). هنگامی که گیاهان به وسیله خشکی، شوری، دماهای پایین و

لوبیا عروس یا لیما با نام رایج انگلیسی Lima bean و نام علمی *Phaseolus lunatus* L. پس از لوبیای معمولی (*Phaseolus vulgaris* L.) بیشترین اهمیت را در بین گونه‌های جنس *Phaseolus* از نظر کشت و کار دارد. این نوع لوبیا یک گونه گرمسیری و متعلق به سرزمین‌های پست بوده و به فصل رشد گرم نیاز دارد (باقری و همکاران، ۱۳۸۰). یکی از مهمترین عوامل کاهش دهنده عملکرد لوبیا، تنش خشکی می‌باشد به طوری که بر بیش از ۶۰٪ تولید لوبیا در سراسر جهان تاثیر منفی می‌گذارد، در این راستا توسعه ارقام و انواع لوبیا برای سازگاری با خشکسالی از استراتژی‌های مهم برای به

تا حدود زیادی مانع از تبخیر آب می‌گردند. همچنین مولکول‌های فولیک اسید (بخش ریز مولکول اسید هیومیک) به درون بافت‌های گیاهی نفوذ می‌کند و با پیوند شدن به مولکول‌های آب تعریق و تعرق گیاه را کاهش داده به حفظ آب درون گیاه کمک می‌کند (Bronick and Lai, 2005). اثر مستقیم اسید هیومیک به عنوان یک ترکیب شبه هورمونی (Nardi et al., 2002) و اثر غیرمستقیم آن به صورت افزایش جذب عناصر غذایی از طریق خاصیت کلات‌کنندگی و احیاکنندگی و حفظ نفوذپذیری غشا، افزایش متابولیسم ریزجانداران در خاک، بهبود وضعیت فیزیکی خاک و افزایش رشد ریشه و ساقه می‌باشد (Sanchez et al., 2002).

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 هومیک بر رشد گیاه است، این آزمایش با هدف استفاده از یک کود آلی به عنوان منبع اسید هیومیک تحت شرایط تنش خشکی، به منظور بررسی برخی از صفات فیزیولوژیک لوبیای لیما به عنوان یک گونه جدید در اقلیم شهرکرد اجرا شد.

#### مواد و روش‌ها:

این آزمایش به منظور بررسی تأثیر اسید هیومیک بر برخی خصوصیات فیزیولوژیکی لوبیای عروس تحت شرایط کم آبی به صورت کرت‌های خرد شده در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی در سه تکرار در مزرعه تحقیقاتی دانشکده کشاورزی دانشگاه شهرکرد با عرض جغرافیایی ۳۲ درجه و ۲۱ دقیقه شمالی و طول جغرافیایی ۵۰ درجه و ۴۹ دقیقه شرقی با ارتفاع ۲۱۱۶ متر از سطح دریا در سال ۱۳۹۳ اجرا شد. فاکتور اصلی شامل چهار سطح تنش خشکی (۰، ۷۰، ۹۰ و ۱۱۰ میلی‌متر تبخیر از تشتک تبخیر کلاس A) و فاکتور فرعی شامل چهار سطح محلول‌پاشی اسید هیومیک (صفر، ۱، ۳ و ۶ لیتر در هکتار) بود. به منظور آماده نمودن زمین در بهار با گاواهن برگردان‌دار شخم نیمه عمیق زده، سپس با زدن دو دیسک

سایر فاکتورهایی که باعث کاهش پتانسیل آب شیره سلولی می‌شوند تحت تأثیر قرار می‌گیرند، باید غلظت اسمولیت‌هایشان را افزایش دهند تا جذب آب تحت شرایط تنش ادامه پیدا کند (تنظیم اسمزی) که تنظیم اسمزی و تغییر در خصوصیات دیواره و اندازه سلول برای افزایش مقاومت دیواره سلولی، از مهمترین مکانیسم‌ها برای فرار از آب‌کشیدگی (Desiccation) سلولی در این شرایط هستند (Kuznetsov and Shevyakova, 1999). کاهش قابل توجه در کلروفیل a, b و کاروتنوئیدها و کل رنگدانه‌ها تحت تنش خشکی نیز بر اثر کمبود آب و عمدتاً به دلیل آسیب به کلروپلاست توسط گونه‌های اکسیژن فعال روی می‌دهد (Agastian et al., 2000). کاروتنوئیدها در این شرایط قادرند انرژی زیاد طول موج‌های کوتاه را گرفته و اکسیژن یک‌تابی را به سه‌تابی تبدیل کنند و با گرفتن رادیکال‌های اکسیژن تولید شده، نقش آنتی‌اکسیدانی خود را ایفا کنند (Inze and Montagu, 2000). از دید فیزیولوژیکی، خشکسالی خفیف باعث مدیریت کاهش آب و نگهداری میزان نسبی آب برگ (RWC) می‌شود تا جایی که ظرفیت فتوسنتزی و عملکرد کوانتومی تغییرات کمی داشته و یا بدون تغییر باقی بماند. شدیدترین شکل تنش کم‌آبی، خشکیدگی (Dehydration) است و زمانی اتفاق می‌افتد که پروتوپلاست بیشتر آب خود را از دست داده و تنها مقدار بسیار کمی از آب به صورت باند شده در سلول باقی می‌ماند (Yordanov et al., 2003). با توجه به اینکه تنش خشکی اغلب در مزرعه بسیار آهسته‌تر از آنچه در طول آزمایش‌ها مشاهده می‌شود، به وقوع می‌پیوندد، بنابراین ممکن است سازگاری گیاه با شرایط در حال تغییر فراهم شود.

در این راستا شناخت عواملی همچون واکنش‌های فیزیولوژیکی در ارتباط با تنش و سایر مواردی که امکان توسعه هر چه بیشتر گیاهان در مناطق خشک و نیمه خشک را فراهم می‌کند، مطلوب خواهد بود. از جمله این موارد استفاده از مواد آلی است. ترکیبات هوموسی دارای دو نوع اسید آلی مهم به نام‌های اسید هیومیک و اسید فولیک و جزء هومین‌ها هستند. مولکول‌های اسید هیومیک با پیوند به مولکول‌های آب،

که در آنها، V: حجم محلول صاف شده (محلول فوقانی حاصل از سانتریفیوژ) (میلی‌لیتر)، A: جذب نور (نانومتر) و W: وزن تر نمونه (گرم) می‌باشد.

**شاخص پایداری غشاء (Membrane Stability Index)** از روش Sairam و همکاران (۱۹۹۷) بدین صورت اندازه‌گیری شد که از هر واحد آزمایشی دو قطعه برگ جوان توسعه یافته (دارای سطح تقریبی  $1\text{cm}^2$ ) توسط پانچ مخصوص جدا و داخل دو سری لوله‌های آزمایش حاوی ۱۰ میلی‌لیتر آب دو بار تقطیر شده قرار گرفت. در ادامه یکسری از لوله‌ها در دمای  $40^\circ\text{C}$  به مدت ۱۰ دقیقه و سری دوم نیز به مدت نیم ساعت در دمای  $100^\circ\text{C}$  در دستگاه بن ماری قرار گرفتند. پس از سرد شدن، هدایت الکتریکی نمونه‌ها قرائت و به ترتیب  $EC(40^\circ)$  و  $EC(100^\circ)$  نامیده شدند. در نهایت شاخص پایداری غشاء با توجه به فرمول زیر محاسبه گردید.

$$MSI = 1 - (EC_{40}/EC_{100}) \quad (\text{معادله ۴})$$

**محتوای نسبی آب برگ (Relative Water Content)** از روش Turner (۱۹۸۱) اندازه‌گیری شد. بدین منظور از هر نمونه تعداد ۱۵ دیسک به قطر ۷ میلی‌متر، توسط پانچ معمولی تهیه و توزین (Wf) شد. سپس نمونه‌ها به مدت ۲۴ ساعت در آب مقطر به حالت غوطه‌وری نگهداری و پس از طی این زمان مجدداً توزین (Ws) شدند. در نهایت به منظور تعیین وزن خشک (Wd)، نمونه‌ها به مدت ۷۲ ساعت در داخل آون با دمای  $70^\circ\text{C}$  قرار گرفتند. سپس RWC به روش زیر محاسبه شد.

$$RWC = (Wf - Wd) / (Ws - Wd) \quad (\text{معادله ۵})$$

**پرویلین** از روش Bates و همکاران (۱۹۷۳) تخمین زده شد. در این روش ۰/۵ گرم از برگ تر در ۵ میلی‌لیتر اسید سولفوسالسیلیک (۳٪) ساییده و صاف شد. در ادامه ۲ میلی‌لیتر از عصاره صاف شده با ۲ میلی‌لیتر اسید نین‌هیدرین و ۲ میلی‌لیتر اسید استیک مخلوط نموده و ۳۰ دقیقه در دمای  $100^\circ\text{C}$  درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. پس از سرد شدن لوله‌های آزمایش، به هر کدام ۶ میلی‌لیتر تولوئن اضافه نموده و لوله‌ها به خوبی تکان داده شدند. پس از با ثابت نگه داشتن لوله‌ها از لایه فوقانی که حاوی تولوئن و پرویلین است برای اندازه‌گیری

عمود برهم زمین تسطیح شد و به وسیله فارور پشته‌هایی به طول ۴ متر، عرض ۸۰ و به فاصله ۱۲۰ سانتی‌متر ایجاد گردید. در ادامه بذور ضد عفونی شده، ۲ سانتی‌متر بالاتر از محل داغ آب و دو طرف پشته‌ها به فاصله روی ردیف ۲۰ و عمق ۵ سانتی‌متر (فلاح، ۱۳۸۸) در واحدهای آزمایش به ابعاد  $4 \times 3$  متر به صورت هیرم کاری کشت شدند. بذور لوبیا لیما از شرکت نگین بذر پارس شهر خمین تهیه گردید. در طول دوره رشد گیاه آبیاری، کوددهی و کنترل علف‌های هرز به صورت دستی و به موازات آن اعمال تیمارها انجام شد. بعد از دستیابی به تراکم مطلوب و استقرار کامل گیاه، زمانی که گیاه دارای ۲-۳ گره روی ساقه اصلی خود بود، سطوح تیمار تنش با توجه به تبخیر تجمعی از تشتک تبخیر کلاس A اعمال گردید و این روند تا زمان برداشت ادامه داشت. منبع اسید هیومیک مورد استفاده دارای فاز مایع با نام تجاری هیوم-فرت اولترا شامل ۱۲٪ اسید هیومیک، ۳٪ اسید فولیک و ۳٪ اکسید پتاسیم ( $K_2O$ ) از شرکت آرمان سبز آدینه تهیه شد. غلظت‌های مورد نظر (۱، ۳ و ۶ لیتر در هکتار) قبل از آغاز گلدهی در دو نوبت به فاصله دو هفته اعمال گردید. صفات مورد اندازه‌گیری شامل:

**کلروفیل a، b و کاروتنوئیدها** با روش Arnon (۱۹۶۷) اندازه‌گیری شدند. ابتدا مقدار ۰/۵ گرم از ماده تر گیاهی با نیتروژن مایع تا حل شدن کامل، ساییده شد. سپس ۲۰ میلی‌لیتر استون ۸۰٪ به نمونه اضافه و در دستگاه سانتریفیوژ با سرعت ۶۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. عصاره جدا شده فوقانی در کوت اسپکتروفتومتر ریخته و مقدار جذب به طور جداگانه در طول موج‌های مربوطه توسط اسپکتروفتومتر قرائت گردید. در نهایت با استفاده از معادلات زیر میزان کلروفیل a، b و کاروتنوئیدها بر حسب میلی‌گرم بر گرم وزن تر نمونه محاسبه شد.

(معادله ۱):

$$\text{Chlorophyll a} = (19.3 \times A_{663} - 0.86 \times A_{645}) V/100W$$

(معادله ۲):

$$\text{Chlorophyll b} = (19.3 \times A_{645} - 3.6 \times A_{663}) V/100W$$

(معادله ۳):

$$\text{Carotenoides} = 100(A_{470}) - 3.27(\text{mg chl. a}) - 104(\text{mg chl. b})/227$$

میزان پرولین، جذب نور محلول در طول موج ۵۲۰ نانومتر قرائت گردید. از تولوئن خالص به عنوان شاهد استفاده شد. در نهایت مقدار پرولین موجود از هر نمونه با استفاده از منحنی استاندارد بر حسب میلی گرم در گرم وزن تازه برگ محاسبه شد.

**قندهای محلول:** بدین منظور در روش Sheligl (۱۹۸۶) پس از تهیه عصاره از ۰/۱ گرم نمونه برگ خشک با استفاده از اتانول ۸۰٪ و حذف رسوبات آن توسط محلول ۵٪ سولفات روی و ۴/۷ میلی لیتر از محلول هیدروکسید باریم ۳٪، نرمال، به ۲ میلی لیتر از عصاره مایع ۱ میلی لیتر محلول ۵٪ فنل و مقدار ۵ میلی لیتر اسید سولفوریک ۹۸٪ اضافه شد. پس از تثبیت رنگ محلول، میزان جذب در طول موج ۴۸۵ نانومتر قرائت شد. از گلوکز خالص برای تهیه محلول استاندارد و از آب برای شاهد استفاده شد.

برای آنالیز داده‌ها از نرم افزار SAS version 9 و مقایسه میانگین اثرات متقابل از نرم افزار SAS به همراه Mstatc استفاده شد. مقایسه میانگین عوامل آزمایشی با استفاده از آزمون حداقل اختلاف معنی داری (LSD) در سطح احتمال ۵ درصد ارزیابی شدند. رسم نمودارها نیز با Excel انجام شد.

### نتایج و بحث:

**کلروفیل a:** با توجه به نتایج آنالیز واریانس در جدول ۱، تنش خشکی تاثیر معنی داری در سطح احتمال ۱٪ بر میزان کلروفیل a داشت.

با افزایش شدت تنش از ۷۰ تا ۱۱۰ میلی متر تبخیر میزان کلروفیل a به ترتیب ۳/۵، ۶/۳ و ۷/۲ درصد نسبت به شاهد کاهش یافت (جدول ۲). بیشترین مقدار کلروفیل a در تیمار شاهد (بدون تنش) و کمترین آن در تیمار آبیاری پس از ۱۱۰ میلی متر به دست آمد. میزان این صفت در تیمار آبیاری پس از ۷۰ و ۹۰ میلی متر از نظر آماری مشابه بود. به علاوه عکس العمل گیاه نسبت به صفت کلروفیل a، در هر سه تیمار آبیاری پس از ۷۰، ۹۰ و ۱۱۰ میلی متر مشابه بود و اختلاف معنی داری را نشان نداد.

اثرات تنش خشکی بر میزان کلروفیل a در گیاهان زراعی

توسط محققین مختلف مورد بررسی قرار گرفته است. به عنوان مثال Flexas و Medrano (۲۰۰۸)، Agastian و همکاران (۲۰۰۰)، Santos (۲۰۰۴)، به کاهش میزان کلروفیل a تحت تنش خشکی در لوییا اذعان داشتند. به نظر می رسد کاهش در محتوای کلروفیلها می تواند به دلیل افزایش کاتابولیسم کلروفیلها و تخریب رنگدانه های فتوسنتزی باشد که این فرایند نیز خود نتیجه ی فراهم نبودن عوامل لازم جهت سنتز کلروفیل و تخریب ساختمان آن در شرایط تنش می باشد (احمدی موسوی و همکاران، ۱۳۸۴). دیگر محققین نیز کاهش میزان کلروفیل در شرایط تنش خشکی را به افزایش رادیکال های آزاد نسبت می دهند که باعث پراکسیداسیون و در نتیجه تجزیه کلروفیل می شود (Flexas and Medrano, 2008). همچنین کاهش جذب منیزیم و احتمالاً آهن در شرایط تنش خشکی می تواند باعث کاهش میزان سنتز کلروفیل شود (Keles and Oncel, 2004). اما همانطور که مشاهده می شود هر چه شدت تنش بیشتر می شود از شدت کاهش کلروفیل کاسته می شود. در این رابطه برخی از محققین علت افزایش کلروفیل یا نزولی بودن کاهش را به کوچک شدن سلول های برگ (به علت کاهش سطح برگ) و افزایش تراکم کلروفیل نسبت می دهند (پاک نژاد و همکاران، ۱۳۸۹).

اسید هیومیک نیز تاثیر مثبت و معنی داری در سطح یک درصد بر افزایش کلروفیل a داشت (جدول ۱). بیشترین میزان کلروفیل a (۱۱/۶۸ میلی گرم در گرم وزن تر برگ) با کاربرد ۶ لیتر در هکتار اسید هیومیک بدست آمد که از نظر آماری با کاربرد ۳ لیتر در هکتار اسید هیومیک اختلاف معنی داری نداشتند (جدول ۲). مطابق همین شکل کمترین میزان آن (۱۰/۳۴ میلی گرم در گرم وزن تر برگ) در تیمار شاهد مشاهده شد که با کاربرد یک لیتر اسید هیومیک در هکتار اختلاف معنی داری نداشت. همچنین تفاوت معنی داری بین سطوح کاربرد ۱ و ۳ لیتر محلول وجود نداشت. دلیل این افزایش کلروفیل a را می توان در توانایی گیاه در جذب بیشتر عناصر مختلف در حضور اسید هیومیک جستجو کرد. Nardi و همکاران (۲۰۰۲) نیز افزایش قدرت کلات کنندگی و جذب

جدول ۱- نتایج آنالیز واریانس (میانگین مربعات) صفات کلروفیل a، کلروفیل b، کارتنوئیدها، پرولین و قندهای محلول در تیمارهای مختلف تنش خشکی و سطوح اسید هیومیک در لوبیا لیما

منابع تغییرات	درجه آزادی	کلروفیل a	کلروفیل b	کارتنوئیدها	پرولین	قندهای محلول
بلوک	۲	۰/۳۲	۰/۰۲	۰/۰۰۰۷	۰/۰۸	۰/۱۵
تنش خشکی	۳	۱/۶۸*	۰/۸**	۰/۰۴۹**	۴/۵۷**	۱۱/۶۸**
خطای اصلی	۶	۰/۵۶	۰/۰۴۵	۰/۰۰۴	۰/۳۶	۰/۶۵
اسید هیومیک	۳	۳/۸۷**	۲/۸۶**	۰/۰۹۵**	۳/۷**	۲۱/۳۲**
بلوک x اسید هیومیک	۶	۰/۱۷	۰/۰۲	۰/۰۰۸	۰/۵	۱/۰۴
تنش خشکی x اسید هیومیک	۹	۰/۶۷ <sup>ns</sup>	۰/۰۵ <sup>ns</sup>	۰/۰۱۳*	۰/۹۲*	۰/۷۸ <sup>ns</sup>
خطای فرعی	۱۸	۰/۳۹	۰/۰۲	۰/۰۰۳	۰/۳۴	۰/۶۲
ضریب تغییرات (%)		۶/۸۳	۶/۸۲	۶/۸۲	۶/۵۵	۲/۵۷

\*\* و \* به ترتیب معنی‌داری در سطح ۱٪، ۵٪ و <sup>ns</sup> بیانگر عدم معنی‌داری می‌باشند.

جدول ۲- نتایج مقایسه میانگین‌های اثرات ساده تنش خشکی و اسید هیومیک بر کلروفیل‌های a و b، پایداری غشاء، میزان نسبی آب برگ و قندهای محلول

سطوح	کلروفیل a (mg/gr FW)	کلروفیل b (mg/gr FW)	پایداری غشاء (%)	میزان نسبی آب برگ (%)	قندهای محلول (mg/gr FW)
۵۰	۱۱/۴۷ <sup>a</sup>	۳/۴۳ <sup>a</sup>	۷۰/۸۹ <sup>b</sup>	۸۵/۵۳ <sup>a</sup>	۲۹/۳۳ <sup>c</sup>
تنش خشکی (میلی‌متر تبخیر)	۱۱/۰۷ <sup>ab</sup>	۳/۲۳ <sup>b</sup>	۷۱/۰۷ <sup>b</sup>	۸۳/۴۷ <sup>a</sup>	۳۰/۸ <sup>b</sup>
۹۰	۱۰/۷۵ <sup>b</sup>	۲/۹۶ <sup>c</sup>	۷۲/۴۱ <sup>b</sup>	۷۵/۲۱ <sup>b</sup>	۳۱/۱۴ <sup>ab</sup>
۱۱۰	۱۰/۶۴ <sup>b</sup>	۲/۸۶ <sup>c</sup>	۷۹/۱۷ <sup>a</sup>	۷۳/۱ <sup>b</sup>	۳۱/۶۲ <sup>a</sup>
صفر	۱۰/۳۴ <sup>c</sup>	۲/۴۷ <sup>c</sup>	۶۹/۰۶ <sup>c</sup>	۷۵/۴۱ <sup>d</sup>	۲۸/۹۴ <sup>c</sup>
محلول‌پاشی اسید هیومیک	۱۰/۷۷ <sup>bc</sup>	۳/۰۴ <sup>b</sup>	۷۰/۱۱ <sup>c</sup>	۷۷/۸۸ <sup>c</sup>	۳۰/۵۱ <sup>b</sup>
۳	۱۱/۱۴ <sup>ab</sup>	۳/۴۵ <sup>a</sup>	۷۴/۹۱ <sup>b</sup>	۸۰/۳۷ <sup>b</sup>	۳۱/۴۹ <sup>a</sup>
(لیتر در هکتار)	۱۱/۶۸ <sup>a</sup>	۳/۵۳ <sup>a</sup>	۷۹/۴۳ <sup>a</sup>	۸۳/۶۷ <sup>a</sup>	۳۱/۹۶ <sup>a</sup>
۶					

میانگین‌های دارای حداقل یک حرف مشترک در هر ستون در هر تیمار، تفاوت معنی‌داری در سطح احتمال ۵ درصد ندارند (LSD).

ترتیب ۵/۷، ۱۳/۶ و ۱۶/۵ درصدی نسبت به شاهد داشتند. همچنین بین آبیاری پس از ۹۰ و ۱۱۰ میلی‌متر تبخیر اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد (جدول ۲) که شاید بتوان این عدم اختلاف در سطوح بالا را با توجه به کوچک شدن اندازه سلول‌ها (پدیده‌ی پس‌آیدگی) و افزایش تراکم آنها در شرایط تنش توجیه کرد (پاک‌نژاد و همکاران، ۱۳۸۹).

محققین زیادی به تغییرات میزان کلروفیل b در شرایط تنش خشکی اشاره داشتند. تنش آبی سبب کاهش معنی‌دار کلروفیل b در نخود (منصوری‌فر و همکاران، ۱۳۹۱ و

عناصر غذایی توسط گیاه را با کاربرد اسید هیومیک گزارش کرد. نتایج آزمایش عدم معنی‌داری اثرات متقابل هیومیک و تنش خشکی بر میزان کلروفیل a را نشان می‌دهد که با نتایج رسایی و همکاران (۱۳۹۱) در مورد نخود فرنگی مطابقت دارد. **کلروفیل b:** نتایج تجزیه واریانس (جدول ۱) حاکی از آن است که اثرات متقابل فاکتورهای آزمایشی تاثیر معنی‌داری بر میزان کلروفیل b نداشت. اما اعمال تنش خشکی و کاربرد اسید هیومیک بر میزان کلروفیل b تأثیری معنی‌دار در سطح ۱ درصد داشته، به طوری که سطوح مختلف خشکی، کاهش به

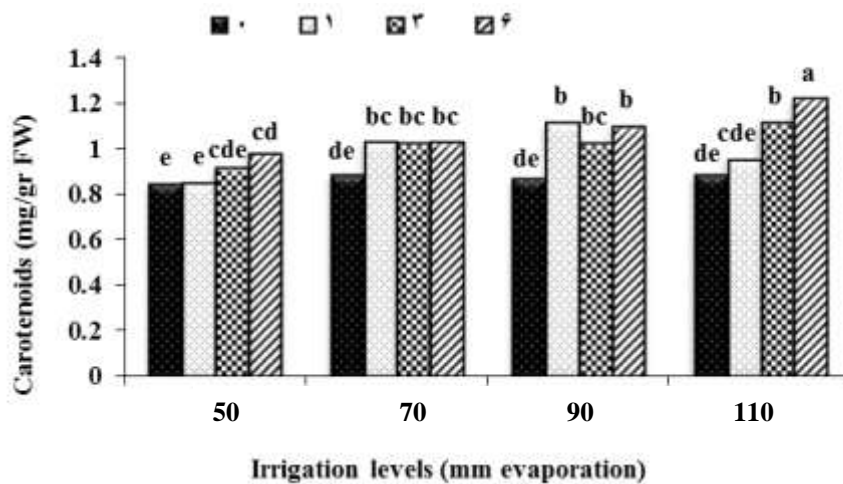
گردید. براساس شکل ۱، بیشترین میزان کارتنوئیدها با کاربرد ۶ لیتر در هکتار در تیمار آبیاری ۱۱۰ میلی‌متر تبخیر و کمترین آن در تیمار آبیاری ۵۰ میلی‌متر تبخیر بدون اسید هیومیک به دست آمد. عکس‌العمل میزان کارتنوئید گیاه در شرایط تنش ملایم (۷۰ میلی‌متر تبخیر) و تنش متوسط (۹۰ میلی‌متر تبخیر) و کاربرد اسید هیومیک مشابه بود، به‌نحوی که در هر دو سطح تنش میزان کارتنوئید با کاربرد هیومیک افزایش یافت. ضمناً تأثیر سطوح مختلف اسید هیومیک در هر دو آبیاری پس از ۷۰ و ۹۰ میلی‌متر یکسان بود.

به نظر می‌رسد افزایش کارتنوئیدها با افزایش شدت تنش بیان‌کننده نقش حفاظتی آنها در شرایط خشکی باشد و با پیشرفت تنش به دلایلی از جمله پیری تسریع شده و تخریب آنها توسط عوامل مخرب (از جمله اکسیژن فعال) از سرعت افزایش آنها کاسته می‌شود (Chalker-Scott, 2002). یکی از صدمات اکسیداتیو مهمی که در شرایط تنش ایجاد می‌شود، تخریب مولکول کلروفیل است که به دنبال این تخریب، گیاه رنگی به نظر می‌رسد و احتمالاً دلیل آن افزایش و قابل رؤیت شدن رنگیزه‌های محافظ مانند کارتنوئیدها (گزانتوفیل، کاروتن، لیکوپن) و آنتوسیانین می‌باشد (Chalker-Scott, 2002). کارتنوئیدها در این شرایط قادرند انرژی زیاد طول موج‌های کوتاه را گرفته و اکسیژن یک‌تابی را به سه‌تابی تبدیل کنند و با گرفتن رادیکال‌های اکسیژن تولید شده، نقش آنتی‌اکسیدانی خود را ایفا کنند (Inze and Montagu, 2000). مطالعات مختلف افزایش میزان کارتنوئیدها در شرایط تنش خشکی را نشان می‌دهند. طبق گزارش عمادی و همکاران (۱۳۹۱) تنش خشکی در لوبیا چیتی باعث افزایش معنی‌دار کارتنوئیدها گردید. در مقابل کاهش محتوای کارتنوئیدها با افزایش تنش خشکی در لوبیا توسط Silva و همکاران (۲۰۰۷) گزارش شد. تنش خشکی بر کاهش میزان کارتنوئیدهای ارقام نخود نیز افزایش معنی‌داری داشت (رمضان‌نژاد و همکاران، ۱۳۹۲). بنابراین به نظر می‌رسد که تأثیر تنش خشکی بر میزان کارتنوئیدها در گیاهان مختلف یکسان نباشد. بی‌تردید گونه‌ی گیاهی که بتواند کارتنوئید بیشتری داشته

رمضان‌نژاد و همکاران، ۱۳۹۲) گردید. Agastian و همکاران (۲۰۰۰) کاهش قابل توجه در کلروفیل a, b کارتنوئیدها و کل رنگدانه‌ها تحت تنش خشکی را با توجه به کمبود آب و عمدتاً به دلیل آسیب به کلروپلاست توسط گونه‌های اکسیژن فعال توجیه می‌کند. عده‌ای نیز میزان کلروفیل در شرایط تنش خشکی را به افزایش رادیکال‌های آزاد نسبت می‌دهند که باعث پراکسیداسیون و در نتیجه تجزیه کلروفیل می‌شود (Flexas and Medrano, 2008).

مقایسه میانگین‌های سطوح محلول‌پاشی اسید هیومیک (جدول ۲) بیانگر این مطلب است که این ترکیب باعث افزایش صفت کلروفیل b گردید، به‌طوری که بیشترین میزان کلروفیل b در کاربرد ۶ لیتر در هکتار هیومیک بدست آمد که از نظر آماری تفاوت معنی‌داری با محلول‌پاشی ۳ لیتر در هکتار نداشت. سایر سطوح اعمال هیومیک در گروه‌های مجزای آماری قرار می‌گیرند. به طور کلی کاربرد سطوح اسید هیومیک به ترتیب باعث افزایش به ترتیب ۲۳، ۴۰ و ۴۳ درصدی کلروفیل b نسبت به تیمار شاهد بدون اسید هیومیک گردید. این افزایش در سطوح پایین‌تر تنش بارزتر بود. این نتیجه بدین صورت توجیه‌پذیر است که نیتروژن یکی از اجزای مهم رنگدانه‌های فتوسنتزی است و نقش مهمی در فعالیت فتوسنتز دارد و اسید هیومیک نیز سبب افزایش محتوای نیتروژن (Ayas and Gulser, 2005) می‌گردد. از نتایج مشابه می‌توان به استفاده از اسید هیومیک اشاره کرد که باعث افزایش کلروفیل‌های a و b در نخودفرنگی گردید (رسایی و همکاران، ۱۳۹۱). همچنین اسپری برگی اسید فولیک (بخش ریزمکول اسید هیومیک) روی برگ‌های گندم سبب افزایش معنی‌داری در محتوی کلروفیل برگ‌ها گردید (Xudan, 1986).

**کارتنوئیدها:** نتایج تجزیه واریانس (جدول ۱) نشان می‌دهد، محتوای کارتنوئیدها به طور معنی‌داری ( $P < 0.01$ ) تحت تأثیر سطوح مختلف تنش خشکی و اسید هیومیک قرار گرفت. ضمناً اثر متقابل عوامل آزمایشی تنش خشکی و اسید هیومیک در سطح ۵ درصد معنی‌دار شد (شکل ۱). لذا کاربرد اسید هیومیک منجر به تغییرات میزان کارتنوئید در تنش خشکی

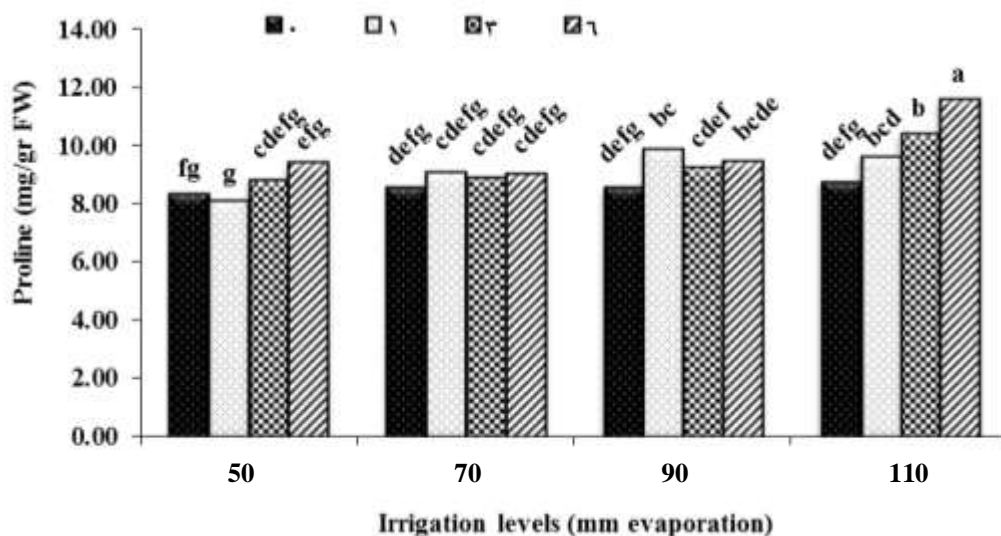


شکل ۱- اثرات متقابل سطوح مختلف اسید هیومیک و تنش خشکی بر میزان کارتنوئیدها. میانگین‌های دارای حداقل یک حرف مشترک در هر ستون در هر تیمار، تفاوت معنی‌داری در سطح احتمال ۵ درصد ندارند (LSD).

پرویلین (۱۱/۵۶) در تیمار آبیاری پس از ۱۱۰ میلی‌متر تبخیر با کاربرد ۶ لیتر در هکتار اسید هیومیک و کمترین آن در تیمار شاهد بدون تنش و بدون کاربرد اسید هیومیک مشاهده شد. میزان پرویلین در تمامی تیمارهای اسید هیومیک در شرایط بدون تنش (۵۰ میلی‌متر تبخیر) و تنش خشکی ملایم (۷۰ میلی‌متر تبخیر) فاقد اختلاف معنی‌دار بود. ضمناً مطابق این شکل در تیمار تنش متوسط (۹۰ میلی‌متر تبخیر) کاربرد ۱، ۳ و ۶ لیتر اسید هیومیک از نظر آماری اثر یکسانی را نشان داد. در بین سطوح مختلف تنش، تیمار ۱۱۰ میلی‌متر تبخیر تأثیرات متمایزی را نشان داد، به نحوی که در این سطح تنش تیمار شاهد بدون هیومیک کمترین، در تیمار ۱ و ۳ لیتر اثر مشابه ولی بیشتر از شاهد و در تیمار ۶ لیتر اسید هیومیک بیشترین میزان پرویلین حاصل شد. در مطالعات مشابه پروازی و همکاران (۱۳۹۲) افزایش معنی‌دار پرویلین برگ گندم در شرایط تنش خشکی در حضور کاربرد اسید هیومیک را گزارش دادند. افزایش تجمع پرویلین در اثر تنش خشکی توسط زاده‌باقری و همکاران (۱۳۹۳)، Souza و همکاران (۲۰۰۴) و در گیاه لوبیا و Sanchez و همکاران (۱۹۹۸) در گیاه نخود گزارش شده است. در بین اسمولیت‌های آلی، پرویلین احتمالاً فراوان‌ترین و عمومی‌ترین ماده حل شده سازگار است که تجمع می‌یابد (Kuznetsov and Shevyakova, 1999). کاهش

باشد در تنش اکسیداتیو ناشی از تنش آب دفاع موفقتری خواهد داشت و در مقابل تنش آب بردباری بیشتری از خود نشان می‌دهد (Foyer et al., 1998). با توجه به اینکه اعمال تنش خشکی در گیاه، تسریع پیری برگ و تجزیه رنگدانه‌های فتوسنتزی را در پی دارد و از آنجایی که کاهش کارایی استفاده از کربن سبب کاهش سنتز کارتنوئیدها در گیاهان می‌شود (Oliviera-Neto et al., 2009)، اسید هیومیک در افزایش میزان کارتنوئیدها نقش دارد، چرا که ۵۰٪ از وزن مولکولی اسید هیومیک را کربن تشکیل می‌دهد. بر اساس نظر Nardi و همکاران (۲۰۰۲) اسید هیومیک از طریق اثرات مثبت فیزیولوژیکی از جمله افزایش متابولیسم در درون سلول‌ها و همچنین بالا بردن میزان کلروفیل در برگ‌ها سبب ماندگاری بیشتر برگ‌ها می‌شود. El-Ghamry و همکاران (۲۰۰۹) در لوبیا نیز افزایش میزان کارتنوئیدها در حضور اسید هیومیک را گزارش کردند.

**پرویلین:** با توجه به نتایج جدول آنالیز واریانس، تیمارهای تنش خشکی و اسید هیومیک اثر معنی‌داری ( $P < 0.01$ ) بر غلظت پرویلین برگ داشتند (جدول ۱). ضمناً مطابق جدول ۱ اثرات متقابل عوامل مذکور نیز در سطح ۵٪ معنی‌دار شد. مقایسه میانگین‌های اثرات متقابل تنش x هیومیک نشان می‌دهد کاربرد اسید هیومیک باعث افزایش میزان پرویلین در شرایط تنش خشکی گردید (شکل ۲). مطابق این شکل بیشترین میزان



شکل ۲- اثرات متقابل سطوح مختلف اسید هیو میک و تنش خشکی بر میزان پرولین. میانگین‌های دارای حداقل یک حرف مشترک در هر ستون در هر تیمار، تفاوت معنی‌داری در سطح احتمال ۵ درصد ندارند (LSD).

در میزان اکسید شدن پرولین سبب افزایش تجمع آن شده که در کاهش اثرات تنش نقش دارد (کافی و همکاران، ۱۳۸۸). پرولین به عنوان یک ماده محلول سبب تنظیم فشار اسمزی، کاهش هدررفت آب سلول، حفظ آماس سلولی، کاهش اثر کند کنندگی یون‌ها روی فعالیت آنزیم‌ها، جلوگیری از تجزیه پرتئین‌های مختلف (احتمالاً از طریق کنترل pH سلول)، افزایش پایداری برخی آنزیم‌های سیتوپلاسمی و میتوکندریایی، پایداری شکل طبیعی پروتئین‌ها و در نتیجه حفاظت سامانه‌های غشایی می‌شود (کافی و همکاران، ۱۳۸۸). Kuznetsov و Shevyakova (۱۹۹۹) نیز اعتقاد دارند که پرولین به عنوان یک ماده محلول سبب تنظیم فشار اسمزی و کاهش از دست دادن آب از سلول و نگهداری آماس می‌شود. بنابراین افزایش غلظت آن تحت تنش ممکن است نشان دهنده نقش احتمالی این اسید آمینه در تنظیم اسمزی باشد.

**قندهای محلول:** تنش خشکی تأثیری معنی‌داری در سطح احتمال ۱٪ بر تجمع قندهای محلول دارد (جدول ۱). با افزایش شدت تنش خشکی تجمع قندهای محلول افزایش یافت (جدول ۲). بیش‌ترین غلظت قند محلول در تیمار تنش شدید (۱۱۰ میلی‌متر تبخیر) حاصل شد که با ۷/۷ و ۲/۶ درصد افزایش نسبت به تیمارهای آبیاری به ترتیب پس از ۵۰ و ۷۰

میلی‌متر تبخیر از نظر آماری دارای اختلاف معنی‌داری بود. در حالی که با سطح آبیاری پس از ۹۰ میلی‌متر تبخیر تفاوت معنی‌داری نداشت. ضمناً آبیاری ۷۰ و ۹۰ میلی‌متر تبخیر در یک گروه آماری قرار گرفتند. در تحقیق دیگر مشخص شد که کمبود آب باعث افزایش میزان پرولین و قندهای محلول در گیاه لوبیا چشم بلبلی شد (Souza et al., 2004). آزمایشات روی گیاه نخود نیز نشان داد که تنش خشکی، قندهای محلول را افزایش داد و باعث کاهش میزان نشاسته در آن شد. دلیل این امر، آن است که در شرایط تنش، گیاه برای مقابله با تنش، مولکول‌های درشتی مثل نشاسته‌ها را شکسته و این امر، سبب افزایش محتوای قند گیاه می‌شود (Sanchez et al., 1998). این در حالی است که زاده‌باقری و همکاران (۱۳۹۳) عدم تأثیر معنی‌دار تنش خشکی بر میزان قندهای محلول در گیاه لوبیا را گزارش دادند. در پاسخ به تنش، کاهش پتانسیل اسمزی به وسیله تجمع اسمولیت‌ها، ظرفیت حفظ فشار تورگر سلول را افزایش می‌دهد که این عمل برای فرآیندهای فیزیولوژیکی مانند فتوسنتز، فعالیت آنزیم‌ها و تکثیر سلولی، اساسی است (نجم‌زاده اصل و احسانپور، ۱۳۹۱). این سازوکار می‌تواند به گیاه کمک کند که دوره تنش و کمبود آب را تحمل کند و به رشد خود ادامه دهد.

در میزان اکسید شدن پرولین سبب افزایش تجمع آن شده که در کاهش اثرات تنش نقش دارد (کافی و همکاران، ۱۳۸۸). پرولین به عنوان یک ماده محلول سبب تنظیم فشار اسمزی، کاهش هدررفت آب سلول، حفظ آماس سلولی، کاهش اثر کند کنندگی یون‌ها روی فعالیت آنزیم‌ها، جلوگیری از تجزیه پرتئین‌های مختلف (احتمالاً از طریق کنترل pH سلول)، افزایش پایداری برخی آنزیم‌های سیتوپلاسمی و میتوکندریایی، پایداری شکل طبیعی پروتئین‌ها و در نتیجه حفاظت سامانه‌های غشایی می‌شود (کافی و همکاران، ۱۳۸۸). Kuznetsov و Shevyakova (۱۹۹۹) نیز اعتقاد دارند که پرولین به عنوان یک ماده محلول سبب تنظیم فشار اسمزی و کاهش از دست دادن آب از سلول و نگهداری آماس می‌شود. بنابراین افزایش غلظت آن تحت تنش ممکن است نشان دهنده نقش احتمالی این اسید آمینه در تنظیم اسمزی باشد.

**قندهای محلول:** تنش خشکی تأثیری معنی‌داری در سطح احتمال ۱٪ بر تجمع قندهای محلول دارد (جدول ۱). با افزایش شدت تنش خشکی تجمع قندهای محلول افزایش یافت (جدول ۲). بیش‌ترین غلظت قند محلول در تیمار تنش شدید (۱۱۰ میلی‌متر تبخیر) حاصل شد که با ۷/۷ و ۲/۶ درصد افزایش نسبت به تیمارهای آبیاری به ترتیب پس از ۵۰ و ۷۰



افزایش شاخص پایداری غشاء سلولی تحت شرایط تنش خشکی دست یافتند. در مقابل نظری ناسی و همکاران (۱۳۹۱) در لوبیا و رمضان‌نژاد و همکاران (۱۳۹۲) و منصورفر و همکاران (۱۳۹۱) در نخود به این نتیجه رسیدند که افزایش سطح تنش خشکی شاخص پایداری غشاء سلولی را کاهش می‌دهد. پاک‌نژاد و همکاران (۱۳۸۹) و Costa-Franca و همکاران (۲۰۰۰) نیز افزایش نشت الکترولیت‌ها در شرایط تنش خشکی در لوبیا را مشاهده کردند. در شرایط تنش خشکی، تولید و تجمع گونه‌های فعال اکسیژن، نظیر رادیکال‌های سوپراکسید، هیدروژن پراکسید و رادیکال‌های هیدروکسیل افزایش می‌یابد (Foyer et al., 1994). با افزایش تنش خشکی و در تنش‌های شدید، بعضی از قسمت‌های فسفولیپیدهای دو لایه‌ای غشاء و ساختار غشاء به ساختار منفذدار تبدیل می‌شود و در نتیجه نشت مواد روی می‌دهد. چون تنش خشکی باعث صدمه زدن به غشاء می‌شود، مقاومت غشاء کاهش و محتویات سلول به خارج ریخته می‌شود (کافی و همکاران، ۱۳۸۸). همانگونه که گفته شد تیمار تنش خشکی از تکامل دیواره سلولی ممانعت نموده و باعث نشت الکترولیت از دیواره سلولی می‌شود. با توجه به آسیب پذیری غشای سیتوپلاسمی، محتویات سلول به بیرون تراوش کرده و مقدار این خسارت را می‌توان با اندازه‌گیری نشت یونی و هدایت الکترونی تعیین نمود (Vannozzi and Larner, 2007). در پژوهش حاضر نیز تنش خشکی در کلیه سطوح افزایش نشت الکترولیت‌ها را به همراه داشت، اما این افزایش با شیب قبلی افزایش نیافته بلکه نسبت به کل املاحی که در دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد نشت یافته، کمتر بود. همین موضوع در فرمول شاخص پایداری غشاء سلولی  $(1 - \frac{EC(40^\circ)}{EC(100^\circ)})$  منعکس شده و باعث افزایش پایداری غشاء سلولی در سطوح بالاتر تنش خشکی گردید. به طور کلی محافظت از غشاها تحت شرایط تنش بخشی از تحمل به تنش در گیاهان می‌باشد.

اسید هیومیک نیز تاثیر معنی‌داری ( $P < 0.01$ ) بر پایداری غشاء داشت. کاربرد اسید هیومیک باعث افزایش پایداری غشاء سلولی گردید (جدول ۳) به طوری که بیش‌ترین درصد

اسید هیومیک نیز باعث افزایش معنی‌دار ( $P < 0.01$ ) تجمع قندهای محلول گردید (جدول ۱). استفاده از اسید هیومیک باعث ایجاد روند افزایشی در تولید قندهای محلول گردید. به طوری که کاربرد ۶ لیتر در هکتار از این محلول بیشترین (۳۱/۹) میلی‌گرم بر گرم وزن خشک برگ) و عدم کاربرد آن کمترین (۲۸/۹) میلی‌گرم بر گرم وزن خشک برگ) غلظت قند محلول را تولید کرد (جدول ۲). سطوح ۶ و ۳ لیتر اسید هیومیک نیز به ترتیب افزایش ۱۰/۴ و ۸/۷ درصدی این صفت را باعث شدند که مطابق شکل این دو سطح از نظر آماری تفاوت معنی‌داری با هم نداشتند. در این رابطه Hanafy Ahmad و همکاران (۲۰۱۰) در لوبیا سبز به افزایش قندهای محلول در حضور اسید هیومیک اذعان داشتند. رسایی و همکاران (۱۳۹۱) نیز نتایج مشابهی مبنی بر افزایش میزان قندهای محلول نخود فرنگی در حضور اسید هیومیک را گزارش دادند. همچنین آن‌ها به عدم معنی‌داری اثرات متقابل تنش خشکی × اسید هیومیک پی بردند که با نتایج این آزمایش مطابقت دارد (جدول ۱). بر اساس نظر Nardi و همکاران (۲۰۰۲) اسید هیومیک دارای فعالیت شبه هورمونی است و جذب عناصر معدنی همانند فسفر و پتاسیم را در گیاهان افزایش می‌دهد که این امر خود سبب بهبود فتوسنتز و افزایش مقدار قند تولیدی خواهد شد.

**پایداری غشاء سلولی:** نتایج تجزیه واریانس نشان داد که تنش خشکی باعث افزایش معنی‌دار شاخص پایداری غشاء سلولی در سطح احتمال ۱٪ گردید. اما اثر متقابل تنش خشکی و هیومیک تاثیر معنی‌داری بر پایداری غشاء سلولی نداشتند (جدول ۳).

بر اساس مقایسه میانگین‌های صفت پایداری غشاء سلولی در جدول ۲، بیشترین میزان پایداری غشاء سلولی با اعمال تیمار تنش شدید (آبیاری پس از ۱۱۰ میلی‌متر تبخیر) به دست آمد. این در حالی است که سایر سطوح تنش گرچه باعث افزایش در میزان این صفت شدند، اما از نظر آماری تفاوت معنی‌داری با تیمار شاهد (آبیاری پس از ۵۰ میلی‌متر تبخیر) نداشتند.

پورموسوی و همکاران (۱۳۸۵) در سویا و Saneoka و همکاران (۲۰۰۴) در علف گندمی به نتایج مشابهی مبنی بر

پایداری غشاء در کاربرد ۶ لیتر در هکتار مشاهده شد که نسبت به سطوح پایین تر اسید هیومیک به ترتیب ۵/۶، ۱۱/۷ و ۱۴/۹۶ درصد افزایش نشان داد. به علاوه تیمار شاهد بدون اسید هیومیک و کاربرد ۱ لیتر اسید هیومیک اختلاف معنی دار در صفت پایداری غشاء سلول نداشت. کاهش نشت مواد سیتوپلاسمی در تیمار کاربرد اسید هیومیک احتمالاً نشان دهنده این است که اسید هیومیک گیاه را در شرایط مناسب تری قرار داده و باعث افزایش قطر دیواره سلولی گیاه و در نتیجه افزایش پایداری غشاء سلولی شده است (پروازی شندی و همکاران، ۱۳۹۲). در مورد اثرات مثبت اسید هیومیک بر شاخص پایداری غشاء، پروازی شندی و همکاران (۱۳۹۲) در گندم نیز به نتایج مشابهی دست یافتند.

**میزان نسبی آب برگ:** در این آزمایش تنش خشکی باعث کاهش معنی دار میزان نسبی آب برگ در سطح ۱٪ گردید (جدول ۳). نتایج مقایسه میانگین ها نشان داد که با افزایش سطوح تنش خشکی، میزان نسبی آب برگ کاهش یافت (جدول ۲). براساس این شکل کاهش میزان نسبی آب برگ به ترتیب ۲/۴، ۱۲ و ۱۴/۵ درصد نسبت به تیمار شاهد بود. تیمار آبیاری پس از ۵۰ میلی متر تبخیر دارای بیشترین میزان آب نسبی برگ بوده که از لحاظ آماری تفاوت معنی داری با تیمار آبیاری پس از ۷۰ میلی متر تبخیر ندارد. تیمار آبیاری پس از ۱۱۰ میلی متر نیز دارای کمترین میزان آب نسبی برگ بوده که از لحاظ آماری تفاوت معنی داری با آبیاری پس از ۹۰ میلی متر تبخیر ندارد. اثر متقابل تنش خشکی و اسید هیومیک تاثیر معنی داری بر میزان نسبی آب برگ نداشت. نتیجه این آزمایش با نتیجه رسایی و همکاران (۱۳۹۱) مبنی بر عدم معنی داری اثر متقابل تنش خشکی و اسید هیومیک بر میزان نسبی آب برگ در گیاه نخود فرنگی مطابقت دارد. لذا تغییرات صفت میزان رطوبت نسبی در این گیاه در تیمارهای تنش خشکی و اسید هیومیک بصورت مستقل عمل می کند.

سایر محققین نیز به کاهش میزان آب نسبی برگ لوبیا (نظری ناسی و همکاران، ۱۳۹۱؛ و زاده باقری و همکاران، ۱۳۹۳) و نخود (منصوری فر و همکاران، ۱۳۹۱) اذعان داشتند.

به نظر می رسد گیاهان در شرایط تنش خشکی میزان آب سلول های خود را از طریق افزایش مواد اسمزی در درون بافت ها به حداقل می رسانند تا آب از بافت خاک با نیروی بیشتری وارد آنها شود، این امر موجب کاهش میزان آب نسبی در شرایط تنش خشکی می گردد. Rosales و همکاران (۲۰۱۲)، RWC بالا را نشان دهنده وضعیتی که در آن بافت قادر به گرفتن و یا نگهداری آب بیشتر نسبت به بافت با RWC پایین تر است، عنوان کردند. کاهش محتوای آب نسبی برگ در اثر تنش خشکی، دارای رابطه مستقیمی با محتوای رطوبتی خاک می باشد (Nautiyal, 2002). بنابراین با توجه به کاهش رطوبت نسبی برگ با افزایش شدت تنش خشکی به نظر می رسد، محتوای نسبی آب برگ می تواند به عنوان شاخصی که با پتانسیل رطوبتی خاک در ارتباط مستقیم است استفاده شود و آبیاری مزرعه با محاسبه رطوبت نسبی برگ انجام گیرد.

اسید هیومیک نیز تاثیر معنی داری ( $P < 0.01$ ) بر میزان آب نسبی برگ داشت، به طوری که محلول پاشی هر یک از سطوح اسید هیومیک در یک سطح آماری مجزا قرار گرفت (جدول ۳). بیشترین میزان نسبی آب برگ (۸۳/۶ درصد) با کاربرد ۶ لیتر در هکتار اسید هیومیک مشاهده شد که نسبت به سطوح پایین تر به ترتیب ۳/۲، ۶/۵ و ۱۰/۹ درصد افزایش داشت.

پروازی شندی و همکاران (۱۳۹۲) به نتایج مشابهی مبنی بر افزایش میزان نسبی آب برگ در حضور اسید هیومیک در گندم، دست یافتند. مولکول های اسید هیومیک با پیوند با مولکول های آب، تا حدود زیادی مانع از تبخیر آب می گردند. همچنین مولکول های اسید فولیک (بخش ریز مولکول اسید هیومیک) به درون بافت های گیاهی نفوذ می کند و با پیوند شدن به مولکول های آب تعریق و تعرق گیاه را کاهش داده به حفظ آب درون گیاه کمک می کند (Bronick and Lai, 2005). علاوه بر تاثیر مستقیم اسید هیومیک و اسید فولیک در حفظ آب سلول ها، در ترکیب اسید هیومیک مصرفی ۳٪ هیدروکسید پتاسیم موجود بود. به نظر می رسد افزایش غلظت پتاسیم باعث افزایش قدرت روزنه ها در باز و بسته شدن و جلوگیری از تعرق آب می شود. همچنین افزایش جذب پتاسیم سبب افزایش

فیزیولوژیکی از جمله کلروفیل a، کلروفیل b، کارتنوئیدها، پایداری غشاء و میزان نسبی آب برگ و در نتیجه به رشد گیاه که از افزایش در صفات فوق حاصل می‌شود، منجر شد. گیاه در مواجهه با تنش خشکی سعی در حفظ فشار اسمزی خود دارد و این کار را با افزایش اسمولیت‌هایی از جمله پرولین انجام می‌دهد که به حفظ فشار و تورژسانس سلول‌های گیاه کمک می‌کند. بدین ترتیب سلول به فعالیت‌های حیاتی خود ادامه می‌دهد و در نهایت عملکرد قابل قبول‌تری در این شرایط تولید می‌کند. لذا استفاده از این ماده عالی در مناطق خشک و نیمه خشک در جهت مقابله به تنش خشکی و در راستای اهداف کشاورزی پایدار توصیه می‌شود. اما در کل باید گفت اکثر گیاهان از ساز و کار یکسانی در مقاومت به تنش از جمله خشکی بهره نمی‌برند بلکه یک گیاه ممکن است چندین روش برای سازگاری با تنش داشته باشد، بنابراین انتظار نمی‌رود تغییرات کلیه صفات در راستای تخفیف اثرات تنش خشکی باشد.

جذب آب و تنظیم فشار اسمزی می‌گردد. به طور کلی بعضی از پژوهشگران بر این عقیده هستند که در اثر تنش خشکی میزان جذب پتاسیم در گیاه افزایش می‌یابد که به دلیل تنظیم فشار اسمزی و نقش یون پتاسیم در کنترل روزنه است. در مواردی هم مشاهده شده که درصد پتاسیم در گیاهان تحت تنش کمتر بوده که دلیل آن می‌تواند کاهش قابلیت دسترسی گیاهان به این عنصر در شرایط کمبود رطوبت باشد، به این صورت که در اثر وجود آب زیادتر، یون‌های یک ظرفیتی مانند پتاسیم در محلول خاک به طور نسبی بیشتر از یون‌های دو ظرفیتی مانند کلسیم و منیزیم افزایش می‌یابد. اما به تدریج که خاک خشک می‌شود، کلونیدهای رس با قدرت بیشتری یون‌های یک ظرفیتی پتاسیم را به سطح خود جذب می‌کنند و مانع از جدا شدن این یون‌ها و جذب آنها توسط گیاه می‌شوند (کوچکی و علیزاده، ۱۳۸۲).

#### نتیجه‌گیری:

با توجه به نتایج به دست آمده در این بررسی، می‌توان اظهار داشت که محلول‌پاشی اسید هیومیک به افزایش فاکتورهای

#### منابع:

- احمدی موسوی، ع.ا.، منوچهری کلانتری، خ. و ترکزاده، م. (۱۳۸۴) اثر نوعی براسیناستروئید (24-epibrassinolide) بر مقدار تجمع مالون دآلدئید، پرولین، قند و رنگیزه های فتوسنتزی در گیاه کلزا (*Brassica napus L.*) تحت تنش کم آبی، مجله زیست شناسی ایران ۱۸: ۲۹۵-۳۰۵.
- آرنون ا. (۱۳۷۴) اصول زراعت در مناطق خشک. ترجمه کوچکی، ع. و علیزاده، ا. جلد اول، انتشارات آستان قدس رضوی.
- پاک‌نژاد، ف.، وزان، س.، مجیدی هروان، ا.، نورمحمدی، ق. و سیادت، س.ع. (۱۳۸۹) بررسی تاثیر تنش خشکی بر پارامترهای فلورسانس کلروفیل، محتوای کلروفیل و عملکرد دانه ارقام مختلف گندم، مجله علوم کشاورزی ایران ۷: ۸۴۷-۸۴۱.
- پروازی‌شندی، س.، پازکی، ع.، اصغرزاده، ا.، آزادی، ا. و پاک‌نژاد، ف. (۱۳۹۲) اثر دور آبیاری، اسیدهیومیک و باکتری‌های محرک رشد بر ویژگی‌های فیزیولوژیکی گندم رقم کویر در منطقه شهر ری، فصلنامه علمی پژوهشی فیزیولوژی گیاهان زراعی ۱۸: ۱۹-۳۳.
- پورموسوی، م.، گلوی، م.، دانشیان، ج.، قنبری، ا. و بصیرانیپور، ن. (۱۳۸۶) بررسی تأثیر تنش خشکی و کود دامی بر محتوای رطوبت، میزان پایداری غشاء سلول و محتوای کلروفیل برگ سویا، مجله علوم کشاورزی و منابع طبیعی ۱۴: ۱۲۵-۱۳۵.
- رسایی، ب.، قبادی، م.ا.، امیری، ر. و رسایی، ع. (۱۳۹۱) اثرات فیزیولوژیکی کاربرد هیومیک اسید و آبیاری تکمیلی بر ارقام نخود فرنگی (*Pisium sativum L.*). دوازدهمین کنگره علوم زراعت و اصلاح نباتات دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج، کرج ایران.
- رشیدی‌پور، ا. (۱۳۸۷) بررسی اثرات خشکی بر کیفیت بذور و عملکرد بذر سورگوم دانه‌ای. اولین همایش ملی علوم و تکنولوژی بذر ایران، گرگان، ایران.

رمضان‌نژاد، ر.، لاهوتی، م. و گنجعلی، ع. (۱۳۹۲) اثر محلول پاشی اسیدسالیسیلیک روی برخی از شاخص‌های فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی ارقام حساس و مقاوم نخود (*Cicer arietinum L.*) تحت تنش خشکی، اکوفیزیولوژی گیاهی ۵: ۲۴-۳۶.

زاده‌باقری، م.، جوانمردی، ش.، علیزاده، ا. و کامل منش، م.م. (۱۳۹۳) اثر تنش خشکی بر عملکرد دانه و برخی ویژگی‌های فیزیولوژیک ژنوتیپ‌های مختلف لوبیا قرمز، اکوفیزیولوژی گیاهی ۱۸: ۱-۱۱.

عمادی، ن.، بلوچی، ح. و جهانبین، ش. (۱۳۹۱) اثر تنش خشکی و تراکم بوته بر عملکرد، اجزاء عملکرد و برخی خصوصیات ریخت شناسی لوبیا چیتی رقم C.O.S. 16 در منطقه یاسوج، مجله الکترونیک تولید گیاهان زراعی ۵: ۱-۱۷.

فلاح، س. (۱۳۸۸) زراعت (عمومی و خصوصی). انتشارات دانشگاه شهرکرد.

کافی، م.، برزویی، ا.، صالحی، م.، کمندی، ع.، معصومی، ع. و نباتی، ج. (۱۳۸۸) فیزیولوژی تنش‌های محیطی در گیاهان. انتشارات جهاد دانشگاهی مشهد.

منصوری‌فر، س.، شعبان، م.، قبادی، م. و صباغ‌پور، ح. (۱۳۹۱) خصوصیات فیزیولوژیک ارقام نخود زراعی (*Cicer arietinum L.*) تحت اثر تنش خشکی و کود نیتروژنه آغازگر، نشریه پژوهش‌های حبوبات ایران ۳: ۶۶-۵۳.

نجف‌زاده اصل، س. و احسانپور، ع.ا. (۱۳۹۱) اثر تنش خشکی بر برخی از شاخص‌های فیزیولوژیکی دو رقم سیب زمینی (Concord و Kenebec) در شرایط کشت درون شیشه، فصلنامه علمی پژوهشی خشک بوم ۲: ۷۰-۸۱.

نظری‌ناسی، ح.، جباری، ف.، عظیمی، م. و نوروزیان، م. (۱۳۹۱) ارزیابی اثر تنش خشکی بر پایداری غشای سلولی، سرعت فتوسنتز، محتوی نسبی آب و عملکرد دانه چهار رقم لوبیا چیتی، علوم گیاهان زراعی ایران ۳: ۴۹۱-۴۹۹.

ون شونه‌هون ا. و ویست ا. (۱۳۸۰) زراعت و اصلاح لوبیا. ترجمه باقری، ع.، محمودی، ع.ا. و قزلی، ف.د. انتشارات جهاد دانشگاهی مشهد.

- Agastian, P., Kingsley, S. J. and Vivekanandan, M. (2000) Effect of salinity on photosynthesis and biochemical characteristics in mulberry genotypes. *Photosynthetica* 38: 287-290.
- Arnon, A. N. (1967) Method of extraction of chlorophyll in the plants. *Agronomy Journal* 23:112-121
- Ayas, H. and Gulser, F. (2005) The effect of sulfur and humic acid on yield components and macronutrient contents of spinach. *Journal of Biological Sciences* 5: 801-804.
- Bronick, E. J. and Lai, R. (2005) Soil structure and management. A review. *Geoderma* 124: 3-22.
- Bates, L. S., Waldern, R. P. and Tear, I. D. (1973) Rapid determination of free proline for water stress studies. *Plant Soil* 39:205-207.
- Chalker-Scott, L. (2002) Do anthocyanins function as osmoregulators in leaf tissues? *Advances in Botanical Research* 37: 103-106.
- Costa-Franca, M. G., Pham-Thi, A. T., Pimentel Pereyra-Rossello, C., Zuily, R. O., Fodil, Y. and Laffray, D. (2000) Differences in growth and water relations among *Phaseolus vulgaris* cultivars in response to induced drought stress. *Environmental and Experimental Botany* 43: 227-237.
- El-Ghamry, A. M., Hai, K. M. and Ghoneim, K. M. (2009) Amino and humic acids promote growth, yield and discuses Resistance of Fabs Beam Cultivatod in clayey soil. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences* 3: 731-739.
- Flexas, J. and Medrano, H. (2008) Drought-inhibition of photosynthesis in C3- plants: stomatal and nonstomatal limitation revisited. *Annals of Botany* 183: 183-189.
- Foyer, C. H., Leadis, M. and Kunert, K. J. (1994) Photo oxidative stress in plants. *Plant Physiology* 92: 696-717.
- Foyer, C. H., Valadier, M. H., Migge, A. and Becker, T. W. (1998) Drought induced effects on reductase activity and mRNA and on the coordination of nitrogen and carbon metabolism in maize leaves. *Plant Physiology* 117: 283-292.
- Hanafy Ahmad A. H., Nesiem M. R., Hewedy A. M. and Sallam H. (2010) Effect of Some Simulative Compounds on Growth, Yield and Chemical Composition of Snap Bean Plants Grown under Calcareous Soil Conditions. *Journal of American Science* 6: 552-569.
- Inze, D. and Montagu, M. V. (2000) *Oxidative Stress in Plant*. Tj International Ltd, Padstow, Cornwall, Great Britain.
- Keles, Y. and Oncel, I. (2004) Growth and solute composition on two wheat species experiencing combined influence of stress conditions. *Russian Journal of Plant Physiology* 51: 203-208.
- Kuznetsov, V. I. and Shevyakova, N. I. (1999) Proline under stress: Biological role, metabolism, and regulation. *Russian Journal of Plant Physiology* 46:274-287.

- Nardi, S., Pizzeghello, D., Muscolo, A. and Vianello, A. (2002) Physiological effects of humic substances on higher plants. *Soil Biology and Biochemistry* 34: 1527–1536.
- Nautiyal, P. C., Rachaputi, N. R., and Joshi, Y. C. (2002) Moisture-deficit-induced changes in leaf-water content, leaf carbon exchange rate and biomass production in groundnut cultivars differing in specific leaf area. *Field Crops Research* 74: 67-79.
- Oliviera-Neto, C.F., Silva-Lobato, A. K., Goncalves-Vidigal, M. C., Costa, R.C.L., Santos.Filho, B. G., Alves, G. A. R., Silva-Maia, W. J. M., Cruz F. J. R., Neres, H. K. B. and Santos Lopes, M. J. (2009) Carbon compounds and chlorophyll contents in sorghum submitted to water deficit during three growth stages. *Science and Technology* 7: 588-593.
- Rosales, M. A., Ocampo, E., Rodriguez-Valentin, R., Olvera-Carrillo, Y., Acosta-Gallegos, J. and Covarrubias, A. A. (2012) Physiological analysis of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) cultivars uncovers characteristics related to terminal drought resistance. *Plant Physiology and Biochemistry* 56: 24-34.
- Sairam, R. K., Deshmukh, P. S. and Shukla, D. S. (1997) Tolerance to drought and temperature stress in relation to increased antioxidant enzyme activity in wheat. *Agronomy Crop Science* 1: 171-178
- Sanchez, F. J., Manzanares, M., De-Andres, E. F., Tenorio, J. and Ayerbe, L. (1998) Turgor maintenance, osmotic adjustment and soluble sugar and proline accumulation in 49 pea cultivars in response to water stress. *Field Crops Research* 59: 225-235.
- Sanchez-Sanchez, A., Sanchez-andreu, J., Juarez, M., Jorda, J. and Bermudez, D. (2002) Humic substances and amino acids improve effectiveness of chelate Fe EDDHA in lemon trees. *Journal of Plant Nutrition* 25: 2433–2442.
- Saneoka, H., Moghaieb, R. E. A., Premachandra, G. S. and Fujita, K. (2004) Nitrogen nutrition and water stress effects on cell membrane stability and leaf water relations in *Agrostis palustris* Huds. *Environmental and Experimental Botany* 52:131–138.
- Shinozaki K. and Yamaguchi-Shinozaki K. (2007) Gene networks involved in drought stress response and tolerance. *Journal of Experimental Botany* 58: 221–227.
- Silva, M. A., Jifon, J. L., Silva, J. A. G. and Sharma, V. (2007) Use of physiological parameters as fast tools to screen for drought tolerance in sugarcane. *Brazilian Journal of Plant Physiology* 19: 193-201.
- Souza, R. P., Machado, E. C., Silva, J. A. B. Lagoa, A. M. M. A. and Silveira, J. A. G. (2004) Photosynthetic gas exchange, chlorophyll fluorescence and some associated metabolic changes in cowpea (*Vigna unguiculata* L.) during water stress and recovery. *Environmental and Experimental Botany* 51: 45-56.
- Sheligl, H. Q. (1986) Die verwertung orgngischer souren durch chlorella lincht. *Planta Journal*: 47-51.
- Santos, C. (2004) Regulation of chlorophyll biosynthesis and degradation by salt stress in sunflower leaves. *Scienta Horticulture* 103: 93-99.
- Turner, N. C. (1981) Techniques and experimental approaches for the measurement of plant water stress. *Plant and Soil* 58: 339-366.
- Vannozzi, G. and Lerner, F. (2007) Proline accumulation during drought rhizogene in maise. *Journal Plant Physiology* 85: 441-467.
- Xudan, X. (1986) The effect of foliar application of fulvic acid on water use, nutrient uptake and wheat yield. *Australian Journal of Agricultural Research* 37:343-350.
- Yordanov, I., Velikova, V. and Tsonev, T. (2003) Plant responses to drought and stress tolerance bulge. *Plant Physiology* 2: 187–206.

