

مقدمه

هیومیک اسید از طریق اثرات هورمونی و با تاثیر بر متابولیسم‌های سلولی گیاهان و همچنین با قدرت کلات‌کنندگی و افزایش جذب عناصر غذایی سبب افزایش رشد و ارتفاع گیاه می‌شود (Salimon *et al.*, 2012). جومات و همکاران (Jumat *et al.*, 2012) در تحقیقی تاثیر هیومیک اسید و فولویک اسید را روی گندم بررسی و گزارش کردند که تاثیر کود هیومیک اسید بر ارتفاع این گیاه در سطح ۱٪ معنی‌دار گردید. آنها مشخص کردند که تولید ایندول استیک اسید و سیتوکینین‌ها با اسیدهای آمینه ترپتوفان و آدنین ترشح شده از ریشه، هیدرولیز پیش ماده اتیلن (۱- آمینو سیکلو پروپان-۱- کربوکسیلیک اسید) و تولید مواد هورمونی و شبه هورمونی در اثر واکنش نیتريت حاصل از تنفس نیتراتی با اسید آسکوربیک مهم‌ترین سازوکارهای هیومیک اسید هستند. این ترکیب علاوه بر تاثیر مستقیم با سازوکار تولید مواد تنظیم‌کننده رشد گیاه به‌طور غیرمستقیم با کنترل میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت گیاهان در کنترل تنش کمبود آب تاثیر مفید دارد. سیدهارت و شارما (Siddharth and Sharma, 2010) در تحقیقات خود در گیاه کرچک اظهار داشتند بیشترین وزن تر و خشک اندام‌های هوایی و ارتفاع گیاه در تیمار ۱۰۰ درصد خاک مصرف هیومیک اسید بوده و کمترین وزن تر و خشک اندام‌های هوایی و ارتفاع گیاه در تیمار شاهد (بدون مصرف کود هیومیک اسید) به‌دست آمد. در حقیقت، فرآیندهایی که با افزایش حجم سلول در ارتباط هستند بیشتر از سایر فرآیندها به کمبود آب حساسیت نشان می‌دهند (Nurdin *et al.*, 2014). مهم‌ترین نمونه در مورد این فرآیندها تبادلات گازی برگ (حجم سلول محافظ روزنه) و

افزایش سطح برگ (نمو و توسعه سلول) می‌باشد. توقف این فرآیندها در شرایط تنش می‌تواند موجب کاهش معنی‌دار در عملکرد گردد (Birla *et al.*, 2012). این روند می‌تواند موجب افزایش ماده آلی خاک در گیاهان غرقابی نظیر برنج به‌وسیله هیومیک اسید گردد (Tabrizi *et al.*, 2015).

کامالاکار و همکاران (Kamalakar *et al.*, 2013) در آزمایش خود بیان کردند که رشد رویشی کرچک مانند تعداد برگ، شاخه، وزن تر و خشک گیاه، ارتفاع، عملکرد سبب غلاف‌ها و کیفیت آنها مانند (طول و وزن غلاف، و محتوای کلروفیل برگ‌های سبب لوبیا سبز، به‌وسیله کاربرد سطوح کاربرد هیومیک اسید افزایش پیدا کرد.

سموال و همکاران (Semwal *et al.*, 2011) در پژوهشی اثر هیومیک اسید را بر چند گراس مورد مطالعه قرار دادند و دریافتند کاربرد اسید هیومیک موجب افزایش تعداد و وزن شاخ و برگ گیاهان مرتعی می‌شود. بنابراین، به‌دلیل حساسیت بیشتر و برخورداری از قابلیت جبرانی اندک، مرحله زایشی بحرانی تلقی می‌گردد.

هین‌کاپی و همکاران (Hincapie *et al.*, 2011) اثر اختلاف سطوح مختلف هیومیک اسید را روی گندم معنی‌دار گزارش کردند و نشان دادند که سطوح مختلف اسید هیومیک اختلاف معنی‌داری بر وزن تر و خشک ساقه، ارتفاع ساقه و میزان جذب نیتروژن در گیاه گندم از طریق تاثیر بر فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت دارد. به‌طور کلی، تنش‌های محیطی تولید سوپر اکسید را افزایش می‌دهند. این تولید می‌تواند برای انسجام و عملکرد غشاء زیان‌آور باشد زیرا واکنش‌های متفاوت بین پروتئین‌ها و لیپیدها ممکن است جایگاه گونه‌های مولکولی متنوع را در لیپید دو لایه‌ای به طوری تغییر دهد که آنها بیشتر در معرض

محلول پاشی در زمان ۴ و ۸ برگی اثر بیشتری روی محتوای کلروفیل و فعالیت سوپر اکسید دیسموتاز داشت. بنابراین، یکی از راهکارهای مهم برای به حداکثر رساندن تولید در تمام نقاط دنیا انتخاب ترکیبات با کارایی بیشتر برای تحریک بیشتر فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانت در شرایط تنش می‌باشد.

هدف از انجام این تحقیق بررسی تاثیر محلول پاشی هیومیک اسید بر تنش کمبود آب و میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانت بود.

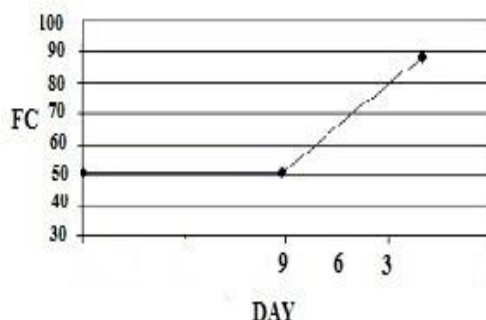
مواد و روش‌ها

این تحقیق در سال زراعی ۱۳۹۳-۱۳۹۲ در مزرعه مرکز تحقیقات کشاورزی دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج انجام شد. مختصات جغرافیایی مکان آزمایش طول و عرض جغرافیایی به ترتیب ۱۲° و ۴۶°، ۴۱° و ۳۲°، ارتفاع از سطح دریا ۱۸۰۰ متر و آب و هوای منطقه نیمه مرطوب بود. جهت بررسی ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی خاک، از خاک محل آزمایش نمونه برداری صورت گرفت که نتایج در جدول ۱ ارائه شده است. این طرح به صورت کرت‌های خرد شده در قالب بلوک‌های کامل تصادفی به طوری که تیمار رژیم آبیاری شامل آبیاری در ۸۰ درصد ظرفیت زراعی (S₁)، آبیاری در ۶۵ درصد ظرفیت زراعی (S₂)، و آبیاری در ۵۰ درصد ظرفیت زراعی (S₃) در کرت اصلی و ۴ تیمار هیومیک اسید به صورت محلول پاشی شامل عدم محلول پاشی F₀، یک بار محلول پاشی (۴ برگی) F₁، ۲ بار محلول پاشی (۴ و ۸ برگی) F₂ و ۳ بار محلول پاشی (۴، ۸ و ۱۲ برگی) F₃ در کرت فرعی در ۴ تکرار انجام شد. مشخصات هیومیک اسید مورد استفاده در جدول ۲ ارائه شده است. در زمان کاشت به زمین ۱۰۰ کیلوگرم در هکتار نیتروژن خالص از منبع اوره و ۲۵۰ کیلوگرم در

اکسیژن قرار گیرند (Mgunis *et al.*, 2012). بنابراین، تحت این شرایط تولید رادیکال پراکسید کاهش می‌یابد. میزان سوپر اکسید دیسموتاز، گلوتاتیون پراکسیداز و کاتالاز در پروتئین برگ می‌تواند تا حدودی در برقراری مقاومت نسبت به خشکی مهم باشد. در گیاهان روغنی نسبت سوپر اکسید دیسموتاز به گلوتاتیون پراکسیداز یک معیار مناسب برای خنثی کردن اثرات زیان‌آور یک تنش اکسایشی به شمار می‌رود (Okullo *et al.*, 2012). به طوری که به نظر می‌رسد گلوتاتیون پراکسیداز نقش مهم‌تری نسبت به سوپر اکسید دیسموتاز در فعال‌سازی گونه‌های روغنی در سطح تیلاکوئید دارا می‌باشد، چون علاوه بر واکنش با پراکسید هیدروژن ممکن است با سوپر اکسید هم واکنش دهد. پس می‌توان گفت که در ارقام مقاوم به خشکی نسبت سوپر اکسید دیسموتاز به گلوتاتیون پراکسیداز کاهش می‌یابد و این یک معیار مهم در ارزیابی گونه‌های مقاوم به خشکی نیز تلقی می‌گردد. به طوری که، اندالیو و همکاران (Endalew *et al.*, 2011) در آزمایش‌های خود در گیاه ذرت چنین نتیجه‌گیری نمودند که سطوح مختلف محلول پاشی هیومیک اسید اثر معنی‌دار بر آنزیم‌های آنتی اکسیدانت منجمله گلوتاتیون پراکسیداز و کاتالاز دارد.

کولکارنی و همکاران (Kulkarni *et al.*, 2014) در آزمایش‌های خود گزارش کردند که اثر هیومیک اسید ۱۲ درصد، در کرچک روی محتوای کلروفیل و تولید دانه این گیاه در شرایط کمبود آب بستگی به نحوه کاربرد این ماده دارد به طوری که، از نظر سطوح مصرف تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد ولی از نظر نحوه کاربرد اختلاف معنی‌دار مشاهده شد. به این ترتیب که عصاره استخراج شده از گیاه در شرایط دو بار

محصول باید در شرایط نرمال هر ۴ روز یک‌بار آبیاری شود. با توجه به مساحت مزرعه در هر بار آبیاری ۱۹/۲ متر مکعب آب به هر کرت داده شد.



شکل ۱- منحنی رطوبتی زمان آبیاری کرچک بر اساس ظرفیت زراعی

Figure 1- Time of castor irrigation humidity curve based on field capacity

محلول‌پاشی هیومیک اسید به میزان یک کیلوگرم در ۱۰۰۰ لیتر آب در هکتار در سه مرحله ۴، ۸ و ۱۲ برگی با کمک سم‌پاش پستی با نازل تلمبه‌ای به‌صورت یکنواخت روی برگ‌های گیاه انجام شد. به این صورت که در تیمار شاهد محلول‌پاشی انجام نشد و تیمارهای یک، دو و سه بار محلول‌پاشی با هیومیک اسید به‌ترتیب در مرحله ۴، ۸ و ۱۲ برگی گیاه انجام شد.

برای ارزیابی آنزیم‌ها پس از شستشوی برگ‌ها (۵۰۰ گرم برگ برای هر تیمار) حدوداً ۲۰ روز بعد از اعمال تنش، بلافاصله آنها را در بافر فسفات تریس ۰/۱۶ مولار با $\text{pH} = 7/5$ وارد، خرد و هموژن و سپس مقدار ۰/۵ میلی‌لیتر از محلول هموژن برای سنجش پروتئین توسط روش پاگلیا و ولنتاین (Paglia and Valentine, 1987) برداشته و در ۱/۳ میلی‌مول EDTA به همراه ۰/۱ مول کربنات منوسدیک تهیه و از اپی‌نفرین با غلظت ۰/۲۵ میلی‌مول به‌عنوان سوپسترا استفاده و سپس تغییرات جذب نوری حاصل از اکسیداسیون

هکتار فسفر خالص از منبع تریپل سوپر فسفات داده شد. هر کرت شامل چهار خط به طول چهار متر بود و عرض شیارها یک متر و فاصله بوته‌ها روی ردیف ۵۰ سانتی متر و عمق کاشت ۵ سانتی‌متر با تراکم ۴ بوته در متر مربع در نظر گرفته شد. کاشت بذور در ۱۰ خرداد ماه به‌صورت هیرم کاری انجام و محصول در ۲۰ مهر ماه برداشت، و رقم مورد کاشت Baker 43 بود.

جهت اعمال تنش ابتدا برای ارزیابی ظرفیت زراعی مزرعه یک کرت ۲×۲ را تهیه و آن را کاملاً پر از آب نموده و روی آن با پلاستیک محصور شد تا خاک کاملاً اشباع شود و بعد از مدت ۲۴ ساعت که آب خلل و فرج درشت خاک توسط نیروی ثقل خارج شد، پلاستیک را برداشته، نمونه خاک تهیه و پس از توزین، در آون الکتریکی با دمای ۱۰۵ درجه سلسیوس به مدت ۲۴ ساعت قرار داده شد. سپس نمونه با ترازوی دقیق وزن و میزان رطوبت تبخیر شده محاسبه شد. در هنگامی که پلاستیک از روی کرت برداشته شد ظرفیت مزرعه‌ای (FC) با دستگاه رطوبت سنج دستی اندازه‌گیری شد تا دو روش با هم مقایسه شود که تفاوت چندانی دیده نشد. اعمال تیمار تنش بدین صورت انجام گرفت که رطوبت خاک پس از اینکه به میزان مورد نظر رسید (کنترل رطوبت با دستگاه رطوبت سنج) آبیاری صورت گرفت (تنش بر اساس دور آبیاری)، به‌طوری که در تیمارهای تنش $\text{FC} = 80\%$ تقریباً هر ۳ روز یک بار آبیاری و تیمار $\text{FC} = 65\%$ هر ۶ روز یک بار آبیاری و در تیمار $\text{FC} = 50\%$ حدوداً هر ۹ روز یک بار آبیاری بر اساس منحنی رطوبتی (شکل ۱) انجام گرفت.

بر اساس تحقیقات بروگادا و گود (Borugadda and Goud, 2014) میزان آب مورد نیاز برای کرچک ۳۰۰۰ متر مکعب در هکتار بوده و

مجموع وزن آنها به عنوان وزن صد دانه در نظر گرفته شد. پس از برداشت تمام اندام هوایی گیاه از مساحت یک مترمربع دانه‌ها جدا، توزین و عملکرد دانه بر حسب کیلوگرم در هکتار محاسبه شد. برای ارزیابی تعداد کپسول ۵ بوته از هر کرت به طور تصادفی انتخاب و تعداد کپسول در هر گیاه شمارش و میانگین آن به عنوان تعداد کپسول در گیاه در نظر گرفته شد.

جمع‌آوری داده‌ها و تجزیه واریانس کلیه صفات مورد بررسی به وسیله نرم‌افزار SAS (ویرایش ۹/۱) انجام شد و میانگین داده‌ها بر اساس آزمون دانکن در سطح احتمال ۵ درصد مقایسه شدند.

نتایج و بحث

نتایج تجزیه واریانس نشان داد سطوح مختلف هیومیک اسید بر صفات مورد بررسی اثر معنی‌دار داشت. همچنین، اثر متقابل سطوح هیومیک اسید و تنش کمبود آب بر وزن صد دانه و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت در سطح ۱٪ معنی‌دار بود (جدول ۳). بیشترین و کمترین عملکرد دانه ۱۴۲۰ و ۵۸۹ کیلوگرم در هکتار به ترتیب در تیمار سه بار محلول‌پاشی با هیومیک اسید و بدون محلول‌پاشی در تیمارهای ۸۰ و ۵۰ درصد ظرفیت زراعی به دست آمد. افزایش عملکرد دانه به میزان ۱۴۲۰ کیلوگرم در هکتار گویای توانایی هیومیک اسید بر روی فرآیند زایشی گیاه می‌باشد به طوری که بالا بودن عملکرد دانه در برخی ژنوتیپ کرچک با خصوصیات نظیر گلدهی زود هنگام، تعداد بیشتر کپسول‌ها و وزن هزار دانه زیاد مرتبط است (Sun et al., 2013). همان‌طور که در جدول ۴ ملاحظه می‌شود عملکرد دانه در تیمار عدم محلول‌پاشی با هیومیک اسید (۹۵۶ کیلوگرم در هکتار) در تیمار ۸۰ درصد ظرفیت

آبی‌نفرین اندازه‌گیری و به عنوان فعالیت آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز (SOD) در نظر گرفته شد (Hayyan et al., 2013).

برای اندازه‌گیری گلوکاتایون پراکسیداز (GPX)، برگ‌ها به وسیله آب مقطر شستشو و بلافاصله در بافر فسفات تریس ۰/۱۶ مولار با pH= ۷/۵ وارد، خرد و هم‌وزن‌شده و آنگاه اجازه داده شد تا فرآیند هضم غشاء و دیواره سلولی پیش رود. سپس بر اساس روش لی و کیم (Lee and kim, 2001) عصاره استخراجی به محلول بافر حاوی فسفات، ۱/۲ مول EDTA و یک میلی‌مول نیترات سدیم و ۰/۲ میلی‌مول NADPH اضافه و به باقیمانده محلول استخراجی ۰/۲ میلی‌لیتر گلوکاتایون احیاء به همراه ۰/۱ میلی‌مول آب اکسیژنه اضافه و بلافاصله میزان اکسیداسیون NADPH از طریق تعیین مقدار و جذب در ۳۴۰ نانومتر در ۳۰ درجه سلسیوس توسط دستگاه اسپکتروفتومتر شیمادزو مدل u100z اندازه‌گیری شد (Dazy et al., 2008).

فعالیت آنزیم کاتالاز (CAT) با بررسی کاهش مقدار پراکسید هیدروژن در طول موج ۲۴۰ نانومتر انجام شد (Lee and kim, 2001). نمونه برگی به محلول واکنش شامل بافر فسفات ۵۰ میلی‌مولار (pH=۷) و پراکسید هیدروژن ۱۵ میلی‌مولار اضافه شد. واکنش با افزودن ۱۰۰ میکرولیتر عصاره‌ی آنزیمی در حجم نهایی ۳ میلی‌لیتر آغاز و تغییرات جذب در ۲۴۰ نانومتر به مدت ۳ دقیقه ثبت شد. سپس فعالیت آنزیم به صورت تغییرات جذب در دقیقه به ازای وزن تر بیان گردید (Dazy et al., 2008).

جهت تعیین وزن ۱۰۰ دانه، ابتدا از هر کرت دو نمونه ۵۰۰ تایی انتخاب، توزین و در صورتی که اختلاف وزن آنها کمتر از پنج درصد بود،

صد دانه به ترتیب ۲۳/۱ و ۱۴/۳ درصد و تعداد کپسول در بوته ۲۱/۶۴ و ۲۵/۹۷ درصد نسبت به تیمار عدم محلول‌پاشی با هیومیک اسید در سطح آبیاری ۶۵ و ۵۰ درصد ظرفیت مزرعه (۱۷/۵۲ و ۱۵/۷۸ گرم، ۱۷۰/۲۴ و ۱۳۰/۶۸ عدد) افزایش نشان داد (جدول ۴). این اعداد نشان می‌دهند کمبود آب در مراحل زایشی گیاه سبب کاهش طول دوره گل‌دهی تا رسیدگی گیاه شده و بدین سبب با کاهش طول دوره پر شدن دانه کاهش وزن دانه‌ها نیز رخ می‌دهد. به نظر می‌رسد که کمبود آب (۵۰ و ۶۵ درصد ظرفیت زراعی) از مرحله ساقه‌دهی تا آغاز پر شدن دانه احتمالاً به واسطه کاهش تولید آسیمیلات‌های فتوسنتزی سبب کاهش محسوس شیره پرورده برای پر شدن دانه‌ها، چروکیدگی و کاهش وزن دانه را موجب شده است (Kulkarni et al., 2014). پس افزایش تعداد دانه تا ۱۷۰ عدد در کپسول می‌تواند نقش هیومیک اسید در شرایط کمبود آب را تا حدودی توجیه کند (جدول ۴). کاربرد هیومیک اسید انتقال آب از ریشه به اندام‌های هوایی را افزایش داده (Tsanaktsidis et al., 2013) و کاهش شدت اثر تنش کمبود آب را به همراه داشته است. از طرفی با توجه به این‌که کرچک باید هر ۴ روز یک‌بار آبیاری شود (Kulkarni et al., 2014)، سطوح مختلف هیومیک اسید منجر به کاهش تاثیر سطوح مختلف تنش کمبود آب بر عملکرد و وزن دانه شد. بنابراین، مصرف هیومیک اسید به‌صورت محلول‌پاشی در شرایط کمبود آب به‌صورت مکمل عمل کرده و با مرطوب نگه داشتن ناحیه ریزوسفر (Zhang and Meng, 2014) و تامین مواد غذایی کافی برای گیاه (Sun et al., 2013) منجر به افزایش وزن دانه و تعداد کپسول در بوته شد (جدول ۴). بر اساس یک

زراعی با عملکرد تیمار سه بار محلول‌پاشی در ۵۰ درصد ظرفیت زراعی (۹۵۷ کیلوگرم در هکتار) تفاوت معنی‌دار نداشت. پس می‌توان گفت طبق نتایج این تحقیق، هیومیک اسید اثر مثبت بر عملکرد دانه کرچک (جدول ۴) تحت تنش کمبود آب داشته است. به نظر می‌رسد سطوح مختلف هیومیک اسید با فراهم کردن عناصر غذایی (Wang et al., 2014) منجر به افزایش عملکرد شد. بنابراین، افزایش عملکرد تحت تاثیر هیومیک اسید در این تحقیق طبیعی به نظر می‌رسد. روند افزایش در اجزای عملکرد کرچک نظیر وزن صد دانه و تعداد کپسول در بوته تحت تنش کمبود آب در پاسخ به هیومیک اسید ممکن است مرتبط با افزایش میزان کلروفیل، تغییرات در مواد معدنی و نقش حفاظتی غشاها باشد که تحمل گیاه را در برابر آسیب اکسیداتیو افزایش می‌دهد (Hoekman et al., 2012). پس می‌توان گفت هیومیک اسید از طریق اثرات مثبت فیزیولوژیکی از جمله افزایش متابولیسم درون سلول‌ها و همچنین بالا بردن میزان آنتی‌اکسیدانت‌ها در برگ‌ها، سبب ماندگاری بیشتر آنها شده، در نتیجه بر میزان عملکرد تولیدی در گیاه افزوده می‌شود. بیشترین وزن صد دانه و تعداد کپسول در بوته در تیمار سه بار محلول‌پاشی هیومیک اسید به ترتیب ۲۶/۹۱ گرم و ۲۹۲/۴۰ عدد در سطح ۸۰ درصد ظرفیت زراعی به‌دست آمد که نسبت به تیمار بدون محلول‌پاشی با هیومیک اسید (۲۲/۱۳ گرم و ۲۳۰/۱۱) ۱۷/۸ و ۲۱/۱ درصد افزایش داشت. وزن صد دانه و تعداد کپسول در بوته در شرایط سه‌بار محلول‌پاشی در تیمار ۶۵ درصد ظرفیت زراعی به ترتیب (۲۲/۷۴ گرم و ۲۱۴/۴۹ عدد) و ۵۰ درصد ظرفیت زراعی (۲۰/۸۴ گرم و ۱۷۶/۵۱ عدد) بود، به‌طوری‌که در این تیمار وزن

و از ۲۱۵/۷۸ به ۳۹۰/۴۸ واحد بر گرم پروتئین برگ در ۵۰ درصد ظرفیت زراعی رسید. به نظر می‌رسد مقادیر مختلف هیومیک اسید، با بهبود رشد ریشه منجر به کاهش تلفات آب شده (Kulkarni *et al.*, 2014) و موجب بهبود کارایی سطوح آبیاری مورد بررسی گردید به طوری که افزایش میزان سوپر اکسید دیسموتاز و کاتالاز در شرایط کمبود آب در مقادیر بیشتر هیومیک اسید عمدتاً به توسعه ریشه مربوط می‌شود. توسعه ریشه می‌تواند به دلیل کاهش تخریب ساختارهای تولید کننده دیسموتاز و کاتالاز باشد. هنگامی که گیاه در معرض کمبود آب قرار می‌گیرد میزان آنی اکسیدانت‌ها با توجه به میزان مقاومت گیاه افزایش می‌یابد، این روند می‌تواند با وجود Na^+ در ریزوسفر، تشدید شود (Hayyan *et al.*, 2013). با افزایش میزان هیومیک اسید، سیستم آنی اکسیدان گیاه فعال تر شده و با افزایش فعالیت آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز و کاتالاز به عنوان اولین سد دفاعی در حمله رادیکال‌های اکسیژن، در مقابل خسارات ناشی از تنش کمبود آب، گیاه را وادار به مقاومت می‌نماید (Halek *et al.*, 2013) و تا زمانی که گیاه قادر به مهار حجم سوپراکسید تولید شده باشد، این فرآیند ادامه دارد. می‌توان گفت هیومیک اسید، سوپر اکسید دیسموتاز و کاتالاز را که آنزیم‌های تبدیل کننده پراکسید هیدروژن به آب و اکسیژن مولکولی هستند، در شرایط کم آبی در برگ‌ها و ریشه افزایش می‌دهد (Tsanaktsidis *et al.*, 2013). افزایش آنی اکسیدانت‌ها تحت تاثیر هیومیک اسید (جدول ۴) گویای این حقیقت است که هیومیک اسید موجب تولید سریع تر سوپر اکسید دیسموتاز و کاتالاز از پیش ماده خود (سوپر اکسید و یک پپتید بنام دیسموتاز و پور فیبرین در مورد کاتالاز)، به عنوان

فرضیه هیومیک اسید، نفوذ پذیری غشاهای سلولی را افزایش داده و بدین طریق ورود پتاسیم را تسهیل می‌کند که نتیجه آن افزایش فشار داخل سلولی و تقسیم سلول است. از طرف دیگر افزایش انرژی در داخل سلول منجر به افزایش تولید کلروفیل و میزان فتوسنتز خواهد شد. به دنبال آن یک عامل مهم در رشد یعنی جذب نیتروژن به سیله آنی اکسیدانت‌ها به درون سلول تشدید می‌گردد و تولید رادیکال آزاد اکسیژن کاهش می‌یابد که در نهایت این اثرات منجر به افزایش تولید می‌شود (Nurdin *et al.*, 2014). در یک پژوهش، تاثیر هیومیک اسید بر ویژگی‌های کمی و کیفی کرچک در شرایط کمبود آب بررسی و گزارش شد ۳ مرتبه محلول پاشی از طریق افزایش ظرفیت نگهداری آب، رشد سریع و مطلوب ریشه و تهویه بهتر محلول خاک، باعث بهبود وزن دانه کرچک شد (Borugadda and Goud, 2014). به نظر می‌رسد محلول پاشی با هیومیک اسید از طریق توسعه ریشه کارایی مصرف آب را افزایش داده و با برقراری برهمکنش مناسب با فعالیت آنزیم‌های آنی اکسیدانت منجر به افزایش توانایی گیاه در مقابله با تنش کمبود آب می‌شود (Tseng and Lin, 2012). بر اساس نتایج جدول ۴، دو و سه بار محلول پاشی به ترتیب باعث افزایش ۳۸/۸ (۷۷۰/۳۶) واحد بر گرم پروتئین برگ) و ۲۷/۶ درصدی (۸۰۲/۸۵) واحد بر گرم پروتئین برگ) نسبت به تیمار عدم محلول پاشی با هیومیک اسید به ترتیب در تیمارهای ۶۵ و ۵۰ درصد ظرفیت زراعی (۴۷۱/۴۹ و ۵۸۹/۱۳) واحد بر گرم پروتئین برگ) در سوپر اکسید دیسموتاز و در مورد کاتالاز از ۱۸۰/۱۸ در تیمار عدم محلول پاشی به ۲۹۰/۰۵ واحد بر گرم پروتئین برگ در دو بار محلول پاشی

آنها با پروتئین‌ها افزایش یافت. محلول‌پاشی با هیومیک اسید سبب تسریع این روند شده و در نتیجه آسیب‌های ناشی از تنش کم آبی کاهش می‌یابد (Campanella et al., 2015). اثر مثبت هیومیک اسید در گیاه تحت شرایط تنش کمبود آب گزارش شده است که به نقش آن در افزایش جذب عناصر غذایی، توانایی فتوسنتز، رشد و افزایش گلوکاتایون پراکسیداز نسبت داده شده است (Shah et al., 2014). ممانعت گلوکاتایون پراکسیداز از پیشرفت آسیب سلول به‌وسیله هیومیک اسید در پاسخ به رادیکال‌های آزاد اکسیژن در شرایط کم آبی فرضیه‌ای است که تاثیر مثبت این ترکیب در گیاهان مواجه شده با تنش خشکی را نشان می‌دهد (Rengasami et al., 2014).

این فرضیه با استفاده از مقادیر کمتر هیومیک اسید (یک‌بار محلول‌پاشی) در برگ گیاهان کرچک مورد تایید قرار گرفته است. در یک پژوهش مشخص شد هیومیک اسید اثرات مضر کمبود آب را به‌وسیله گلوکاتایون احیاء شده کاهش داده و اثر مفیدی روی رشد و فتوسنتز اعمال کرده است (Buasri et al., 2012). مقاومت به کمبود آب از طریق افزایش مقاومت غشاء، قابلیت هضم بیشتر رادیکال‌های آزاد اکسیژن، یعنی از طریق مکانیسم‌هایی که منجر به افزایش میزان آنتی‌اکسیدان‌های سیتوپلاسمی می‌شود، حاصل می‌گردد (Kemthong et al., 2012). گلوکاتایون پراکسیداز در کاهش پیشرفت علائم تنش شرکت می‌کند، این آنزیم همچنین برای فرآیند سازش و القای تحمل به تنش مورد نیاز می‌باشد به‌طوری که اکثر تنش‌های غیرزیستی، غلظت گلوکاتایون پراکسیداز را در گیاه افزایش می‌دهند که به نقش آن در پیام‌رسانی تنش اشاره دارد (Nurdin et al.,

یک عامل حفاظتی دخالت نموده و باعث کاهش اثرات کمبود آب گردیده است (Pullen et al., 2012). پس می‌توان گفت بین سوپر اکسید دیسموتاز، کاتالاز و گلوکاتایون پراکسیداز یک ارتباط مثبت وجود دارد به‌طوری‌که، وقتی میزان فعالیت کاتالاز و سوپر اکسید دیسموتاز به‌ترتیب به ۳۰۰ و ۵۰۰ واحد بر گرم پروتئین برگ می‌رسد اثر مضاعف بر فعالیت گلوکاتایون پراکسیداز داشته و هضم رادیکال‌های آزاد اکسیژن توسط این آنزیم را افزایش می‌دهد (Rengasami et al., 2014) و این شرایط می‌تواند توسط هیومیک اسید تشدید شده و میزان گلوکاتایون پراکسیداز را به حدود ۱۶ واحد بر گرم در پروتئین برگ در شرایط آبیاری در ۵۰ درصد ظرفیت زراعی برساند (جدول ۴). گلوکاتایون پراکسیداز به‌طور معنی‌داری تحت تاثیر اثر متقابل هیومیک اسید و کمبود آب قرار گرفت (جدول ۳). کمترین میزان گلوکاتایون پراکسیداز در تیمارهای بدون محلول‌پاشی با هیومیک اسید به‌ترتیب در تیمارهای ۵۰، ۶۵ و ۸۰ ظرفیت زراعی ۳/۷۸، ۸/۰۲ و ۹/۴۴ واحد بر گرم پروتئین برگ بود ولی با افزایش مقدار هیومیک اسید مقدار آن افزایش پیدا کرد و میزان آن در شرایط سه بار محلول‌پاشی به ۷/۳۸، ۱۲/۲۹ و ۱۶/۰۴ واحد بر گرم پروتئین برگ به حداکثر رسید (جدول ۴). نتایج به‌دست آمده با نتایج تحقیقات (Salimon et al., 2012) مطابقت دارد. با توجه به نتایج آزمایش، کاربرد هیومیک اسید در همه سطوح تنش کمبود آب میزان گلوکاتایون پراکسیداز را افزایش داد، ضمن اینکه افزایش دفعات محلول‌پاشی تاثیر مثبت بیشتری در بهبود روابط متقابل عوامل مورد بررسی داشت (جدول ۴). در یک تحقیق در کرچک در شرایط تنش کمبود آب، تولید آنتی‌اکسیدان‌ها به‌واسطه جلوگیری از اتصال

اسیدیتته بالای خاک، کارایی آنزیم‌های آنتی اکسیدانت افزایش یافته و محلول پاشی این عناصر پاسخ گیاه را در پی داشته است و با افزایش کارایی جذب آب تاثیر محسوسی بر گیاه داشت. لذا استفاده از اسید هیومیک در خاک‌هایی با شرایط مشابه و در راستای اهداف کشاورزی پایدار می‌تواند مناسب باشد. به‌طورکلی، نتایج این پژوهش نشان داد که استفاده از هیومیک اسید ضمن کاهش آسیب‌ها و صدمات ناشی از کمبود آب، ظرفیت آنتی اکسیدانی را بالا برده و در شرایط سخت می‌تواند موجب افزایش عملکرد شود.

افزایش میزان آنزیم‌های آنتی اکسیدانت با شدت گرفتن تنش کمبود آب و تحت تاثیر هیومیک اسید در جدول ۴ عمدتاً به همین عامل مربوط می‌شود.

نتیجه‌گیری نهایی

محلول پاشی هیومیک اسید در همه سطوح دارای تاثیر مثبت بر همه صفات مورد بررسی بود. هیومیک اسید نه تنها تحمل گیاه به کم آبی را از طریق تاثیر مثبت بر آنزیم‌های آنتی اکسیدانت افزایش داد، بلکه در این شرایط ویژگی‌های کمی گیاه مانند عملکرد دانه و وزن صد دانه را نیز بهبود بخشید. به نظر می‌رسد هیومیک اسید در

جدول ۱- ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی خاک مورد آزمایش

Table 1- Physical and chemical traits in experimented soil

O.M %	N %	P mg / kg	K mg / kg	Fe mg / kg	Mn mg / kg	Cu mg / kg	Zn mg / kg	Mg meq/l	Ca meq/l	pH	EC ds.m	Soil texture	Soil depth (cm)
3.44	0.172	16	392	7.24	5.72	0.64	1.96	10	40	7.35	1.37	Silty loam	0-30

جدول ۲- مشخصات هیومیک اسید مورد استفاده در آزمایش

Table 2- Useable humic acid traits in experiment

نام شرکت Name of organization	Organic N%	P%	K%	Fe%	Mn%	Cu%	Zn%	Mg%	pH	Humic acid%
Humi Tech Germany	5	4	3	0.35	0.24	0.17	0.28	0.18	6.85	80

جدول ۳- تجزیه واریانس صفات مورد نظر

Table 3- Analysis of variance in studied traits

منابع تغییرات Source of variation	درجه آزادی df	گلو تاتیون پر اکسیداز Glutathione peroxidase	سوپر اکسید دیسموتاز Superoxide dismutase	کاتالاز Catalase	تعداد کیسول در بوته Capsule per plant	وزن صد دانه 100 Seed weight	عملکرد دانه Seed yield
تکرار Replication	3	0.795 ^{ns}	0.526 ^{ns}	0.871 ^{ns}	0.790 ^{ns}	0.721 ^{ns}	0.943 ^{ns}
تنش Stress	2	6791.11 ^{**}	4812.77 ^{**}	3571.25 ^{**}	7944.38 ^{**}	7498.25 ^{**}	3159.44 ^{**}
خطا Error	6	105.32	78.65	245.76	91.89	112.28	48.52
محلول پاشی Humic acid foliar	3	8502.46 ^{**}	9660.57 ^{**}	5788.39 ^{**}	12876.37 ^{**}	13441.56	25740.71 ^{**}
محلول پاشی × تنش Stress × foliar	6	4647.31 ^{**}	2871.99 ^{**}	2363.11 ^{**}	3918.66 ^{**}	4899.81 ^{**}	1445.38 ^{**}
خطا Error	27	7.52	6.69	94.33	48.51	4.85	5.79
ضریب تغییرات (درصد)		5.44	6.27	5.89	6.95	5.97	4.79

ns و **: به ترتیب غیر معنی دار و معنی دار در سطح ۱٪

ns and **: Not-significant and significant at 1% probability level respectively

جدول ۴- مقایسه میانگین اثر متقابل کمبود آب × کاربرد هیومیک اسید بر صفات مورد مطالعه کرچک

Table 4- Mean comparisons the effect of water deficit × humic acid application on castor studied traits

تنش کمبود آب Water deficit stress	محلول پاشی با هیومیک اسید Humic acid foliar	عملکرد دانه Seed yield (kg/ha)	وزن صد دانه 100 seed weight (g)	تعداد کیسول در بوته Capsule per plant	کاتالاز Catalase unit/gr pro	سوپر اکسید دیسموتاز SOD unit/gr pro	گلو تاتیون پر اکسیداز GPX unit/gr pro
آبیاری در ۸۰ درصد ظرفیت زراعی Irrigation at 80% of field capacity (S1)	بدون محلولپاشی Control	956bc	22.13bc	230.11ab	136.45d	235.42e	3.78f
	F ₁	1170b	23.96b	243.34ab	150.14d	280.11de	5.02de
	F ₂	1310ab	25.18b	261.65a	173.89cd	352.05d	6.25d
	F ₃	1420a	26.91a	292.40a	202.78bc	424.26cd	7.38cd
آبیاری در ۶۵ درصد ظرفیت زراعی Irrigation at 65% of field capacity (S2)	بدون محلولپاشی Control	719cd	17.52d	170.24bc	180.18cd	471.49cd	8.02cd
	F ₁	894c	19.27cd	181.77b	209.43bc	594.27bc	9.79c
	F ₂	1020bc	20.49c	195.36b	247.91b	702.48b	10.84bc
	F ₃	1190b	22.74bc	214.49ab	290.05ab	770.36ab	12.29b
آبیاری در ۵۰ درصد ظرفیت زراعی Irrigation at 50% of field capacity (S3)	بدون محلولپاشی Control	589de	15.78e	130.68cd	215.78bc	589.13bc	9.44d
	F ₁	702cd	16.97de	143.85c	249.55b	653.99b	11.96bc
	F ₂	846c	18.02d	160.78bc	308.12ab	738.91ab	13.81b
	F ₃	957bc	20.84c	176.51bc	379.48a	802.85a	16.04a

یکبار محلول پاشی F₁ One time foliar F₁ دو بار محلول پاشی F₂ Two time foliar F₂ سه بار محلول پاشی F₃ Three time foliar F₃

در هر ستون میانگین‌هایی که دارای حروف مشابه نیستند بر اساس آزمون دانکن (α=0.05) با همدیگر اختلاف معنی دار دارند.

Means in each column followed by different letter (s) are significantly different at 5% probability level, using Duncan's Test.

References

منابع مورد استفاده

- Birla, A., B. Singh, S.N. Upadhay, and Y.C. Sharma. 2012. Kinetics studies of synthesis of biodiesel from waste frying oil using a heterogeneous catalyst derived from snail shell. *Bioresource Technology*. 106: 95-100.
- Borugadda, V.B., and V.V. Goud. 2014. Thermal, oxidative and low temperature properties of methyl esters prepared from oils of different fatty acids composition: A comparative study. *Thermo Chimica Acta*. 577: 33- 40.
- Buasri, A., N. Chaiyut, and V. Loryuenyong. 2012. Transesterification of waste frying oil for synthesizing biodiesel by KOH supported on coconut shell activated carbon in packed bed reactor. *Science Asia*. 38: 283-288.
- Campanella A, C. Fontanini, and M.A. Baltanas. 2015. High yield incorporate with humic acid and water deficit generated in castor. *Chemistry engineering Journal*. 170: 280-289.
- Dazy, M., J. Ferard, and J. Masfarraud. 2008. Ecological recovery of vegetation on a coke-factory soil: Role of plant antioxidant enzymes and possible implication in site restoration. *Chemosphere*. 74: 57-63.
- Endalew, E.K., Y. Kiros, and R. Zanzi. 2011. Heterogenous catalysis for biodiesel production from *Jatropha curcas* oil. *Energy*. 36(5): 2693-2700.
- Halek, F., A. Delavari, and A. Kavousi-rahim. 2013. Production of biodiesel as a renewable energy source from castor oil. *Clean Technology Environment*. 15: 1063-1068.
- Hayyan, A., M.A. Hashim, M.E. Mirghani, M. Hayyan, and I.M.A. Nashef. 2013. Esterification of sludge palm oil using trifluoromethane sulfonic acid for preparation of biodiesel fuel. *Korean Journal Chemistry Engineering*. 30(6): 1229-1234.
- Hincapie, C.S.G., F. Mondragon, and D. Lopez. 2011. Conventional in situ transesterification of castor seed oil for biodiesel production. *Fuel*. 90: 1618-1623.
- Hoekman, S.K., A. Broch, C. Robbins, E. Cenicerros, and M. Natarajan. 2012. Review of biodiesel composition, properties, and specifications. *Renew Sustainable Energy Revolution*. 16: 143-169.
- Jumat, S., S. Nadia, and E. Yousif. 2012. Synthesis and characterization of esters derived from ricinoleic acid and evaluation of their low temperature property. *Sains Malaysiana*. 41: 1239-1244.
- Kamalakar, K., A.K. Rajak, R.B.N. Prasad, and M.S.L. Karuna. 2013. Rubber seed oil based biolubricant basestocks: A potential source for hydraulic oils. *Industrial Crops Production*. 51: 249-257.
- Kemthong, P., C. Luadthong, and W. Nualpaeng. 2012. Industrial eggshell waste as the heterogenous catalyst for microwave-assisted biodiesel production. *Catalyst Today*. 190: 112-116.

- Kulkarni, V.V., K. Sivakumar, A.P. Singh, and P. Visha. 2014. Yield and quality characteristics of rendered chicken oil for biodiesel production. *Journal Oil Chemistry Sociality*. 91: 133- 141.
- Lee, D.H., and Y.S. Kim. 2001. The inductive response of the antioxidant enzymes by water deficit stress and selenium in C₄ plants. *Plant Physiol*. 770: 151-174.
- Mgunis, L.L., R. Meijboom, and K. Jalama. 2012. Biodiesel production over nano-MgO supported on titania. *World of Academy of Science Engineering and Technology*. 64: 894- 898.
- Nurdin, S., F.A. Misebah, S.F. Haron, N.S. Ghazali, and J. Gimnun. 2014. A cost effective catalyst for biodiesel synthesis from *Rubber* and *Jatropha curcas* seeds oil. *Chemical Engineering and Applications*. 5(6):483-488.
- Okullo, A., A.K. Temu, P. Ogwok, and N. Talikwa. 2012. Physico-chemical properties of biodiesel from *Jatropha* and Castor oil. *Renewable Energy Research*. 2: 47-52.
- Paglia, D.E., and W.N. Valentine. 1987. Studies on quantitative and qualitative traits of glutathione peroxidase. *Journal Lab Medical*. 70: 158-165.
- Pullen, J., and K. Saeed. 2012. An overview of biodiesel oxidation stability. *Renew Sustainable Energy*. 16: 5924-5950.
- Rengasami, M., S. Mohanraj, S.H. Vardhan, and V. Pugalenti. 2014. Trans esterification of castor oil using nano-sized iron catalyst for the production of biodiesel. *Chemical and Pharmaceutical Sciences*. 2: 108-112.
- Salimon, J., N. Salih, and E. Yousif. 2012. Biolubricant basestocks from chemically modified ricinoleic acid. *Journal of King Saudi University*. 24: 11-17.
- Semwal, S., A.K. Arora, R.P. Badoni, and D.K. Tuli. 2011. Biodiesel production using heterogenous catalyst. *Bio resource Technology*. 102(3): 2151-2161.
- Shah, B., S. Sulaimana, P. Jamal, and M.S. Alam. 2014. Production of heterogenous catalysts for biodiesel synthesis. *Chemistry and Environment Engineering*. 5(2): 73-75.
- Siddharth, J., and M.P. Sharma. 2010. Review of different test methods for the evaluation of stability of biodiesel. *Renew Sustainable Energy Revolution*. 14: 1937-1947.
- Sun, Y., P. Dailey, and S. Deng. 2013. Optimization of biodiesel production from palm oil under supercritical ethanol conditions using hexane as cosolvent: A response surface methodology approach. *Fuel*. 107: 633-640.
- Tabrizi, A.A., G. Nour Mohammadi, and H.R. Mobasser. 2015. Effects of different cropping systems on fertility of paddy soil. *Journal of Crop Ecophysiology*. 9(2): 191-202. (In Persian).

- Tsanaktsidis, C.G., S.G. Christidis, and E.P. Favvas. 2013. A novel method for improving the physicochemical properties of diesel and jet fuel using polyaspartate polymer additives. *Fuel*. 104: 155-162.
- Tseng, J.M., and C.P. Lin. 2012. Prediction of incompatible reaction of dibenzoyl peroxide by isothermal calorimetry analysis and green thermal analysis technology. *Thermal Anal Calorimetric*. 107: 927-933.
- Wang, J., L. Cao, and S. Han. 2014. Effect of polymeric cold flow improvers on flow properties of biodiesel from waste cooking oil. *Fuel*. 117: 876-881.
- Zhang, J., and Q. Meng. 2014. Preparation of KOH/CaO/C supported biodiesel catalyst and application process. *World Journal of Engineering and Technology*. 2: 184-191.

Effect of Humic Acid on Activity of Antioxidant Enzymes and Yield of Castor Bean (*Ricinus communis*) under Water Deficit Condition

Mohammad Reza Dadnia^{1*}

Received: May 2016, Revised: 2 September 2016, Accepted: 3 May 2017

Abstract

To evaluate the effect of humic acid on activity of antioxidant enzymes in castor bean a split plot experiment based on completely randomized block design with four replications was carried out at Islamic Azad University, Karaj Branch in 2014. Treatments were irrigation with three levels [irrigation at 80% of field capacity (S₁) (normal), irrigation at 65% of field capacity (S₂) (mid stress) and irrigation at 50% of field capacity (S₃) (high stress)] assigned to main plots and humic acid with four levels (without foliar application, one time, twice and three times foliar application) to sub plots. In this study traits like seed yield, 100 seed weight and antioxidant enzymes were estimated. The results showed that the effect of humic acid was significant at 1% level on 100 seed weight and activity of antioxidant enzymes. Mean comparisons indicate that foliar application of humic acid could compensate relative effect of water deficit. It was also revealed that the rate of superoxide dismutase, glutathione peroxidase and catalase were increased with three times of humic acid foliar applications by 38.8, 34.75 and 37.88 percent under mid stress drought and 26.63, 41.15 and 43.14 percents under high stress drought as compared to control, respectively. Overall, it can be said that use of humic acid have different physiological effects. Humic acid not only increases seed yield of castor bean it also have a positive role in reducing water deficit effects and increasing activity of antioxidant enzymes.

Key words: Castor bean, Catalase, Glutathione peroxidase, Humic acid, Superoxide dismutase, Water deficit.

1- Assistant Prof., Department of Agronomy, Ahvaz Branch, Islamic Azad University, Ahvaz, Iran

* *Corresponding Author:* rezadadnia@yahoo.com