نشریه فیزیولوژی محیطی گیاهی، سال پانزدهم، شماره ۵۷، بهار ۱۳۹۹ / صفحات: ۵۲-۳۹

ارزیابی فعالیت آنتی‌اکسیدانی و خصوصیات بیوشیمیایی گیاه دارویی شنبلیله (*Trigonella foenum- graecum* L.) در واکنش به سولفات آهن و بیوپتاس تحت تنش خشکی

محمدحسین امینی‌فرد[1*]، حمیرا قادری‌زه[2]، حسن بیات[1]، علیرضا صمدزاده[3]

[1]گروه آموزشی علوم باغبانی و مرکز پژوهشی گیاهان ویژه منطقه دانشکده کشاورزی، دانشگاه بیرجند، بیرجند، ایران

[2]گروه علوم باغبانی، گرایش فیزیولوژی گیاهان دارویی، ادویه‌ای و عطری، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بیرجند، بیرجند، ایران

[3]گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بیرجند، بیرجند، ایران

تاریخ دریافت: ۹۷/۱۱/۲۳ تاریخ پذیرش: ۹۸/٤/٤

چکیده

به‌منظور ارزیابی فعالیت آنتی‌اکسیدانی و خصوصیات بیوشیمیایی شنبلیله در واکنش به سولفات آهن و بیوپتاس تحت شرایط تنش خشکی، آزمایشی، به صورت صورت کرت‌های خرد شده در قالب فاکتوریل بر پایه بلوک‌های کامل تصادفی انجام شد. تیمارها شامل: تنش خشکی (شامل آبیاری نرمال به عنوان عدم تنش و قطع آبیاری در اوایل گلدهی و میوه‌دهی به‌مدت ۱۴ روز به‌عنوان تنش خشکی) به‌عنوان عامل اصلی و تیمارهای کودی بیوپتاس (۰ و ۵ کیلوگرم در هکتار) و سولفات آهن (۰ و ۱/۵ در هزار) به عنوان عوامل فرعی در نظر گرفته شدند. نتایج نشان داد که تنش خشکی، بیوپتاس و سولفات آهن و برهمکنش آنها بر میزان صفات آنتوسیانین، ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی معنی‌دار گردید، بطوریکه بالاترین میزان آنتوسیانین شنبلیله از تیمارهای ۵ کیلوگرم بیوپتاس و ۱/۵ در هزار سولفات آهن در شرایط تنش خشکی و کمترین میزان آنها در شاهد و تحت شرایط تنش بدست آمد. همچنین در شرایط تنش خشکی، ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی شنبلیله افزایش یافت، بطوری‌که بیشترین میزان ترکیبات فلاونوییدی شنبلیله در شرایط تنش خشکی و از تیمارهای ۵ کیلوگرم بیوپتاس و ۱/۵ در هزار سولفات آهن حاصل گردید. اثر متقابل تنش خشکی و سولفات آهن هم بر فعالیت آنتی‌اکسیدانی گیاه معنی‌دار شد، بطوری‌که بیشترین میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی با میزان ۶۲/۸ درصد در شرایط تنش خشکی و تیمار سولفات آهن ۱/۵درهزار مشاهده گردید. همچنین بیشترین مقدار قندهای محلول شنبلیله در تنش خشکی و در تیمار ۵ کیلوگرم بیوپتاس و کمترین مقدار این صفت در شرایط عدم تنش بدست آمد. نتایج نیز نشان داد که بیشترین میزان کلروفیل کل شنبلیله در شرایط عدم تنش خشکی و درتیمارهای کودی ۵ کیلوگرم بیوپتاس و سولفات آهن ۱/۵ درهزار بدست آمد. بر اساس نتایج این آزمایش، استفاده از تنش خشکی، نقش موثری در افزایش محتوی فنلی، فلاونییدها، آنتوسیانین و قندهای محلول شنبلیله داشت و همچنین کاربرد کود زیستی بیوپتاس و سولفات آهن، صفات بیوشیمیایی شنبلیله را بهبود بخشید.

واژه‌های کلیدی: متابولیت‌های ثانویه، کربوهیدرات، شنبلیله، شاخص‌های بیوشیمیایی

*نویسنده مسئول: mh.aminifard@birjand.ac.ir

مقدمه

تمایل به تولید گیاهان دارویی و معطر و تقاضا برای این محصولات به‌خصوص در شرایط اکولوژیک در جهان رو به افزایش می‌باشد (Alizadeh, 2002). شنبلیله با نام علمی *Trigonella foenum- graecum* گیاهی علفی یکساله متعلق به خانواده لگوم‌ها و یکی از گیاهان دارویی ارزشمند است که دانه و قسمت‌های هوایی آن قرن‌ها به‌عنوان منبع ارزشمندی از پروتئین در تغذیه انسان و دام در طب سنتی برای درمان سل مورد مصرف بوده است.اثرات درمانی زیادی ازجمله اثر ضد درد، ضدالتهاب، ضدنفخ، ضدسرطان، پایین آورنده قندخون، افزایش دهنده میل جنسی، قابض، مقوی قلب، صفرا آور، ملین، کاهش دهنده کلسترول خون، کاهش‌دهنده چربی‌خون، شیرافزایی، مسهل، مقوی رحم از این گیاه گزارش شده است (Altuntas et al., 2005).

خشکی از جمله تنش‌های فیزیکی است که به عنوان مهم‌ترین عامل محدودکننده رشد و تولید گیاهان زراعی در اکثر نقاط جهان و ایران شناخته شده است (Alizadeh, 2002). ایران از نظر موقعیت جغرافیایی در کمربند بیابانی جهان واقع شده است و منطقه‌ای خشک و نیمه‌خشک به‌شمار می‌رود (Talebi et al., 2006). تنش خشکی معمولاً باعث ایجاد تنش اکسیداتیو می‌شود این فرآیند از طریق بسته شدن دریچه روزنه‌ای، واقع می‌گردد، که باعث کاهش شدید عمل زنجیره الکترونی فتوسنتزی و افزایش تشکیل انواع اکسیژن فعال در کلروپلاست‌ها و میتوکندری‌ها می‌شود. انواع اکسیژن‌های فعال می توانند بوسیله آسیب‌های اکسیداتیو به چربی‌ها، پروتئین‌ها، اسیدهای نوکلئیک، آنزیم‌ها و رنگیزه‌های فتوسنتزی، متابولیسم‌های طبیعی گیاه را تخریب نمایند (Salehi Shanjani, 2005). به‌منظور غلبه برتنش اکسیداتیو، گیاهان دارای مکانیسم‌های دفاعی آنتی‌اکسیدانی آنزیمی و غیرآنزیمی می‌باشند تا انواع اکسیژن فعال را از بین ببرند. پراکسیدازها و پلی فنل اکسیدازها از مهمترین آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان‌ها هستند (Salehi Shanjani, 2005) و کارتنوئیدها، آنتی‌اکسیدان‌های غیرآنزیمی هستند که می‌توانند انواع اکسیژن فعال را از بین ببرند و از کمپلکس‌های فتوسنتزی حفاظت نماید (Krizek et al., 1997).

همچنین میزان کلروفیل در گیاهان زنده، یکی از فاکتورهای مهم حفظ ظرفیت فتوسنتزی است (Jiang and Huang, 2001). نتایج Kamrova و همکاران (۲۰۱۷) نشان داد که خشکی یک عامل محدود کننده در رشد گیاه بوده و باعث کاهش غلظت کلروفیل کل، aو b در تیمارهای مختلف در سویا شده است. گزارش شده است که تولید فلاونوئیدها در گیاه انیسون با افزایش تنش خشکی افزایش می یابد (Asadi Kavan et al., 2010). تحقیقات نشان داده است قندهای محلول به عنوان محافظت کننده‌های اسمزی، در تنظیم اسمزی سلول نقش دارند در پاسخ به تنش‌های محیطی تجمع می‌یابند (Tajmmlian et al., 2012).

گزارش شده است کودهای زیستی و یا کودهای شیمیایی به تنهایی برای تولید پایدار محصول کشاورزی نمی‌توانند مفید واقع شوند و در اکثر موارد کودهای زیستی به عنوان مکمل کودهای شیمیایی می‌توانند پایداری تولید را در نظام‌های کشاورزی تضمین کنند (Muyayabantu et al., 2012). گیاهی که خوب تغذیه شده و به مقدارکافی عناصر دریافت کرده باشد، مقاومت طبیعی بیشتری به خشکی خواهد داشت (Kazemalilou and Rasouli-Sedghiani, 2012). عناصر کم مصرف با وجود اینکه به مقدار بسیارکم مورد نیاز گیاهان هستند ولی نقش‌های برجسته ای در رشد و نمو گیاهان به عهده دارند که از آن جمله می‌توان به نقش آنها در فعالیت‌های آنزیمی، رشد،

تمایز سلولی، تشکیل گل، میوه و بهبود کیفی گیاه اشاره کرد (Ghorbanpour, 2015). یکی از این عناصر آهن می باشد. کمبود آهن باعث توقف رشد برگ، تقسیم سلولی، کاهش میزان کلروفیل و سیتوکروم می‌گردد (Marschner, 1995).

علاوه برعناصر کم مصرف، کودهای زیستی در برخی موارد به‌عنوان جایگزین کودهای شیمیایی می‌توانند کاربرد فراوان داشته باشند (Han et al., 2006). کودهای زیستی متشکل از میکروارگانیسم‌های مفیدی هستند که هر یک به منظور خاصی مانند تثبیت ازت، رهاسازی یون‌های فسفات، پتاسیم، آهن و غیره تولید می‌شوند. (Wu et al.,2005). شایان ذکر است که کودهای زیستی موجب افزایش مقاومت گیاهان نسبت به تنش نیز می گردند. در این راستا گزارش شده است که تلقیح بذور گیاه بنگدانه با باکتری‌های سودوموناس فلورسنت سبب افزایش میزان کلروفیل b گردید (Kazemalilou and Rasouli-Sedghiani, 2012).

با توجه به اهمیت زراعت و تولیدگیاهان دارویی و معطر و کمبود آب آبیاری و بارش سالانه در مناطق مختلف کشور، هدف از اجرای این طرح، مطالعه و ارزیابی تأثیرکود زیستی بیوپتاس و عنصر کم مصرف آهن بر فعالیت آنتی اکسیدانی و صفات بیوشیمیایی گیاه دارویی شنبلیه تحت شرایط تنش خشکی می‌باشد، که تاکنون تحقیق مشخصی در این زمینه صورت نگرفته است، تا بتوان در جهت تولید پایدار و افزایش کیفیت این گیاه دارویی مهم گام برداشت.

مواد و روش‌ها

این آزمایش در سال زراعی ۱۳۹۶ در مزرعه تحقیقاتی دانشکده کشاورزی دانشگاه بیرجند به صورت کرتهای خرد شده در قالب فاکتوریل بر پایه بلوک‌های کامل تصادفی با سه تکرار انجام شد. تیمارها شامل: تنش خشکی در دو سطح (شامل آبیاری نرمال به‌عنوان عدم تنش و قطع آبیاری در اوایل گلدهی و اوایل میوه دهی هر کدام به مدت ۱۴ روز به‌عنوان تنش خشکی) به‌عنوان عامل اصلی در نظر گرفته شد و تیمارهای کودی بیوپتاس (۰ و ۵ کیلوگرم در هکتار) و سولفات آهن (۰ و ۱/۵ در هزار) به‌عنوان عامل فرعی در نظر گرفته شدند.

قبل از کشت جهت تعیین خصوصیات فیزیکی و شیمیایی خاک مزرعه، از عمق صفر تا ۳۰ سانتی متری نمونه برداری مرکب شد (جدول ۱). به منظور انجام آزمایش، پس از عملیات شخم، دیسک و مسطح کردن خاک، کرت‌هایی به ابعاد ۲ × ۲ متر ایجاد گردید. کشت به صورت خطی در ۵ اردیبهشت سال ۱۳۹۵ انجام گرفت. هر کرت دارای ۵ ردیف کاشت که فاصله کاشت بین ردیف‌ها ۲۰ سانتی‌متر و فاصله روی ردیف‌ها ۱۰ سانتیمتر و در عمق کاشت ۱ تا ۱,۵ سانتیمتر در نظر گرفته شد که بعد از تنک در مرحله ۴ تا ۶ برگی، فاصله روی ردیفها اعمال گردید. آبیاری اول همزمان با کاشت (۵ اردیبهشت ۱۳۹۵به‌صورت سطحی) و آبیاری دوم، ۵ روز بعد از آبیاری اول به منظور تسهیل در سبز شدن بذرها انجام شد.

کود زیستی بیوپتاس (پتا بارور ۲) از شرکت زیست فناور سبز تهران تهیه شد. تیمار زیستی پتابارور ۲ حاوی دو باکتری حل‌کننده پتاسیم (سودوموناس) با تعداد 10^8 سلول زنده در هر گرم است که ترکیبات نامحلول پتاسیم موجود در خاک اطراف ریشه را تجزیه کرده و باعث جذب بهینه پتاسیم می‌شود. برای تلقیح بذور با کود بیوپتاس، بذور را با این مایه باکتری کود مخلوط نموده به طوری که یک پوشش کاملاً یکنواخت از این مایه‌های تلقیحی روی سطح بذور تشکیل گردید و سپس در زیر خاک قرار داده شدند. سپس جهت کارایی بالاتر کود و اطمینان بیشتر از تماس باکتری با بذرهای

کشت شده، محلول کودی نیز پس از کشت، همراه با آب آبیاری به کرتهای مربوطه اضافه شد. مرحله دوم استفاده از کود زیستی بیوپتاس در مرحله ۸ برگی همراه با آب آبیاری و مرحله سوم یک ماه بعد از مرحله دوم بود. منبع عنصر آهن، کود سولفات آهن(تهیه شده از مرک آلمان) بود که بصورت محلول پاشی از مرحله ۸ برگی تا مرحله گلدهی طی سه نوبت به فاصله ۱۴روز اعمال گردید. تنش خشکی (قطع آبیاری) در اوایل مرحله گلدهی و اوایل میوه‌دهی به‌مدت ۱۴ روز بروی گیاهان شنبلیله (تیمارهای مورد نظر) اعمال شد. بعد از اعمال تیمارها در مرحله گلدهی کامل و قبل از مرحله رسیدگی فیزیولوژیکی گیاه، از هر کرت ۱۰ بوته به‌طور تصادفی انتخاب شده و سپس نمونه‌هایی از برگ‌های توسعه یافته از ۱۰ بوته تهیه و صفات بیوشیمایی شنبلیله اندازه گیری شدند. تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها با کمک نرم افزار آماری SAS صورت پذیرفت، هم چنین میانگین‌ها توسط آزمون LSD در سطح احتمال ۵ درصد مقایسه گردیدند.

جدول ۱: خصوصیات فیزیکو شیمیایی خاک محل آزمایش

بافت خاک	هدایت الکتریکی (دسی‌زیمنس بر متر)	نیتروژن کل (درصد)	پتاسیم قابل دسترس (میلی‌گرم بر کیلوگرم)	فسفر قابل دسترس (میلی‌گرم بر کیلوگرم)	pH	مواد آلی (درصد)
لومی	۳/۱	۰/۰۶	۲۲۰/۳۵	۲۰	۷/۷۶	۰/۰۶۸

روش تهیه عصاره گیاهی: ابتدا ۱ گرم از بافت تازهٔ برگی به همراه ۱۰ میلی‌لیتر متانول ۹۵ درصد در داخل‌هاون چینی کوبیده و له شد. قسمت بالای محلول حاصله، جدا گشته و سپس محلول به‌دست آمده، در دستگاه سانتریفیوژ به‌مدت ۱۰ دقیقه با دور۳۵۰۰ قرار گرفت و بعد، فاز مایع رویی (قسمت روشناور) برداشته شده و به‌عنوان عصاره گیاهی استفاده گردید. عصارهٔ به‌دست آمده تا زمان اندازه‌گیری صفات بیوشیمایی در داخل یخچال (۴ درجه سانتی‌گراد) نگهداری شد.

فعالیت آنتی‌اکسیدانی برگ: جهت تعیین فعالیت آنتی‌اکسیدانی کل برگ شنبلیله از روش اندازه‌گیری کاهش ظرفیت رادیکالی و با کمک ۲،۲- دی فنیل ۱- پیکریل هیدرازیل (DPPH) استفاده گردید (Turkmen et al., 2005). لذا برای این منظور ۲ میلی‌لیتر از محلول اتانولی ۰/۱۵ میلی‌مولار DPPH به لوله آزمایش حاوی ۱ میلی‌لیتر عصاره برگ شنبلیله اضافه شد. سپس مخلوط حاصل به‌مدت ۳۰ ثانیه با دستگاه ورتکس مخلوط شد، بعد محلول به‌مدت ۲۰ دقیقه در تاریکی و در دمای اتاق تثبیت گردید. جذب نمونه‌ها در طول موج ۵۱۷ نانومتر با دستگاه اسپکتوفتومتر مدل (UNICO,2000,Germany) خوانده شد. سپس فعالیت آنتی اکسیدانی از رابطه ۱ محاسبه گردید

رابطه ۱:

۱۰۰× (جذب قرائت شده/ جذب نمونه شاهد) − ۱

= فعالیت آنتی‌اکسیدانی

ارزیابی میزان فنل کل برگ: عموماً برای اندازه‌گیری مقدار کل ترکیبات فنولی گیاه از روش Follin-Ciocalteu (فولین سیکالتو) استفاده می‌شود. بدین منظور، ۰/۵ میلی‌لیتر از معرف فولین سیکالتو به ۰/۵ میلی‌لیتر عصاره برگ شنبلیله و استانداردهای گالیگ اسید اضافه و سپس به محلول حاصل ۴ میلی‌لیتر سدیم کربنات یک مولار اضافه شد. پس از ۱۵ دقیقه نگهداری در دمای محیط، جذب نمونه‌ها در طول موج ۷۶۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتوفتومتر خوانده شد (Chuah et al., 2008). سپس مقدار کل

ترکیبات فنولی نمونه‌ها با استفاده از منحنی استاندارد گالیک اسید محاسبه شد پس از رسم منحنی کالیبراسیون گالیک اسید، معادله خطی منحنی به‌دست می‌آید که با قراردادن مقادیر جذب به‌دست آمده از نمونه‌ها در این معادله، غلظت معادل گالیک اسید از نمونه برگ به دست آمد و در نهایت غلظت بر حسب میلی‌گرم گالیک اسید بر گرم عصاره برگ گزارش شد.

ارزیابی میزان آنتوسیانین کل: اندازه‌گیری آنتوسیانین برگ شنبلیله به روش pH افتراقی انجام گرفت. برای این منظور از دو بافر شامل پتاسیم کلرید و کلریدریک اسید با pH =۱ و سدیم استات و کلریدریک اسید با pH = ۴/۵ استفاده شد و سپس در دو طول موج ۵۲۰ و ۷۰۰ نانومتر میزان جذب برای هر دو بافر قرائت شد میزان آنتوسیانین از رابطه ۲ محاسبه گردید (Wrosotad, 1976).

رابطه ۲

$$A = (Amax - A700nm)pH1 - (Amax - A700)\ pH4.5$$

$$\text{آنتوسیانین کل} \frac{mg}{L} = \frac{A \times MW \times DF \times 1000}{\varepsilon \times d}$$

A_{max} = جذب در طول موج ۵۱۰.

DF = درجه رقت (۱۰). ε = ۱۵۶۰۰.

M_W = وزن مولکولی پلارگونیدین ۳- گلیکوزاید: ۴۳۳/۳۹ گرم بر مول.

ارزیابی میزان فلاونوئید کل: میزان فلاونوئید کل با استفاده از معرف آلومینیوم کلرید انجام گرفت (Yoo et al., 2008). به این‌ترتیب که به ۰/۵ میلی‌لیتر از عصاره متانولی شنبلیله، ۰/۱ میلی‌لیتر از کلرید آلومینیوم ۱۰ درصد افزوده سپس ۰/۱ میلی‌لیتر استات پتاسیم ۱ میلی‌مولار افزوده و در پایان ۲/۸ میلی‌لیتر آب مقطر اضافه شد. بعد از گذشت مدت زمان ۳۰ دقیقه دردمای آزمایشگاه، جذب آنها در ۴۱۵ نانومتر اندازه گیری شد. میزان فلاونوئید از روی منحنی استاندارد کوئرستین تعیین بر حسب میلی گرم در گرم عصاره بیان شد.

اندازه‌گیری میزان کربوهیدرات‌های محلول (قند کل): جهت اندازه‌گیری قند کل برگ شنبلیله از روش آنترون استفاده شد و میزان جذب نور هر یک از نمونه‌ها در طول موج ۶۲۰ نانومتر اندازه‌گیری شد (Mocreadye et al., 1950).

اندازه‌گیری کلروفیل کل: برای اندازه‌گیری غلظت کلروفیل‌ها و کارتنوئیدها در بافت گیاهی از روش آرنون استفاده شد (Lichtenthaler, 1987). میزان جذب نور کلروفیل a،b، کارتنوئید و کلروفیل کل به‌ترتیب در سه طول موج ۶۶۳، ۶۶۴ و ۴۷۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتوفتومترمدل (UNICO Germany, 2000) اندازه‌گیری شد. محتوای کلروفیل با استفاده از فرمول‌های زیر برحسب میلی‌گرم در گرم محاسبه گردید.

$Chla$=12.7A_{663} −2.69 A_{644}

$Chlb$=22.09 A_{644}−4.68 A_{663}

Carotenoids=(1000A470−2.270 $Chla$−81.40 $Chlb$)/227

Total Cl=Chla+Chlb

نتایج

کلروفیل کل: نتایج تجزیه واریانس نشان داد که برهمکنش تنش خشکی و کود بیوپتاس تاثیر معنی‌داری بروی کلروفیل کل گیاه داشت بطوریکه، بیشترین میزان کلروفیل کل با ۵/۷۶ میلی‌گرم بر گرم در شرایط عدم تنش خشکی همراه با تیمار ۵ کیلوگرم در هکتار بیوپتاس بدست آمد (جدول ۴). با توجه به نتایج اثر متقابل تنش خشکی و تیمارهای کودی بیوپتاس و سولفات آهن بر کلروفیل کل معنی‌دار شد، به‌طوری‌که تیمارهای کودی در شرایط آبیاری (عدم تنش)، سبب افزایش ۲۹/۶ درصدی کلروفیل کل نسبت به تیمار شاهد در شرایط تنش خشکی شد (جدول ۷).

جدول ۲: نتایج تجزیه واریانس رنگیزه‌های فتوسنتزی شنبلیله تحت تیمارهای تنش خشکی ،بیوپتاس و سولفات آهن

منابع تغیرات	درجه آزادی	کلروفیل کل	کلروفیل a	کلروفیل b	کارتنوئید
بلوک	۲	۰/۰۰۶^{ns}	۰/۵۰۳^{ns}	۰/۴۷۱^{ns}	۰/۲۱۱^{ns}
تنش خشکی	۱	۰/۰۷۴^{ns}	۱/۹۸*	۱/۲۰^{ns}	۱/۹۸*
خطای اصلی	۲	۰/۰۲۲^{ns}	۰/۰۷۸^{ns}	۰/۱۵۹^{ns}	۰/۰۵^{ns}
بیوپتاس	۱	۰/۱۰۳^{ns}	۰/۰۵۱^{ns}	۰/۰۰۹^{ns}	۰/۰۰۱^{ns}
سولفات آهن	۱	۰/۱۶۵^{ns}	۱/۵۳*	۰/۶۹۲^{ns}	۰/۰۰۳^{ns}
تنش خشکی×بیوپتاس	۲	۲/۲۸**	۳/۵۴**	۰/۱۳۸^{ns}	۰/۱۴۷*
تنش خشکی × سولفات آهن	۱	۰/۳۰۵^{ns}	۰/۱۳۷^{ns}	۰/۸۵۳*	۰/۰۸۱^{ns}
بیوپتاس × سولفات آهن	۱	۰/۰۱۱^{ns}	۰/۲۱۹^{ns}	۰/۱۳۰^{ns}	۰/۰۲۲^{ns}
تنش خشکی × بیوپتاس × سولفات آهن	۱	۶/۲۷**	۲/۲۹*	۰/۹۷۷*	۰/۰۵۲^{ns}
خطای فرعی	۱۲	۰/۱۳۷	۰/۳۰۴	۰/۱۶۸	۰/۰۳۰

ns، ** و * به‌ترتیب غیر معنی‌داری و معنی‌داری در سطح احتمال یک و پنج درصد

کلروفیل a: نتایج تجزیه واریانس حاکی از آن بود که تنش خشکی، اثر ساده سولفات آهن و برهمکنش تنش خشکی و بیوپتاس اثر معنی‌داری بر کلروفیل a داشت (جدول ۲). نتایج نشان داد برهمکنش تنش خشکی، بیوپتاس و سولفات آهن بر مقدار کلروفیل a معنی‌دار شد، بطوری که بیشترین میزان کلروفیل a از تیمار کودی (بیوپتاس و سولفات آهن) در شرایط آبیاری (عدم تنش خشکی) به میزان ۴/۲۴ میلی‌گرم بر گرم حاصل گردید (جدول ۷).

کلروفیل b: با توجه به نتایج تجزیه واریانس، اثر متقابل تنش خشکی و سولفات آهن بر مقدار کلروفیل b معنی‌دار شد، که بیشترین میزان کلروفیل b (۲/۷۹ میلی‌گرم بر گرم) در شرایط تنش خشکی همراه با تیمار کودی سولفات آهن بدست آمد (جدول ۵). نتایج تجزیه واریانس نشان داد که برهمکنش تنش خشکی، بیوپتاس و سولفات آهن بر مقدار کلروفیل b اثر معنی‌داری داشت (جدول ۷).

جدول ۳: نتایج تجزیه واریانس صفات بیوشیمیایی شنبلیله تحت تیمارهای تنش خشکی ،بیوپتاس و سولفات آهن

منابع تغیرات	درجه آزادی	آنتی‌اکسیدان	فلاونوئید	قند	فنول	آنتوسیانین
بلوک	۲	۳/۶۸^{ns}	۲/۱۸^{ns}	۱/۳۱^{ns}	۰/۱۵۱^{ns}	۰/۲۲۳^{ns}
تنش خشکی	۱	۲۹/۱۵^{ns}	۲/۲۳^{ns}	۱۵/۰۳*	۰/۲۲۵^{ns}	۰/۰۷۲^{ns}
خطای اصلی	۲	۳۰/۶۸^{ns}	۰/۳۰^{ns}	۰/۳۹۰^{ns}	۰/۱۶۵^{ns}	۰/۷۳۶*
بیوپتاس	۱	۱۸۱/۸۷*	۱۷/۷۲**	۰/۳۰۶^{ns}	۰/۲۲۰*	۰/۰۴^{ns}
سولفات آهن	۱	۸۸/۷۲^{ns}	۰/۳۳^{ns}	۵/۳۲^{ns}	۰/۰۰۷^{ns}	۶/۱۵**
تنش خشکی × بیوپتاس	۱	۱۶/۳۵^{ns}	۰/۷۲^{ns}	۸/۱۹*	۲/۰۹*	۱۳/۹۹**
تنش خشکی × سولفات آهن	۱	۲۵۶/۳۳*	۴/۹۲^{ns}	۰/۵۴۵^{ns}	۰/۱۳۶^{ns}	۳/۰۰**
بیوپتاس × سولفات آهن	۱	۲۲۸/۶۸*	۲/۶۸^{ns}	۱۳/۶۳*	۰/۳۷۲^{ns}	۰/۰۴۸^{ns}
تنش خشکی × بیوپتاس × سولفات آهن	۱	۰/۰۱۳^{ns}	۷/۳۴*	۸/۱۹*	۱/۷۲**	۱/۶۲۲**
خطای فرعی	۱۲	۳۵/۱۲	۱/۳۹	۱/۶۶	۰/۲۴۲	۰/۱۴۹

ns، ** و * به‌ترتیب غیر معنی‌داری و معنی‌داری در سطح احتمال یک و پنج درصد

کارتنوئیدها: نتایج نشان داد میزان کارتنوئیدها تحت تاثیر تنش خشکی قرار گرفتند (۲). اثر متقابل تنش خشکی و تیمار بیوپتاس اثر معنی‌داری بر میزان کارتنوئیدها برگ داشت، بطوری‌که بیشترین میزان کارتنوئیدها در شرایط عدم تنش خشکی با ۱/۴۱ میلی‌گرم بر گرم و کمترین میزان کارتنوئیدها با ۰/۶۸۵ میلی‌گرم بر گرم در شرایط تنش خشکی مشاهده گردید (جدول ۴).

جدول ٤: برهمکنش سطوح مختلف بیوپتاس و تنش خشکی بر صفات بیوشیمیایی شنبلیله.

تنش خشکی	بیوپتاس (کیلوگرم در هکتار)	کاروتنوییدها (میلی گرم بر گرم)	کلروفیل کل (میلی گرم بر گرم)	کلروفیل a (میلی‌گرم بر گرم)	قند (میلی‌گرم بر گرم)	فنل کل (میلی‌گرم برگرم)	آنتوسیانین (میلی گرم بر گرم)
تنش	۰	۰/۶۸۵b	۵/۵۲a	۲/۸۴ab	۱۱/۸۰ab	۵/۵۳b	۵/۸۰b
تنش	۵	۰/۸۵۹b	۵/۰۳a	۲/۱۶b	۱۳/۲۰a	۶/۵۶a	۷/۴۱a
عدم تنش	۰	۱/۴۱a	۵/۰۱a	۲/۶۵b	۱۱/۳۹ab	۵/۹۰ab	۷/۲۲a
عدم تنش	۵	۱/۲۷a	۵/۷۶a	۳/۵۱a	۱۰/۴۵b	۵/۷۸b	۵/۷۷b

حروف مشابه در هر ستون اختلاف معنی‌داری در سطح ۱ و ۵ درصد آزمون چند دامنه‌ای دانکن ندارند.

جدول ۵: برهمکنش سطوح مختلف سولفات آهن و تنش خشکی بر صفات بیوشیمیایی شنبلیله.

تنش	سولفات آهن (در هزار)	کلروفیل b (میلی گرم بر گرم)	آنتی اکسیدان (درصد)	آنتوسیانین (میلی‌گرم برگرم)
تنش	۰	۲/۷۵ab	۵۲/۴۴b	۵/۷۵b
تنش	۱/۵	۲/۷۹a	۶۲/۸۲a	۷/۴۷a
عدم تنش	۰	۲/۶۶a	۶۱/۱۸ab	۶/۳۴ab
عدم تنش	۱/۵	۱/۹۴b	۵۸/۴۹ab	۶/۶۵ab

حروف مشابه در هر ستون اختلاف معنی‌داری در سطح ۱ و ۵ درصد آزمون چند دامنه‌ای دانکن ندارند.

فعالیت آنتی‌اکسیدانی: با توجه به نتایج تجزیه واریانس اثرساده تیمار بیوپتاس و اثر متقابل بیوپتاس و سولفات آهن بر فعالیت آنتی‌اکسیدانی گیاه معنی‌دار شد، همچنین برهمکنش تنش خشکی و سولفات آهن نیز اثر معنی داری بر فعالیت آنتی‌اکسیدانی داشت (جدول ۳). نتایج مقایسه میانگین‌ها نشان داد، بیشترین میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی با ۶۲/۸۲ درصد در شرایط تنش خشکی با تیمار ۱/۵ در هزار سولفات آهن و کمترین میزان فعالیت آنتی اکسیدانی با ۵۲/۴۴ درصد در شرایط تنش در شاهد (عدم کودهی) مشاهده شد، به‌طوری که تیمار سولفات آهن سبب افزایش ۱۹/۷ درصدی فعالیت آنتی‌اکسیدانی گیاه در مقایسه با شاهد (عدم کودهی) شد (جدول ۵).

میزان فنل کل: نتایج تجزیه واریانس نشان داد تنش خشکی اثر معنی‌داری بر مقدار فنل کل شنبلیله نداشت، اما اثر ساده بیوپتاس معنی‌دار گردید. برهمکنش تنش خشکی، بیوپتاس و اثر متقابل تنش خشکی، بیوپتاس و سولفات آهن بر میزان فنل کل معنی دار شد (جدول ۳). با توجه به نتایج مقایسه میانگین‌ها بیشترین میزان فنول(۶/۸۶ میلی گرم بر گرم) در شرایط تنش خشکی با تیمار ۵ کیلوگرم بر

هکتار و کمترین میزان فنل (۵/۰۵ میلی گرم بر گرم) در شاهد مشاهد گردید (جدول ۸)

میزان قندهای محلول: نتایج تجزیه واریانس نشان داد قند کل تحت تاثیر تنش خشکی قرار گرفت. اثر متقابل بیوپتاس وسولفات آهن، همچنین برهمکنش تنش خشکی، بیوپتاس و سولفات آهن نیز اثر معنی‌داری بر میزان قندهای محلول گیاه داشت (جدول ۳). نتایج مقایسه میانگین‌ها نشان داد که بیشترین میزان قند گیاه با ۱۳/۲۰ میلی‌گرم بر گرم در تیمار ۵ کیلوگرم بر هکتار بیوپتاس در شرایط تنش خشکی و کمترین میزان با ۱۰/۴۵ میلی‌گرم بر گرم در شرایط عدم تنش خشکی (آبیاری نرمال) بدست آمد (جدول ۴).

میزان فلاونوئیدها: نتایج نشان داد که تنش خشکی بر مقدار فلاونوئیدها گیاه اثر معنی‌داری نداشت (جدول ۳). اما برهمکنش تنش خشکی، بیوپتاس و سولفات آهن اثر معنی‌داری بر مقدار فلاونوئیدها داشت. در شرایط تنش خشکی، میزان فلاونوییدها شنبلیله افزایش یافت، بطوری‌که بیشترین میزان فلاونویید کل شنبلیله (۸/۶۶ میلی‌گرم بر گرم) در شرایط تنش خشکی و از تیمارهای ۵ کیلوگرم بیوپتاس در هکتار و ۱/۵ در هزار سولفات آهن حاصل گردید (جدول ۸).

میزان آنتوسیانین: نتایج نشان داد تنش خشکی اثر معنی داری بر مقدارآنتوسیانین نداشت، اما برهمکنش تنش خشکی و سولفات آهن اثر معنی داری بر مقدار فلاونوئید داشت، بطوریکه در شرایط تنش خشکی، تیمار ۱/۵ در هزار سولفات آهن موجب افزایش ۲۹/۹ درصدی میزان آنتوسیانین گردید (جدول ۵).

جدول ٦: برهمکنش سطوح مختلف سولفات آهن و بیوپتاس بر صفات بیوشیمیایی شنبلیله.

بیوپتاس (کیلوگرم در هکتار)	سولفات آهن (در هزار)	آنتی اکسیدان (درصد)	قندهای محلول (میلی‌گرم بر گرم)
۰	۰	۵۰/۹۷b	۱۰/۳۷b
۰	۱/۵	۶۰/۹۹a	۱۲/۸۲a
۵	۰	۶۲/۶۵a	۱۲/۱۱ab
۵	۱/۵	۶۰/۳۲a	۱۱/۵۴ab

حروف مشابه در هر ستون اختلاف معنی‌داری در سطح ۱ و ۵ درصد آزمون چند دامنه‌ای دانکن ندارند.

جدول ۷: برهمکنش سطوح مختلف تنش خشکی، بیوپتاس و سولفات آهن بر صفات بیوشیمیایی شنبلیله.

تنش	بیوپتاس (کیلوگرم در هکتار)	سولفات آهن (در هزار)	کلروفیل کل (میلی گرم بر گرم)	کلروفیل b (میلی گرم بر گرم)	کلروفیل a (میلی گرم بر گرم)	قندهای محلول (میلی‌گرم بر گرم)
تنش	۰	۰	۴/۸۳cd	۲/۳۸ab	۲/۴۵bc	۱۰/۱۵b
تنش	۰	۱/۵	۶/۲۰a	۲/۹۷a	۳/۲۳b	۱۳/۴۶a
تنش	۵	۰	۵/۳۲bc	۳/۱۲a	۲/۲۰c	۱۴/۲۲a
تنش	۵	۱/۵	۴/۷۴cd	۲/۶۱ab	۲/۱۳c	۱۲/۱۸ab
عدم تنش	۰	۰	۵/۵۷b	۲/۸۵a	۲/۷۲bc	۱۰/۶۰b
عدم تنش	۰	۱/۵	۴/۴۵d	۱/۸۷b	۲/۵۷bc	۱۲/۱۸ab
عدم تنش	۵	۰	۵/۲۶bc	۲/۴۸ab	۲/۷۷bc	۱۰/۰۰b
عدم تنش	۵	۱/۵	۶/۲۶a	۲/۰۲ab	۴/۲۴a	۱۰/۹۰b

حروف مشابه در هر ستون اختلاف معنی‌داری در سطح ۱ و ۵ درصد آزمون چند دامنه‌ای دانکن ندارند.

همچنین برهمکنش تنش خشکی، بیوپتاس و سولفات آهن بر مقدار آنتوسیانین گیاه معنی‌دار بود، به‌طوریه‌که بالاترین میزان آنتوسیانین شنبلیله (۸/۴۹ میلی‌گرم بر گرم) از تیمارهای ۵ کیلوگرم بیوپتاس در هکتار و ۱/۵ در هزار سولفات آهن در شرایط تنش خشکی و کمترین میزان آنها (۵/۱۶ میلی‌گرم بر گرم) در تیمار شاهد (عدم کودهی بیوپتاس و سولفات آهن) و تحت شرایط تنش بدست آمد (جدول ۸).

جدول ۸: برهمکنش سطوح مختلف تنش خشکی، بیوپتاس و سولفات آهن بر صفات بیوشیمیایی شنبلیله.

تنش خشکی	سولفات آهن (در هزار)	بیوپتاس (کیلوگرم در هکتار)	فنل کل (میلی‌گرم برگرم)	فلاونوئیدها (میلی‌گرم برگرم)	آنتوسیانین (میلی‌گرم بر گرم)
تنش	۰	۰	۵/۰۵c	۵/۴۵c	۵/۱۶d
تنش	۱/۵	۰	۶/۰۲ab	۴/۸۲c	۶/۴۵bc
تنش	۰	۵	۶/۸۶a	۵/۷۵c	۶/۳۴bc
تنش	۱/۵	۵	۶/۲۶ab	۸/۶۶a	۸/۴۹a
عدم تنش	۰	۰	۶/۱۱ab	۶/۲۱bc	۶/۷۶b
عدم تنش	۱/۵	۰	۵/۷۰bc	۵/۹۸bc	۷/۶۸a
عدم تنش	۰	۵	۵/۶۹bc	۸/۰۲ab	۵/۹۳bcd
عدم تنش	۱/۵	۵	۵/۸۶bc	۶/۹۱abc	۵/۶۲cd

حروف مشابه در هر ستون اختلاف معنی‌داری در سطح ۱ و ۵ درصد آزمون چند دامنه‌ای دانکن ندارند.

بحث

نتایج این تحقیق نشان داد که اعمال تنش خشکی باعث کاهش میزان رنگیزه‌های کلروفیل در گیاه شد. مشابه نتایج این تحقیق، گزارش‌ها نشان داد که تنش خشکی سبب کاهش مقدار کلروفیل کل، a و b در بادرنجبویه گشت (Abbaszadeh et al., 2008). به نظر می‌رسد کاهش محتوای کلروفیل در هنگام مواجه با تنش خشکی، در اثر تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن و متعاقب آن پراکسیداسیون لیپیدها و تخریب کلروفیل بوده است (Xiao and Yang, 2008). Bideshki و همکاران (۲۰۱۲) گزارش کردند که تنش خشکی باعث کاهش محتوی کاروتنوئیدها در گیاه سیر شد که با نتایج این تحقیق مطابقت دارد. از طرف دیگر، Jahanshahi و همکاران (۲۰۱۳) گزارش کردند که غلظت کلروفیل گیاه دارویی گشنیز در اثر کاربرد کودهای زیستی افزایش یافت. نتایج مطالعه Sheikhi-Ghahfarokhi و همکاران (۲۰۱۴) نیز حاکی از آن است که تیمار کودهای زیستی از جمله باسیلوس، سودوموناس پوتیدا، سودوموناس فلورسنس قادر بودند به طور معنی داری میزان کلروفیل a را در گیاه همیشه بهار نسبت به شاهد افزایش دهند. آزمایش Kazemalilou و Rasouli-Sedghiani (۲۰۱۲) نیز نشان داد که تلقیح بذور گیاه بنگدانه با باکتریهای سودوموناس فلورسنت سبب افزایش میزان کلروفیل b گردید. Loggini و همکاران (۱۹۹۱) بیان کردند اگرچه آهن در ساختار کلروفیل نقش مستقیمی ندارد، ولی وجود آهن کافی سبب بهبود کلروفیل سازی در گیاه می‌شود، که با نتایج این تحقیق هم راستا می‌باشد. گزارش‌های محققین بر روی گیاهان مختلف حاکی از افزایش محتوای کاروتنوئیدها در گیاهان تلقیح شده با کودهای بیولوژیک است (Kapoor et al., 2004). کاروتنوئیدها به‌عنوان یک آنتی‌اکسیدان غیر آنزیمی از طریق خنثی سازی رادیکال‌های آزاد، فرایند آکسیداسیون را متوقف می‌کنند و نقش مهمی

در تعدیل اثرات سو تنش در برگ‌ها دارد (Mittler, 2004). در مطالعه Shamloo و Roozbahani (۲۰۱۶) گزارش کردند افزایش آهن، سنتز کاروتنوئیدها را افزایش می‌دهد. همچنین Leng و همکاران (۲۰۰۰) بیان نمودند که محلول پاشی عنصر ریزمغذی آهن تأثیر بسزایی در افزایش میزان کاروتنوئیدها در لوبیا قرمز داشت که موید نتایج آزمایش حاضر است.

مطالعات فراوانی حاکی از افزایش تجمع گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) تحت تنش خشکی می‌باشد. گیاهان از طریق سازکارهای آنتی‌اکسیدانی آنزیمی و غیرآنزیمی، گونه‌های فعال اکسیژنی ایجاد شده را کاهش می‌دهند (Miller et al., 2010). یکی از راهکارهای مناسب گیاهان در پاسخ به تنش خشکی، افزایش مواد محلول و فعال اسمزی است که با حفظ خاصیت آبگیری و تورژسانس سلول، انجام فرآیندهای متابولیسمی را از خطرات کمبود آب ایمن می‌سازد که از جمله این ترکیبات می‌توان به کربوهیدرات‌ها، قندها، پلی‌ساکاریدها و اسیدهای آمینه اشاره کرد (Jones et al., 1980). Maghami و همکاران (۲۰۱۴) افزایش قندهای محلول در شرایط تنش خشکی در گیاه گلرنگ گزارش کردند، که با نتایج این آزمایش مطابقت دارد. در شرایط تنش خشکی، تنظیم کننده‌های اسمزی می‌توانند قدرت جذب آب را توسط سلول گیاهی افزایش دهند (Ahanger et al., 2013) بنابراین، میزان تجمع این تنظیم کننده‌های اسمزی می‌توانند با مقاومت به خشکی مرتبط باشد.

طبق تحقیقات Ghorbanali و همکاران (۲۰۰۵) اثر تنش شدید خشکی بر گیاه سویا سبب افزایش معنی‌دار ترکیبات فنلی در برگ‌های سویا شد. همچنین اعمال تنش خشکی بر گیاه فلفل نیز باعث افزایش ترکیب‌های فنلی و افزایش تندی آن گشت (Estrada et al., 1999). علت افزایش محتوای فنلی در گیاهان تحت تنش را چنین بیان نمودند که گیاهان تحت تنش، سازوکارهای دفاعی خاصی را از قبیل افزایش غلظت فنل کل در برابر استرس اکسیداتیو به کار می‌گیرند. افزایش ترکیبات فنلی به این علت است که گروه‌های هیدروکسیل آزاد متصل به حلقه آروماتیک به‌وسیله جاروبگری رادیکال‌ها، آسیب‌های اکسیداتیو ناشی از یون‌ها را کم کرده و به این ترتیب ساختارهای سیتوپلاسمی و کلروپلاستی را از اثر منفی تنش محافظت می‌کنند (Apel and Hirt, 2004).

مشابه نتایج این آزمایش، گزارش شده است که تولید فلاونوئیدها در گیاه انیسون با افزایش تنش خشکی افزایش می یابد (Arun, 2002). یکی از دلایل افزایش میزان فلاونوئیدها در شرایط تنش، ایجاد محدودیت در انتقال الکترون فتوسنتزی طی تنش است که سبب ایجاد تغییرات متابولیک در گیاه از جمله منجر به القای سنتز فلاونوئیدها برای تعدیل این وضعیت می‌شود. این عمل از طریق آنزیم فنیل آلانین آمونیا لیاز (PAL) صورت می‌گیرد. کاربرد بازدارنده‌های سنتز فنیل آلانین آمونیالیاز و مهار مسیر بیوسنتز فلاوونوئیدها، باعث افزایش حساسیت گیاه نسبت به تنش می شود (Chegini et al., 2017). Zhang و همکاران (۲۰۱۰) گزارش کردند که مقدار آنتوسیانین در گیاه بگونیا *Begonia semperflorens* در شرایط تنش افزایش یافت که این افزایش به علت نقش حفاظت نوری آنتوسیانین به وسیله حذف مستقیم ROS در طول تنش اکسیداتیو می‌باشد که نتایج این آزمایش را تایید می‌کند.

Jafarzadeh و همکاران (۲۰۱۴) نیزگزارش کردند که با افزایش تنش خشکی میزان آنتوسیانین در گیاه همیشه بهار افزایش می‌یابد. محققیق گزارش کردند در گیاه دارویی بادرنجبویه محلول پاشی آهن اثر مثبتی بر افزایش رزمارینیک اسید (نوعی فلاونوئید)

داشت (Posmyk et al., 2009) که با نتایج این تحقیق مطابقت دارد. همچنین Nicure (۲۰۱۵) در بررسی‌های خود نشان دادند که، کودهای زیستی توانایی ساخت و ترشح مواد بیولوژیک فعال مانند اسید نیکوتنیک، بیوتین، ویتامین‌های گروه اکسین‌ها، جیبرلین‌ها و غیره را دارند که این مواد موجب افزایش محتوای ماده آلی و هیدرات‌های کربن گیاه و در نتیجه افزایش آنتوسیانین می‌شوند. همچنین محلول پاشی سولفات آهن در گیاه زرشک طور معنی‌داری میزان آنتوسیانیین را افزایش داده است (Kalinova and Vrchotova, 2011). در تحقیقی دیگر در گیاه گلرنگ محلولپاشی و مصرف خاکی کلات آهن، میزان آنتوسیانین برگ را در مقایسه با تیمار شاهد به طور معنی داری افزایش داد (Ghorbanpour, 2015). محققین گزارش کردند ترکیبات فنلی و آنتوسیانین‌ها از عوامل مهم در جهت مقابله با رادیکال‌های آزاد در تنش‌های مرتبط با فلزات می باشند (Sharma and Hall, 1991). بنابرین افزایش آنتوسیانین‌ها یک حالت حفاظتی برای از بین بردن رادیکال‌های آزاد و جلوگیری از تخریب مولکول‌های زیستی می‌باشد. مقایسه نتایج به دست آمده در این تحقیق با نتایج منتشر شده در منابع نشان می‌دهد که مصرف بیوپتاس و سولفات آهن تأثیر مثبتی برافزایش متابولیت‌های ثانویه گیاه که سبب مقاومت گیاه در برابر تنش خشکی می‌گردد می‌شود.

نتیجه‌گیری نهایی

با توجه به نتایج می توان چنین نتیجه گرفت که گیاه شنبلیله در هنگام تنش خشکی با ایجاد تغییرات در برخی از خصوصیات فیزیولوژیکی و بیوشیمایی خود به تنش پاسخ داد که از جمله این پاسخ‌ها می‌توان به افزایش محتوی فنلی، فلاونییدها، آنتوسیانین، کاروتنوئیدهاو قندهای محلول در گیاه اشاره کرد، که باعث دوام گیاه دارویی شنبلیله شد. همچنین در تحقیق حاضر، کاربرد کود زیستی بیوپتاس و سولفات آهن توانستند صفات بیوشیمیایی شنبلیله را بهبود ببخشد. بنابراین می توان نتیجه گرفت که استفاده از کودهای زیستی یکی از راهکارهای مناسب برای دسترسی به عملکرد مطلوب و افزایش صفات بیوشیمیایی است که می تواند منجر به کاهش وابستگی سیستم‌های زراعی به نهاده‌های شیمیایی شود.

References

Abbaszadeh, B., Sharifi-ashurabadi, E., Lebaschy, M.H., Naderi-hajibaqerkandi, M., and Moghaddami, F. (2008). Effect of drought stress on prolin, soluble sugar, chlorophyll and relative water content (RWC) of lemon balm (*Melissa officinalis* L.). Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants, 23 (4): 504-513. (In Persian).

Ahanger, M., Tyagi, S., Wani, M. and Ahmad, P. (2013). Drought tolerance: role of organic osmolytes, growth regulators, and mineral nutrients. Physiological Mechanisms and Adaptation Strategies in Plants under Changing Environment, eds Ahmad P., Wani M.R., editors. (New York, NY: Springer, Sci. 1: 25-55.

Alizadeh, A. (2002). Relationship between water and water. Imam Reza University Press. Mashhad. Iran, 450p.

Altuntas, E., Engin, O., Zgo, Z.E., and Taser, F. (2005). Some physical properties of fenugreek (*Trigonella foenum-graceum* L.) seeds. Journal Food Engineering, 71: 37-43.

Apel, K. and Hirt, H. (2004). Reactive oxygen species: Metabolism, oxidative stress, and signal transduction, Journal Plant Biology. 55:373-399

Arun, K.S. (2002). A Handbook of Organic Farming Pub, Agrobios, India.

Asadi Kavan, Z.h., Ghorbanli, M. and Sateei, A. (2010). The effect of drought stress and exogenous ascorbate on photosynthetic pigments, flavonoids, phenol compounds and lipid peroxidation in *Pimpinella anisum* L.

Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants, 25(4): 456-69. (In Persian)

Bideshki, A., Arvin, M.J. and Maghsoudi, K.(2012). Effect of indole-3 butyric acid (IBA) foliar application on growth, bulb yield and allicin of garlic (*Allium sativum* L.) under water deficit stress in field. Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants, 28(3): 567-577. (In Persian).

Carrubba, A., LaTorre, R. and Matranga, A. (2002). Cultivation trials of some aromatic and medicinal plants in a semi-arid Mediterranean environment. Proceedings of an International Conference on MAP, Acta Horticulture (ISHS), 978 (1): 4200-6315.

Chegini, A., Ghorbanpour, M., Hatami, M. and Taqizadeh, M. (2017). Effect of Multi-Walled Carbon Nanotubes on Physiological Traits, Phenolic Contents and Antioxidant Capacity of Salvia mirzayanii Rech. f. & Esfand. under Drought Stress. Journal of Medicinal Plant, 16(2),62. (In Persian).

Estrada, B., Pomar, F.J., Merino, F. and Bernal, M.A. (1999). Pungency level in fruits of the Padron pepper with different water supply. Journal of Horticultural Science, 81(4): 385-396.

Ghorbanali, M. and Niakan, M. (2005). Evaluation of drought stress effect on soluble sugars content, protein, prolin and phenolic compounds and nitrate reeducates activity in soybean cultivar Gorgan 3, Iran. Journal of Science Education, 1(2): 537-550

Ghorbanpour, M. (2015). Major essential oil constituents, total phenolics and flavonoids content and antioxidant activity of Salvia officinalis plant in response to nano-titanium dioxide. Indian Journal of Plant Physiology, 20 (3): 249 – 56.

Han, H.S., Supanjani, D. and Lee, K.D. (2006). Effect of coin coculation with phosphate and potassium solubilizing bacteria on mineral uptake and growth of pepper and cucumber. Journal Psychology of Sport and Exercise, 52: 130-136.

Jafarzadeh, L., Omidi, H. and Bostany, A. (2014) The Effect of drought stress and nitrogen fertilizer on some biochemical properties of calendula (*Calendula officinalis* L.) plant. Journal of Plant Research, 27(1).

Jahanshahi, Sh., Baghreizadeh, M. and Abotalebi, A. (2013) Effect of vermi compost, azotobacter and barvar II on some quantitative and qualitative traits of coriander (*Coriandrum sativum* L.) medicinal plant. Journal of crop Production Research**,** 4(4): 391-400.

Jiang, Y. and Huang, B. (2001). Drought and heat injury to two cool-season turf grasses in relation to antioxidant metabolism and lipid peroxidation. Crop Science, 41: 436-442.

Jones, M.M., Osmond, C.B. and Turner, N.C. (1980). Accumulation of solutes in leaves of sorghum and sunflower in response to water stress. Australian Journal of Plant Physiology, 7: 193-205.

Kalinova, J. and Vrchotova, N. (2011). The influence of organic and conventional crop management, variety and year on the yield and flavonoid level in common buckwheat groats. Food chemistry, 127: 602-8.

Kamrova, S., Babayan Jolodar, N. and Bagheri, N. (2017). Effect of drought stress on chlorophyll and proline traits in different soybean genotypes. Journal of Agronomy correction research, 9 (23).

Kapoor, R., Giri, B. and Mukerji, K.G. (2004). Improved growth and essential oil yield and quality in (*foeniculum vulgare* Mill.) on mycorrhizal inoculation supplemented with P fertilizer. Journal of Biotechnology, 93: 307-311.

Kazemalilou, S. and Rasouli-Sedghiani, M.H. (2012). Effect of soil cadmium pollution on some physiological parameters of Hyoscyamus plant (*Hyoscyamus niger* L.) in presence/absence of growth-promoting microorganisms. Journal of Water and Soil Science, 22(4): 17-30.

Krizek, D.T., Mirecki, R.M. and Britz, S.J. (1997). Inhibitory effects of ambient levels of solar UV-A and UV-B radiation on growth of cucumber. Journal of Plant Physiology, 100(4), 886-893.

Leng, P., Itamura, H., Yamamura, H.H. and Deng, X. (2000). Anthocyanin accumulation in apple and peach shoots during cold acclimation. Journal of Horticultural Science, 83: 43-50.

Lichtenthaler, H.K. (1987). Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. Methods in enzymology, 148 (34): 350-382.

Liu, C.C., Liu, Y.G., Guo, K., Fan, D., Li, G.Q., Yu, L., Yang, R. and Zheng, Y. (2011). Effect of drought on pigments, osmotic adjustment and antioxidant enzymes in six woody plant species in karst -habitats of southwestern China Environmental and Experimental Botany, 71:174-183.

Loggini, B., Scartazza, A., Brugnoli, E. and Navari Izzo, F. (1999). Antioxidative defense system pigment composition and photosynthetic efficiency in two wheat cultivars subjected to drought. Plant Physiology, 119: 1091-1100 effects. Journal of Food and Chemical Toxicology, 50: 2503-2507.

Maghami, R., Zahedi, M. and Gheysari, M. (2014). Effects of nitrogen application and irrigation water on grain yield and water use efficiency of safflower in Isfahan. Journal of Plant Production, 4 (11): 1-13. (In Persian)

Marschner, H. (1995). Mineral Nutrition of Higher Plants. 2nd ed., Academic Press, New York, USA

Miller, G., Suzuki, N. and Ciftci-Yilmaz, S. (2010). Reactive oxygen species homeostasis and signaling during drought and salinity stresses. Journal of Plant Cell and Environment, 33: 453-467.

Mittler, R. (2004). Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. Journal of Plant Sciences, 7: 405-410.

Mocready, R., Guggolz, J., Silviera, V. and Owens, H. (1950). Determination of starch and amylose in vegetables. Application to peas. Journal of Analytical Chemistry, 22: 1156-1158.

Muyayabantu, G.M., Kadiata, B.D. and Nkongolo, K.K, (2013). Assessing the effects of integrated soil fertility management on biological efficiency and economic advantages of intercropped maize (*Zea mays* L.) and soybean (*Glycine max* L.) in DR Congo, 3 (3): 520-541.

Nicure, S., 2015. The Effect of Glutenin and Acid Streak Spray on Growth Indices and Petunia × Hybrida. Master's thesis, Department of Horticulture.Islamic Azad University.Karaj Branch

Posmyk, M.M., Kontek, R. and Janas, K.M. (2009). Antioxidant Enzymes activity and phenolic compounds content in red cabbage seedlings exposed to copper stress. Journal Ecotoxicology and Environmental Safety, 72 (2): 596 – 602.

Salehi Shanjani, P. (2005). Izozyme diversity of Menadion reductase, isocitrate dehydrogenase and malate dehydrogenase of Fagus orientalis Lipsky in beech forests of Iran. Journal of Biology, 17: 402- 420.

Saravanakumar, D., Kavino, M., Raguchander, T., Subbian, P. and Samiyappan. (2011). Plant growth promoting bacteria enhance water stress resistance in green gram plants. Journal Acta Physiology Plant, 33: 203-209.

Shamloo, A. and Roozbahani, A. (2016). Effect of amino acids and microelements on the rate of photosynthetic pigments content and yield of red bean (*Phaseolus vulgaris* L.). Journal of Plant Ecophysiology, 7 (21): 136-50.

Sharma, P.K. and Hall, D.O. (1991). Interaction of saltstress and photoinhibition on photosynthesis in barley and sorghum Journal of Plant Physiology, 138(5): 614-19.

Sheikhi-Ghahfarokhi, F. (2014). Effect of seed biopriming by PGPR bacteria on germination indices, growth and yield of Calendula of ficinalis L. M.Sc. Thesis in Seed Science and Technology, Shahrekord University, 93 P.

Sidsel Fiskaa, H., Grethe, I., Borge, A., Knut, A. and Gunnar, B. (2009). Effect of cold storage and harvest data on bioactive compound in curly kale (*Brassica oleracea* L. var. acephala). Journal of Postharvest Biology and Technology, 51: 36-42.

Tajmmlian, M., Iran Nejad parazi, M.D., Malekinejad, H., Rad, M.H. and Sodaie zadeh, H. (2012). Effect of low stress on some physiological parameters of plant (.*Fortuynia bungei* Boiss). Journal of Genetics Research and Plant Breeding, 20: 273-283.

Talebi, M., Sagheb Talebi, Kh. and Jahanbazi, H. (2006). Site demands and some quantitative and qualitative characteristic of Persian Oak (*Quercus brantii* L.) in chaharmahal & Bakhtiari Province (western Iran). Iranian Journal of Forest and Poplar Research, 14(1): 67-79.

Turkmen, N., Sari, F. and Velioglu, Y.S. (2005). The effect of cooking methods on total phenolics and antioxidant activity of selected green vegetables. Journal of Food chemistry, 93(4): 713-718

Wrosotad, R.E. (1976). Color and pigment analysis in fruit products. Oregon State University Publications Limited, Cornwalis.

Wu, S.C., Cao, Z.H., Li, Z.G., Cheung, K.C. and Wong, M.H. (2005). Effects of bio fertilizer containing N-fixer, P and K solubilizers and AM fungi on maize growth: a greenhouse trial. Journal Geoderma, 125: 155-166.

Xiao, X., Xu, X. and Yang, F. (2008). Adaptive responses to progressive drought stress in two Populus cothayana populations. Silva Fennica, 42: 705-719.

Xoconostle-Cazares, B., Ramirez-Ortega, F.A., Flores-Elenes, L. and Ruiz-Medrano, R. (2010). Drought tolerance in crop plants. American Journal Plant Physiology, 5(5): 241-256.

Yoo, K.M., Lee, C., Lee, H., Moon, B.K. and Lee, C.Y. (2008). Relative antioxidant and cytoprotective activities of common herbs. Journal of Food chemistry, 106: 929-936.

Zhang, K.M., Yu, H.J., Shi, K., Zhou, Y.H., Yu, J.Q. and Xia, X.J. (2010). Photoprotective roles of anthocyanins in Begonia simper florens. Journal of Plant Sciences, 179(3): 202-208.