نشریه علوم باغبانی (علوم و صنایع کشاورزی)
جلد 28، شماره 3، پاییز 1393، ص. 346-338
شاپا: 4730 - 2008

Journal of Horticultural Science
Vol. 28, No. 3, Fall 2014, P. 338-346
ISSN: 2008 - 4730

تأثیرتنش خشکی و کودهای آلی بر فعالیت برخی آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی، رنگدانه‌های فتوسنتزی، پرولین و عملکرد گاوزبان (*Borago officinalis*)

رعنا قلی نژاد[1]- علیرضا سیروس مهر[2*]- براتعلی فاخری[3]

تاریخ دریافت: 1391/05/25
تاریخ پذیرش: 1393/04/03

چکیده

به‌منظور بررسی اثرات تنش خشکی و کودهای آلی (کمپوست و ورمی کمپوست) بر برخی صفات فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی گاوزبان آزمایشی به‌صورت کرت‌های خرد شده در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی با سه تکرار در دانشگاه زابل اجرا گردید. تیمارها شامل سطوح تنش خشکی به‌صورت شاهد یا 100درصد ظرفیت زراعی، 80 درصد ظرفیت زراعی (تنش ملایم) و 60 درصد ظرفیت زراعی (تنش شدید) به‌عنوان عامل اصلی و مصرف کود آلی شامل شاهد (بدون مصرف کود)، 40 تن کمپوست در هکتار و 4 تن ورمی کمپوست در هکتار به‌عنوان عامل فرعی در نظر گرفته شدند. نتایج نشان داد که با افزایش شدت کم‌آبی از شاخص کلروفیل (SPAD) کاسته و بر میزان فلورسانس کلروفیل افزوده شد. بیش‌ترین میزان کلروفیل a (11/383 میلی‌گرم برگرم) در شرایط عدم تنش و کاربرد کمپوست به‌دست آمد و با افزایش شدت تنش از میزان آن کاسته شد و کم‌ترین آن (5/763) در تنش شدید و عدم کاربرد کود به‌دست آمد. همین روند برای میزان کلروفیل کل نیز مشاهده شد. بیش‌ترین مقدار آنزیم‌های کاتالاز، آسکوربات پراکسیداز و پلی‌فنل اکسیداز در شرایط تنش شدید و عدم کاربرد کود و کم‌ترین آن‌ها در 100 درصد ظرفیت زراعی و کاربرد کمپوست به‌دست آمد. بیش‌ترین مقدار پرولین در تنش شدید و عدم کاربرد کود (20/213 میکرومول بر گرم وزن تر) بود که اختلاف معنی‌داری با سایر ترکیبات تیماری داشت. تنش خشکی وزن خشک در گیاه گاوزبان را متأثر کرده و آن را کاهش داد و بیش‌ترین میزان عملکرد خشک (13482/6کیلوگرم در هکتار) در سطح آبیاری شاهد به‌دست آمد که اختلاف معنی‌داری با سطح تنش ملایم (80 درصد ظرفیت زراعی) نداشت. به‌طورکلی در شرایط تنش خشکی، تولید و میزان پرولین و آنزیم‌های پاک کننده پراکسید هیدروژن و رادیکال‌ها افزایش می‌یابد و با توجه به نتایج به‌دست آمده، جهت داشتن عملکرد خشک قابل قبول از گاو زبان، آبیاری تا 80 درصد ظرفیت زراعی مناسب به‌نظر می‌رسد.

واژه‌های کلیدی: آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی، تنش خشکی، کمپوست، ورمی کمپوست، کلروفیل

مقدمه

خشکی، یکی از تنش‌های محیطی، مهم‌ترین عامل محدودکننده تولید گیاهان در اکثر زمین‌های کشاورزی دنیا است (40). خشکی مانع فتوسنتز گیاهان، به سبب تغییر درمحتوای و اجزای کلروفیل و آسیب به دستگاه فتوسنتز می‌شود (32). علاوه بر این، مانع از فعالیت‌های فتوشیمیایی گیاه و باعث کاهش فعالیت آنزیم‌های موجود در چرخه کالوین در فتوسنتز می‌شود (30). در نتیجه، گیاهان با استفاده از برخی از استراتژی‌ها با این تنش مقابله می‌کنند. در پاسخ به تنش خشکی، آبسیزیک اسید (ABA) تولید می‌شود و باعث تحریک بسته شدن روزنه‌ها می‌شود، درنتیجه موجب کاهش از دست دادن آب و محدودیت تثبیت CO_2 و کاهش احیاء $NADP^+$ در چرخه کالوین می‌شود. افزایش این شرایط نامطلوب، باعث شکل‌گیری گونه‌های اکسیژن فعال (ROS) مانند H_2O_2 (پراکسید هیدروژن)، O_2 (سوپراکسید) و رادیکال OH (هیدروکسیل) از طریق افزایش انتقال الکترون به مولکول اکسیژن می‌شود (7). آنتی‌اکسیدان‌های غیرآنزیمی شامل بتاکاروتن، اسید آسکوربیک (AA)، آلفا توکوفرول (α- toc)، گلوتاتیون (GSH) و آنزیمی شامل سوپراکسید دیسموتاز (SOD)، گایاکول پراکسیداز (GPX)، آسکوربات پراکسیداز (APX)، کاتالاز(CAT)، پلی‌فنول‌اکسیداز (PPO) و گلوتاتیون ردوکتاز می‌باشد (43). کمبود آب، سبب آسیب به رنگیزه‌ها و پلاستیدها، کاهش کلروفیل‌ها و کاروتنوئیدها و کاهش ضخامت تیلاکوئیدها در اغلب گیاهان می‌گردد (20). زمانی‌که گیاه در معرض تنش خشکی قرار بگیرد تجزیه پروتئین‌ها و درنتیجه افزایش آمینواسیدها و آمیدها

1- دانشجوی سابق کارشناسی ارشد گیاهان دارویی، دانشگاه زابل
2- استادیار گروه زراعت، دانشگاه زابل
(*- نویسنده مسئول: Email: asirousmehr@uoz.ac.ir)
3- دانشیار گروه بیوتکنولوژی و اصلاح نباتات، دانشگاه زابل

تسریع می‌شود. یکی از این آمینواسیدها پرولین است (12). پرولین از طریق حفظ ظرفیت آب‌گیری در سیتوپلاسم سلول منجر به حفظ ماکرومولکول‌ها از جمله پروتئین‌ها و برخی آنزیم‌های سیتوپلاسمی و میتوکندریایی می‌شود تا از تشکیل اشکال نامطلوب و یا قطعه قطعه شدن آن‌ها جلوگیری به‌عمل آید (19). به‌نظر می‌رسد که تجمع پرولین آزاد یک پاسخ متداول به تنش در گیاهان عالی باشد (تحمل تنش). البته اسیدهای آمینه دیگری نیز تحت تنش‌های خشکی و شوری انباشته می‌شوند، اما درجه تغییرات آن‌ها با تجمع پرولین که ظرف مدت کوتاهی پس از اعمال تنش به سطوح خیلی بالا می‌رسد قابل مقایسه نیست (23).

در نظام‌های کشاورزی پایدار استفاده از کودهای زیستی، به‌خصوص در خاک‌های فقیر از عناصر غذایی، از اهمیت ویژه‌ای در افزایش تولید و حفظ کیفیت خاک برخوردار است (7 و 39). یکی از نیازهای مهم در برنامه‌ریزی‌های زراعی به‌منظور حصول عملکرد بالا و کیفیت مطلوب، ارزیابی سیستم‌های تغذیه گیاهان است (11).

در تولید گیاهان دارویی علاوه بر کمیت، کیفیت تولید نیز از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. در یک اکوسیستم زراعی با عملکرد بالا در صورت نامطلوب بودن کیفیت، موفقیتی حاصل نشده است. مواد مؤثره گیاهان دارویی ممکن است به‌طور مثبت یا منفی به کودها پاسخ بدهند که این موضوع مستلزم انجام مطالعات تغذیه‌ای می‌باشد (18). ورمی کمپوست حاوی میکروارگانیسم‌های هوازی مفید مانند ازتوباکتری‌ها بوده و از طرفی دیگر، عاری از باکتری‌های غیر هوازی، قارچ‌ها و میکروارگانیسم‌های پاتوژن می‌باشد (6). ورمی کمپوست از موادی پیت مانند همراه با خلل و فرج، ظرفیت هوادهی، زهکشی و ظرفیت نگهداری آب بالا ساخته شده که دارای سطوح زیاد برای جذب بالای مواد غذایی می‌باشند. در مقایسه با مواد مادری اولیه، ورمی کمپوست ها دارای نمک محلول کم‌تر، ظرفیت تبادل کاتیونی بیش‌تر و میزان هیومیک اسید بیش‌تری می‌باشند (10). ورمی کمپوست‌ها دارای عناصر غذایی مانند فسفر، پتاسیم، کلسیم و منیزیم به فرمی هستند که به آسانی برای گیاه قابل جذب و دسترسی است (33). تغذیه خوب گیاهان در مقاومت آن‌ها به انواع تنش‌های زنده و غیر زنده نقش بسیار مؤثری دارد. گیاهی که خوب تغذیه شده و به مقدار کافی عناصر را دریافت کرده باشد، مقاومت بهتری به خشکی خواهد داشت در این راستا کمیت و کیفیت محصول نیز تحت تأثیر قرار خواهد گرفت.

گاوزبان باغی با نام علمی *Borago officinalis* L. از خانواده Boraginaceae است. گل و به‌طور کلی اعضای مختلف گیاه دارای لعاب نسبتاً فراوان، در حدود 30 درصد است. اعضای سبز گیاه دارای نیترات پتاسیم می‌باشد. مواد دیگری نیز نظیر رزین‌ها، مالات کلسیم، مقدار جزئی اسانس، املاح منگنز، منیزیم، اسیدفسفریک و مقدار بسیار جزئی از آلانتوئین alantoine در آن یافت می‌شود (4). گزینش گیاهان در شرایط بدون تنش، تأثیری بر پاسخ به خشکی ندارد. بنابراین یک هدف اصلی در علوم گیاهی جدید برای سازگارکردن گیاهان به شرایط محیطی، درک مکانیسم‌های فیزیولوژیک مقاومت به تنش‌ها است. پیشرفت‌های به‌نژادی از نظر افزایش مقاومت به خشکی بدون این که با کاهش تولید یا کیفیت محصول روبرو باشد بسیار کند است. این آزمایش به‌منظور بررسی اثرات کمبود آب در مراحل مختلف رشد و سطوح کودهای آلی بر برخی صفات فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی گاوزبان به اجرا در آمد.

مواد و روش‌ها

این آزمایش به‌صورت کرت‌های خرد شده در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی با سه تکرار در زمستان سال 1389 در مزرعه تحقیقاتی دانشکده کشاورزی دانشگاه زابل اجرا گردید. تیمارها شامل سطوح تنش خشکی (کم‌آبی) به‌صورت شاهد یا 100درصد ظرفیت زراعی، تنش ملایم یا80 درصد ظرفیت زراعی و 60 درصد ظرفیت زراعی (تنش شدید) به‌عنوان عامل اصلی و مصرف کود آلی شامل شاهد (بدون مصرف کود)، مصرف 40 تن کمپوست در هکتار و مصرف 4 تن ورمی کمپوست در هکتار به‌عنوان عامل فرعی در نظر گرفته شدند. در قطعه زمینی که برای کشت در نظر گرفته شده بود، پس از انجام تجزیه خاک و عملیات خاک‌ورزی (یک هفته قبل از کاشت) شامل شخم، دیسک و تسطیح، کرت‌هایی به ابعاد 3×3 متر طبق نقشه کاشت آماده گردید. فاصله بین کرت‌ها نیم متر و بین بلوک‌ها 1/5 متر در نظر گرفته شد. مقدار هر یک از کودها قبل از کاشت اندازه‌گیری و در کرت‌های مربوطه با خاک مخلوط شده و سپس کاشت در مورخه 89/12/04 به‌روش دستی انجام شد. بذر مورد استفاده، از منابع معتبر از شهرستان اردبیل تهیه شد. فاصله بین ردیف‌های کاشت از یکدیگر 50 سانتی‌متر و فاصله بوته‌ها روی ردیف 30 سانتی‌متر بود. برای اندازه‌گیری رطوبت خاک از دستگاه TDR[1] استفاده شد و زمانی‌که رطوبت خاک به هر یک از مقادیر مشخص شده می‌رسید، آبیاری به روش کرتی انجام می‌شد. تنک کردن بوته‌ها در مرحله 4 برگی انجام گرفت و وجین علف‌های هرز در چند مرحله انجام گرفت.

زمانی‌که بیش از 50 درصد گل‌ها باز شده بودند، برداشت انجام شد. پس از برداشت (90/03/17)، گیاهان تازه و سبز را با ترازوی با دقت 0/01 گرم وزن کرده و سپس به‌طور طبیعی و در سایه روی پارچه توری و در دمای 25 درجه سانتی‌گراد به‌طور طبیعی خشک کرده و پس از ده روز وزن خشک کل بوته‌ها نیز مشخص شد، بنابراین به‌عنوان وزن تر و خشک کل در کرت و سپس برای هکتار محاسبه گردید.

1-Time Domain Reflectometry

جدول 1- خصوصیات فیزیکی و شیمیایی خاک محل آزمایش در عمق 30-0 سانتی‌متری

EC (دسی زیمنس بر متر)	pH	وزن ظاهری (گرم بر سانتی متر مکعب)	ماده آلی (درصد)	نیتروژن (درصد)	فسفر (قسمت در میلیون)	پتاسیم (قسمت در میلیون)	سدیم (قسمت در میلیون)	لای (درصد)	رس (درصد)	شن (درصد)	بافت خاک
1/5	8/3	1/49	0/81	0/05	9/45	8/7	434	20/4	48	31/6	رسی

جدول 2- برخی از مشخصات کمپوست و ورمی کمپوست مورد استفاده

	ماده آلی (درصد)	نیتروژن (درصد)	فسفر (درصد)	پتاسیم (قسمت در میلیون)	سدیم (قسمت در میلیون)	pH	EC (دسی زیمنس بر متر)	رطوبت (درصد)
کمپوست	19/6	1	0/38	1770	5844	7/7	8/1	15
ورمی کمپوست	38	1/6	1/3	626	674	8/1	5/6	9

اندازه‌گیری شاخص کلروفیل برگ‌ها با استفاده از دستگاه کلروفیل‌سنج SPAD 502 [1](ساخت کارخانه Minolta ژاپن) انجام گرفت. فلورسانس کلروفیل نیز با استفاده از دستگاه فلورومتر مدل(Hansatech-V.D.C12) بعد از اعمال تنش اندازه‌گیری شد. این دستگاه جهت اندازه‌گیری میزان کارآیی کلروفیل در جذب نور و به‌کارگیری آن در فتوسنتز به‌کار می‌رود. برای اندازه‌گیری ابتدا گیره‌هایی به‌مدت 20 دقیقه به هر برگ متصل (جهت ایجاد فضای تاریک و غیر فعال در هر برگ) و سپس با دستگاه فلورسانس اندازه‌گیری شد. برای اندازه‌گیری کلروفیل a، b، کارتنوئید و کلروفیل کل، 0/1گرم از نمونه تر (که در مزرعه تهیه و در یخدان گذاشته و به آزمایشگاه منتقل شد) را در هاون تمیز ریخته، سپس بافت را با 20 میلی‌لیتر استون 80 درصد له کرده به‌مدت 5 دقیقه سانتریفوژ کرده، بخش رویی به ارلن مایر 100 میلی‌لیتری منتقل گردید. فرآیند تا زمانی‌که باقیمانده بافت بی‌رنگ شود تکرار شد. حجم را با استون 80 درصد به 100 میلی‌لیتر رسانده و سپس جذب محلول در طول موج‌های480، 510، 645، 663 و 652 نانومتر خوانده شد (شاهد اسپکتروفتومتری استون 80 درصد است). در نهایت با استفاده از فرمول‌های زیر مقادیر مقدار کلروفیل a، b، کارتنوئید و کلروفیل کل محاسبه شد (35).

$$\text{mg chl a}/g_t = 12.7\,(A_{663}) - 2.69\,(A_{645}) \times V/1000\,W$$
$$\text{mg chl b}/g_t = 22.9\,(A_{645}) - 4.68\,(A_{663}) \times V/1000\,W$$
$$\text{mg chl}_{tatol}/g_t = 20.2\,(A_{645}) - 8.02\,(A_{663}) \times V/1000\,W$$
$$\text{mg cartenoid}/g_t = 7.6\,(A_{480}) - 1.49\,(A_{510}) \times V/1000\,W$$

A: جذب طول موج بر حسب نانومتر، W: وزن تر بافت برحسب گرم، g_t : بافت برحسب گرم و V: حجم نهایی کلروفیل و کارتنوئید در استون 80 درصد می باشد.

جهت اندازه‌گیری پرولین از روش بیتز و همکاران (13) استفاده شد. 0/2 گرم از نمونه برگ تر به‌همراه 10 میلی‌لیتر اسید سولفوسالیسیلیک 3% در هاون کوبیده و از کاغذ صافی واتمن شماره 2 عبور داده شدند. به 2 میلی‌لیتر از این محلول، 2 میلی‌لیتر اسید استیک گلایسال و 2 میلی‌لیتر اسید نایین هیدرین اضافه و به‌مدت یک ساعت در حمام بن ماری در دمای 100 درجه سانتی گراد قرار داده شدند. 4 میلی‌لیتر تولوئن به این نمونه اضافه و در نهایت میزان جذب نوری در 520 نانومتر در دستگاه اسپکتروفتومتر قرائت گردید. میزان پرولین استخراجی بر اساس میکرومول بر گرم وزن تر از جدول استاندارد به‌دست آمد.

برای اندازه‌گیری آنزیم کاتالاز 50 میکرولیتر عصاره آنزیمی، 600 میکرولیتر بافرفسفات سدیم (pH=7)، 0/15 میکرولیتر EDTA، 549/85 میکرولیتر آب مقطر را در تیوپ ریخته و 300 میکرولیتر آب اکسیژنه به آن اضافه شد و بلافاصله در دستگاه طیف‌سنج نوری با طول موج 240 نانومتر میزان جذب آن ثبت گردید و پس از سپری‌شدن زمان یک دقیقه دوباره میزان جذب یادداشت گردید.

تغییرات جذب به‌دست آمده در زمان یک دقیقه، به ضریب خاموشی مولی این واکنش که برابر 36 مول بر سانتی متراست تقسیم شد و فعالیت آنزیمی بر حسب واحد (Unit=U) در گرم وزن تر بیان شد (14). برای اندازه‌گیری آنزیم آسکوربات‌پراکسیداز 50 میکرولیتر عصاره آنزیمی، 37/5 میکرولیتر آسکوربات، 1118/85 میکرولیتر آب در تیوپ ریخته شد و 1/5 میکرولیتر آب اکسیژنه به آن اضافه شد و بلافاصله در دستگاه طیف‌سنج نوری با طول موج 290 نانومتر میزان جذب آن یادداشت و پس از سپری‌شدن مدت زمان یک دقیقه، به ضریب خاموشی مولی این واکنش که برابر 2/8 میلی مول بر سانتی‌متر است تقسیم شد و فعالیت آنزیمی بر حسب واحد در گرم وزن تر بیان شد (31).

1- Soil and plant analysis development

جدول ٤- اثرات متقابل تنش خشکی و کودهای آلی بر رنگدانه های فتوسنتزی، فعالیت آنتی اکسیدانی($U.g^{-1}FW$) و پرولین در گیاه گاوزبان

ظرفیت زراعی	کودهای آلی	کلروفیل a (میلی گرم بر گرم)	کلروفیل b (میلی گرم بر گرم)	کارتنوئید (میلی گرم بر گرم)	کلروفیل کل (میلی گرم بر گرم)	کاتالاز	آسکوربات پراکسیداز	پلی فنل اکسیداز	پرولین (میکرومول برگرم)
٪۱۰۰	شاهد	۷/۸۴۷ d	۲/۹۸ c	۱ cd	۱۱/۵۲۳ de	۰/۰۰۳ d	۰/۰۱ c	۰/۰۰۵۳ c	۶/۶۵۷ d
	کمپوست	۱۱/۳۸۳a	۴/۱۹۷ a	۱/۷۳۳ a	۱۷/۹ a	۰/۰۰۱۳ e	۰/۰۰۵ d	۰/۰۰۲۳ e	۴/۰۸۷ e
	ورمی کمپوست	۱۰/۲۵ b	۴/۱۳۳ ab	۱/۴ b	۱۶/۵۳۳ b	۰/۰۰۱۳ e	۰/۰۰۵۳ d	۰/۰۰۴ d	۵/۷۲ de
٪۸۰	شاهد	۶/۸۸۳ e	۲/۳۲۳ de	۰/۸۶۳ d	۱۰/۲۳۳ f	۰/۰۰۶۳ b	۰/۰۱۶۷ b	۰/۰۰۸۷ b	۹/۱۲۷ c
	کمپوست	۱۰/۴۸۷b	۴/۲۳ a	۱/۳ b	۱۶/۱۶۷ b	۰/۰۰۳ d	۰/۰۰۸۳ cd	۰/۰۰۴ d	۶/۵۱۳ d
	ورمی کمپوست	۸/۹۷۷ c	۳/۶۶۷ b	۱/۰۳۳ c	۱۴/۲۳۳ c	۰/۰۰۵ bc	۰/۰۱۰۷ c	۰/۰۰۶ c	۷/۰۰۳ d
٪۶۰	شاهد	۵/۷۶۳ f	۲/۱۰۳ e	۰/۵۶۷ e	۹ g	۰/۰۰۸۸ a	۰/۰۳۳۳ a	۰/۰۱۱۳ a	۲۰/۲۱۳ a
	کمپوست	۸/۰۸ d	۲/۷۶۷ cd	۱/۰۱۷ c	۱۲/۵ d	۰/۰۰۴۷ c	۰/۰۱۶ b	۰/۰۰۶ c	۱۲/۸۸۷ b
	ورمی کمپوست	۶/۳۳۳ ef	۲/۴۸۷cde	۰/۸۶ d	۱۰/۴۳۳ ef	۰/۰۰۶ bc	۰/۰۱۸۳ b	۰/۰۰۷۷ b	۱۴/۶۰۷ b

حروف مشابه در هر ستون بیان‌گر عدم اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال مربوطه در جدول تجزیه واریانس است.

جدول ۳- تجزیه واریانس صفات مورد بررسی در گاوزبان باغی

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات										
		کلروفیل سنجی	فلورسانس کلروفیل	کلروفیل a	کلروفیل b	کارتنوئید	کلروفیل کل	کاتالاز	آسکوربات پراکسیداز	پلی فنل اکسیداز	گایاکول پراکسیداز	پرولین	عملکرد خشک
تکرار	۲	۰/۶۱۲^{ns}	۰/۰۰۰۱^{ns}	۰/۸۴۴^{ns}	۰/۱۷۰^{ns}	۰/۰۴۷*	۰/۴۷۲*	۷/۶۹۴^{ns}	۸/۴۸۱^{ns}	۲/۹۲۶**	۰/۴۸۱^{ns}	۰/۸۳۶**	۲۴۹۰/۸۹**
تنش خشکی	۲	۲۰۲/۷۴۹**	۰/۱۰۱**	۲۲/۴۰۶**	۴/۱۶۹**	۰/۷۱۷**	۵۰/۱۱۴**	۴۸/۸۶۱**	۵۸۳/۲۵۹**	۴۴/۴۸۱**	۳/۳۷**	۲۷۳/۷۵۱**	۴۴۳۳۸/۴۴**
خطای۱	۴	۰/۷۱۴	۰/۰۰۰۱۳	۰/۳۹۷	۰/۱۳۱	۰/۰۰۶	۰/۰۶۴	۲/۶۳۹	۴/۹۲۶	۰/۱۴۸	۰/۲۰۴	۰/۶۴۰	۲۷۵۰/۰۱
نوع کود	۲	۴۲/۰۶۷**	۰/۰۰۵**	۲۲/۳۹۵**	۳/۹۰۹**	۰/۶۵۷**	۶۴/۶۳۷**	۲۱/۵۲۸**	۲۷۰/۷۰۴**	۴۲/۷۰۴**	۱/۵۹۳**	۴۱/۰۶۴**	۵۶۷۲۹/۹۶**
تنش×کود	۴	۰/۵۷۸^{ns}	۰/۰۰۰۱^{ns}	۰/۷۹۲$^{٪۱۰}$	۰/۳۵۵*	۰/۰۲۵$^{٪۱۰}$	۲/۹۶۹**	۱/۶۳۹**	۳۶/۸۱۵**	۱/۴۲۶**	۰/۱۴۸^{ns}	۶/۹۱۸**	۱۶۷۰/۴۵**
خطای ۲	۱۲	۱/۰۰۰	۰/۰۰۰۱۶۷	۰/۲۷۵	۰/۰۸۸	۰/۰۱۰	۰/۲۳۹	۰/۳۲۴	۲/۱۱۱	۰/۴۰۷	۰/۰۷۴	۰/۶۶۱	۳۷۷/۸۶
ضریب تغییرات(٪)		۲/۲۵	۱/۶۲	۶/۲۱	۹/۲۶	۹/۰۱	۳/۷۱	۱۲/۹۷	۱۰/۵۷	۱۰/۳۸	۱۵/۶۴	۸/۴۳	۱۶/۱۹

^{ns}، * و ** به ترتیب غیر معنی‌دار و معنی‌دار در سطح احتمال ۵ و ۱ درصد.

برای سنجش فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز (GPX) 50 میکرولیتر عصاره آنزیمی، 800 میکرولیتر بافر سدیم، 0/2 میکرولیتر EDTA، 50 میکرولیتر گایاکول، 799/8 آب به لوله آزمایش اضافه شد و300 میکرولیتر آب اکسیژنه به آن اضافه گردید و بلافاصله در دستگاه طیف‌سنج نوری با طول موج 470 نانومتر میزان جذب آن قرائت گردید و پس از سپری‌شدن مدت یک دقیقه دوباره میزان جذب ثبت گردید. تغییرات جذب به دست آمده در زمان یک دقیقه، به ضریب خاموشی مولی که برابر 26/6 میلی مول بر سانتی متر است تقسیم شد و فعالیت آنزیمی بر حسب واحد در گرم وزن تر بیان شد (41). برای سنجش آنزیم پلی‌فنل اکسیداز 2/8 میلی‌لیتر بافر فسفات سدیم (pH=6/8)، 100 میکرولیتر عصاره آنزیمی و 100 میکرولیتر پیروگالول اضافه گردید. تغییرات جذب نور در طول موج 420 نانومتر اندازه‌گیری شد. تعیین فعالیت آنزیم پلی‌فنل اکسیداز بر اساس تولید پورپوروگالین محاسبه می‌شود که ضریب خاموشی این تبدیل برابر 2/47 لیتر بر میلی‌مول بر سانتی‌متر است (27 و 36).

تجزیه واریانس داده‌ها و مقایسه میانگین‌ها، و رسم نمودارها به‌ترتیب با کمک نرم‌افزارهای MSTATC و Excel صورت گرفت. داده‌های آنزیمی به‌علت کوچکی در 1000 ضرب گردیدند. مقایسه میانگین‌ها با روش LSD در سطح احتمال مربوطه در جدول تجزیه واریانس انجام شد.

نتایج و بحث

کلروفیل و فلورسانس کلروفیل

نتایج تجزیه واریانس نشان می‌دهد که اثرات تنش خشکی، کودهای آلی در سطح احتمال 1 درصد معنی دار است در حالی که برهم کنش تنش خشکی×کودهای آلی معنی‌دار نمی‌باشد (جدول3).

بررسی شاخص کلروفیل ارقام در سطوح کم‌آبی نشان داد که با افزایش محدودیت آب، شاخص SPAD عدد کوچک‌تری را نشان می دهد که حاکی از کاهش مقدار کلروفیل است. با توجه به نتایج مقایسه میانگین تنش خشکی (جدول 5) بیش‌ترین میانگین شاخص کلروفیل (49/84) در تیمار 100 درصد ظرفیت زراعی به‌دست آمد و با سطوح دیگر تنش اختلاف معنی‌داری داشت. خشک‌شدن بافت‌های برگ نه تنها مانع ساخته‌شدن کلروفیل می‌شود بلکه به‌نظر می‌رسد که تخریب کلروفیل را هم باعث می‌شود. خشکی باعث شکسته شدن کلروپلاست و کاهش میزان کلروفیل می‌گردد (2). از آن‌جایی‌که کلروفیل و پرولین هر دو از پیش ماده مشترکی به نام گلوتامات سنتز می‌شوند بنابراین می‌توان گفت افزایش سنتز پرولین در شرایط تنش خشکی منجر به کاهش سنتز کلروفیل می‌گردد (34). با توجه جدول 6، بیش‌ترین میانگین کلروفیل 46/57 با کاربرد کمپوست به‌دست آمد. سطح کودی ورمی کمپوست با میانگین 44/47 در مرتبه بعدی قرار گرفت که اختلاف معنی‌داری با سطح کودی کمپوست داشت و تیمار شاهد (عدم کود) با 42/24 کم‌ترین مقدار را داشت.

اثر تنش خشکی و نوع کود بر میزان فلورسانس کلروفیل در سطح احتمال 1 درصد معنی‌دار و برهم‌کنش دو فاکتور مورد مطالعه غیر معنی‌دار بود (جدول3). جدول 5 نشان می‌دهد که در شاهد (100 درصد ظرفیت زراعی)، 80 و 60 درصد ظرفیت زراعی به‌ترتیب مقادیر فلورسانس کلروفیل برابر با 0/844، 0/744 و 0/633 شد که نشان‌دهنده افزایش میزان فلورسانس کلروفیل با افزایش سطح تنش خشکی می‌باشد. فتوسیستم II حساس‌ترین بخش به تنش است و کمپلکس دریافت‌کننده اکسیژن و مرکز واکنش در این سیستم بیش‌ترین خسارت را از خشکی می‌بینند (22). اثر نوع کود بر فلورسانس کلروفیل (جدول6) مشخص شد که کم‌ترین میزان فلورسانس کلروفیل از سطح کودی کمپوست به میزان 0/765 و در شاهد (عدم کود) مقدار آن 0/717 به‌دست آمد که حاکی از اثر کودهای آلی در کاهش اثرات تنش خشکی است.

رنگدانه‌های فتوسنتزی

نتایج تجزیه واریانس نشان می‌دهد که اثرات تنش خشکی و کودهای آلی در سطح احتمال 1 درصد و اثرات متقابل این دو فاکتور برای کلروفیل a و کارتنوئید در سطح احتمال 10 درصد و برای کلروفیل b در سطح احتمال 5 درصد و برای کلروفیل کل در سطح احتمال 1 درصد معنی‌دار می‌باشد (جدول3).

مقایسه میانگین نتایج مربوط به اثرات متقابل خشکی و کودهای آلی نشان داد که بیش‌ترین میزان کلروفیل a (11/383)، b (4/197)، کارتنوئید (1/337) و کلروفیل کل (17/9) در 100درصد ظرفیت زراعی و در طی استفاده از کمپوست به‌دست آمد (جدول4).

انواع اکسیژن‌های مختلف که طی تنش خشکی تولید می‌شود، باعث کاهش رنگیزه‌های فتوسنتزی می‌گردد (37). میزان کلروفیل در گیاهان زنده یکی از فاکتورهای مهم حفظ ظرفیت فتوسنتزی است (26).

در این بررسی در اثر تنش خشکی، میزان کلروفیل a، b، کارتنوئید و کلروفیل کل به شدت کاهش یافت، به‌نظر می‌رسد این کاهش در اثر تنش خشکی، به‌علت افزایش تولید رادیکال‌های اکسیژن باشد، که این رادیکال‌های آزاد باعث پراکسیداسیون (42) و درنتیجه تجزیه این رنگیزه می‌گردد (38) این مسئله ممکن است به‌دلیل افزایش فعالیت کلروفیلاز به هنگام تنش خشکی باشد و کلروفیل a حساس‌تر از b است و بیش‌تر تخریب می‌شود (15). در اثر خشکی تشکیل پلاستیدهای جدید کلروفیل a،کلروفیل b، کاروتن، ویولوگزانتین و نئوگزانتین کاهش می‌یابد و نسبت کلروفیل a به b تغییر می‌کند (5).

جدول 5- مقایسه میانگین اثر تنش بر برخی صفات اندازه گیری شده گیاه گاوزبان

	100% ظرفیت زراعی	80% ظرفیت زراعی	60% ظرفیت زراعی
عملکردخشک کل بوته(تن بر هکتار)	13/482 a	10/092 ab	9/306 b
شاخص کلروفیل (SPAD)	49/841 a	42/439 b	40/993 c
فلورسانس کلروفیل (Fv/Fm)	0/844 a	0/744 b	0/633 c
گایاکول پراکسیداز ($U.g^{-1}FW$)	0/0011 b	0/0018 ab	0/0023 a

حروف مشابه در هر ردیف بیان‌گر عدم اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال مربوطه در جدول تجزیه واریانس است.

جدول 6- مقایسه میانگین اثر کود بر برخی صفات اندازه‌گیری شده گیاه گاوزبان

	شاهد (بدون کود)	کمپوست	ورمی کمپوست
عملکردخشک کل بوته(تن بر هکتار)	8/36 b	13/371 a	11/148 a
شاخص کلروفیل (SPAD)	42/242 c	46/566 a	44/466 b
فلورسانس کلروفیل (Fv/Fm)	0/717 c	0/765 a	0/739 b
گایاکول پراکسیداز ($U.g^{-1}FW$)	0/0022 a	0/0014 b	0/0016 b

حروف مشابه در هر ردیف بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال مربوطه در جدول تجزیه واریانس است.

آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و پرولین

با توجه به جدول تجزیه واریانس 3، اثرات تنش خشکی و کودهای آلی برای هر 4 آنزیم مورد بررسی و پرولین در سطح احتمال 1 درصد و اثرات متقابل تنش خشکی و کودهای آلی برای آنزیم های کاتالاز، آسکوربات پراکسیداز و پلی‌فنل اکسیداز و هم‌چنین پرولین در سطح احتمال 1 درصد معنی‌دار شد اما برای آنزیم گایاکول پراکسیداز اثرات متقابل این دو فاکتور غیر معنی‌دار به‌دست آمد.

مقایسه میانگین نتایج مربوط به اثرات متقابل خشکی و کودهای آلی نشان داد که بیش‌ترین فعالیت آنزیمی برای کاتالاز، آسکوربات پراکسیداز و پلی‌فنل اکسیداز و پرولین مربوط به تیمار 60 درصد ظرفیت زراعی در تیمار کودی شاهد (عدم کود) به‌دست آمد (جدول 4). آنزیم کاتالاز از دسته پروتئین‌های آهن‌دار محسوب می‌شود و هنگامی در سلول‌های گیاهی و جانوری وارد عمل می‌شود که مقدار ماده پراکسید هیدروژن (H_2O_2) در محیط زیاد باشد. گرات و همکاران (21) بیان نموده‌اند که کاتالاز سلول‌ها را از اثرات پراکسید هیدروژن محافظت می‌کند. کاتالاز، پراکسیدهیدروژن را به آب و اکسیژن تبدیل می‌کند (24). آسکوربات پراکسیداز دارای چندین نقش اساسی در فرآیندهای فیزیولوژیکی گیاه مانند رشد و نمو و متابولیسم است و هم‌چنین به‌عنوان یک احیاکننده برای خیلی از رادیکال‌های آزاد و به‌خصوص پراکسید هیدروژن عمل می‌کند. بنابراین خسارت ناشی از تنش اکسیداتیو را به کم‌ترین مقدار می‌رساند (9و 16).

تنش خشکی، موجب افزایش تولید انواع اکسیژن واکنش‌گر و در نتیجه افزایش دفاع آنتی‌اکسیدانی می‌شود. این آنزیم‌ها نقش بسیار مهمی در غیرفعال‌کردن رادیکال‌های آزاد اکسیژن در سلول گیاه دارند. بسته به گونه گیاهی و شدت تنش، میزان فعالیت آن‌ها در گیاه تغییر می‌کند (8). مشاهدات نشان داد که با افزایش شدت تنش میزان پرولین در گیاه افزایش یافته است. مدارک به‌دست آمده نشان می‌دهند که اغلب آمینواسیدها مثل پرولین ممکن است نقش محافظت کننده برای تیلاکوئیدهای کلروپلاست و دیگر سیستم‌های غشایی تحت شرایط تنش داشته باشند (25). در بررسی اثرسطوح تنش خشکی روی گیاه آویشن (*Thymus vulgaris*) با افزایش تنش خشکی میزان پرولین افزایش یافت (1). بیش‌ترین میانگین پرولین (15/902میکرومول بر گرم وزن تر) در سطح تنش 60 درصد ظرفیت زراعی به‌دست آمد و کم‌ترین آن (5/488 میکرومول بر گرم وزن تر) مربوط به تیمار 100 درصد ظرفیت زراعی (بدون تنش) بود. افزایش پرولین در گیاه هنگام تنش، نوعی مکانیسم دفاعی است. پرولین از طریق تنظیم اسمزی، جلوگیری از تخریب آنزیم‌ها و پاک کردن رادیکال‌های هیدروکسیل، بردباری و تحمل گیاه را در برابر تنش‌ها افزایش می‌دهد (28). کلروفیل و پرولین هر دو از پیش ماده گلوتامات به‌وجود می‌آیند. در شرایط خشکی میزان پرولین برگ افزایش پیدا می‌کند و شاید یکی از دلایل کاهش میزان کلروفیل، افزایش سنتز پرولین باشد (3).

عملکرد خشک کل بوته (گل و اندام هوایی)

نتایج تجزیه واریانس (جدول 3) نشان می‌دهد که اثرات تنش خشکی و کودهای آلی برای عملکرد خشک در سطح احتمال 1 درصد معنی‌دار و اثرات متقابل این دو فاکتور غیر معنی‌دار می‌باشد. در بررسی اثر سطوح تنش خشکی بر میانگین میزان عملکرد خشک (جدول 5) مشخص شد که در سطح بدون تنش(شاهد)، بیش‌ترین میزان عملکرد خشک تولید گردید که اختلاف معنی‌داری با سطح 80

درصد ظرفیت زراعی نداشت. سطح 60 درصد ظرفیت زراعی کم‌ترین میزان عملکرد خشک را داشت. نتایج حاصل از این مطالعه نشان می‌دهد که همراه با افزایش تنش کم‌آبی، میزان ماده خشک گیاه مورد مطالعه کاهش یافت. وقتی گیاهان در شرایط تنش کم‌آبی قرار می‌گیرند، انعطاف‌پذیری دیواره سلول‌های در حال رشد اندام‌ها، معمولاً کم می‌شود و توسعه سلولی و رشد را کاهش می‌دهد (17). کاهش میزان آب در محیط جذب، باعث اختلال در انتقال مواد غذایی لازم برای رشد و عدم تولید ماده خشک جدید شده و کاهش رشد را به دنبال دارد. هم‌چنین کاهش جذب آب از راه ریشه‌ها همراه با کاهش تورژسانس سلول بوده و موجبات کاهش تقسیم سلولی و مهار رشد سلولی را فراهم می‌کند. در طی تنش کم‌آبی، فتوسنتز به دلیل بسته شدن روزنه‌ها محدود می‌شود (44).

در اثر نوع کود بر عملکرد خشک (جدول6) بیش‌ترین میزان عملکرد از کاربرد کمپوست به‌دست آمد و کم‌ترین آن مربوط به عدم کاربرد کود (شاهد) بود. کاربرد کمپوست در خاک به‌طور عام به‌منظور حفظ و افزایش ثبات و پایداری خاک‌دانه‌ها، حاصل‌خیزی و باروری خاک است که در دهه‌های گذشته از اهمیت ویژه‌ای برخوردار بوده است. از این طریق علاوه بر کاهش هزینه‌های اضافی دفع مواد ضایعات، موجب بهره‌وری بیش‌تر و سودمندی از آن‌ها خواهد شد (29).

نتیجه‌گیری

به‌طورکلی از نتایج این آزمایش استنتاج می‌شود که در گیاه گاوزبان، با افزایش تنش خشکی از میزان عملکرد ماده خشک کاسته می‌شود ولی آبیاری تا 80 درصد ظرفیت زراعی ماده خشک قابل قبولی تولید می‌کند. با کاربرد کمپوست ماده خشک بیش‌تری به‌دست آمد. در شرایط تنش اکسیداتیو آنزیم‌های کاتالاز، آسکوربات پراکسیداز، پلی‌فنل اکسیداز و گایاکول پراکسیداز نقش موازی و مشابهی را در سیستم دفاعی گیاه ایفا می‌نمایند، به‌طوری که وظیفه هر چهار آنزیم‌ها، سم‌زدایی و تجزیه پراکسید هیدروژن تولید شده در سلول‌ها می‌باشد. در تحقیق حاضر، فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز تحت تنش‌های کم‌آبی ، افزایش معنی‌داری نیافت. به‌نظر می‌رسد که در گیاه گاوزبان، این آنزیم فعالیت کمی داشته و بنابراین نقش کم‌رنگی در محافظت گیاه از تنش خشکی ایفا می‌کند. در عوض، فعالیت بقیه آنزیم‌های تحت شرایط خشکی افزایش یافته و از سلول‌های گیاهی در برابر گونه‌های اکسیژن فعال محافظت می‌کنند. بیش‌ترین میزان کلروفیل a، b، کارتنوئید و کلروفیل کل در شرایط بدون تنش کم آبی و کاربرد کمپوست به‌دست آمد. هم‌چنین با افزایش تولید پرولین در شرایط تنش خشکی در این آزمایش می‌توان اظهار داشت که گاوزبان راه‌کار تحمل به تنش را به اجرا گذاشته است.

منابع

1- بابایی ک.، امینی م.، مدرس ثانوی ع. و جباری ر. 1389. اثر تنش خشکی بر صفات مورفولوژیک، میزان پرولین و درصد تیمول در (*Thymus vulgaris* L.) آویشن. فصلنامهٔ علمی-پژوهشی تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران، 26(2).

2- حیدری شریف‌آباد، ح. 1379. گیاه، خشکی و خشکسالی، انتشارات موسسه تحقیقات جنگلها و مراتع، تهران، صفحه 200.

3- ربیعی و. 1382. واکنش‌های فیزیولوژیکی و مورفولوژیکی برخی ارقام انگور به تنش خشکی. رساله دکتری رشته علوم باغبانی. دانشگاه تهران، صفحه 125.

4- زرگری ع. 1375. گیاهان دارویی. انشارات دانشگاه تهران. جلد سوم. چاپ ششم. صفحه 511.

5- کافی م.، برزوئی ا.، صالحی م.، کمندی ع.، معصومی ع. و نباتی ج. 1388. فیزیولوژی تنش‌های محیطی در گیاهان. انتشارات جهاد دانشگاهی مشهد.

6- هاشمی‌مجد ک. 1389. تولید کمپوست و ورمی کمپوست از ضایعات آلی. انتشارات آییژ.

7- Abraham C.P., Viswagith V., Prabha S., Sundhar K., and Malliga P. 2007. Effect of coir pith based cyanobacterial basal and foliar biofertilizer on Baseella rubra L. Acta Agriculturae Slovenica. pp: 59-63.Academy of Science, 91: 11-17.

8- Apel K., and Hirt H. 2004. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress and signal transduction. Annual Review of Plant Biology, 55: 373-399.

9- Arora A., Sairam R.K., and Sriuastava G.C. 2002. Oxidative stress and antioxidative system in plants. Annual Review of Current Science, 82: 1227–1238.

10- Atiyeh R.M., Arancon N., Edwards C.A., and Metzger J.D., 2002. Incorporation of earthwormprocessed organic wastes into greenhouse container media for production of marigolds. Bioresource Technology, 81(2):103-108.

11- Ayala S., and Prakasa Rao E.V.S. 2002. Perspective of soil fertility management with a focus on fertilizer use for crop productivity, Current Science, 82(7):797-807.

12- Barker D.J., Sulivan C.Y., and Moser R.C. 1993. Water deficit effects on osmotic potential , cell wall elasticity,

and proline in five forage grasses. Agronomy Journal, 85:270-275.
13- Bates L. S., Waldren S. P., and Teare I. D. 1973. Rapid determination of free proline for water–stress studies. Plant and Soil, 39: 205-207.
14- Beers G.R., and Sizer I.V. 1952. A spectrophotometric method for measuring the break down of hydrogen peroxide by catalase. Journal of Biological Chemistry, 195: 133-140.
15- Boyer J.S. 1987. Plant productivity and environment potential for increasing crop plant productivity, genotypic selection. Science, 218: 443–448.
16- Cho U., and Seo N. 2005. Oxidative stress in Arabidopsis thalina exposed to cadmium is due to hydrogen proxide accumulation. Plant Science, 168:113-120.
17- Davis W.J., and Volkenburg E. 1995. The influence of water deficit on the factors controlling the daily pattern of growth of Bean. Journal of Experimental Botany, 54: 987-999.
18- Dufault R.J., Rushing J., Hassal R., Shepard B.M., Mc Cotcheon G., and Ward B. 2003. Infloence of fertilizer on growth and marker compound of field grown Echinacea species and feverfew. Scientia Horticulture, 98: 61-69.
19- Evan R.D., Black R.A., Loesher W.H., and Fellows R.J. 1992. Osmotic relations of the drought-tolerant shrub *Artimisia tridentata* in response to water stress. Plant Cell, and Environment,15: 49-59.
20- Follows R.J., and Boyer J.S. 1996. Structure and activity of chloroplasts of sunflower leaves having various water potentials. Planta, 132: 229-239.
21- Garratt L.C., Janagoudar B.S., Lowe K.C., Anthony P., Bower J.B., and Devey M.R. 2002. Salinity tolerance and antioxidant status in cotton cultures. Free Radical Biology and Medicine, 33:502-511.
22- Giardi M.T., Cona A., Geiken D., Kucera T., Masojidek J., and Mattao A.K. 1996. Long-term drought stress induced structural and functional reorganization of photosystem II. Planta, 199:118-125.
23- Gzik A. 1996. Accumulation of prolin and pattern of α- amino acids in sugar beet plants in response to osmotic, water and salt strees. Environmental and experimental botany, 36(1): 29-38.
24- Habibi D., Mashdi Akbar Boojar M., Mahmoudi A., Ardakani M.R., and Taleghani D. 2004. Antioxidative enzyme in sunflower subjected to drought stress. 4th International Crop Science Congress, pp:1-4.
25- Heber U., Tyankova L., and Santarius K.A. 1971. Stabilization and inactivation of biological membranes during freezing in the presence of amino acids. Biochim Biophys Acta, 241 (2); 578-592.
26- Jiang Y., and Huang N. 2001. Drought and heat sress injury to two cool-season turfgrasses in relation to antiaxdant metabolism and lipid peroxidation. Crop Science, 41: 436-442.
27- Kar M., and Mishra D. 1976. Catalase, proxidase, polyphenol oxidase activities during rice leaf senescence. Plant Physiology, 57: 315 - 9.
28- Kuznetsov W., and Shevyankova N.L. 1997. Stress responses of tobacco cells to high temperature and salinity. Proline accumulation and phosphorylation of polypeptides. Physiologia Plantarum, 100: 320-326.
29- Lalande R., Gagnon B., Simard R.R., and Cote D. 2000. Soil microbial biomass and enzyme activity following liquid hog manure in a long term field trial. Canadian Journal of Soil Sciences, 80: 263-269.
30- Monakhova O.F., and Chernyadev I.I. 2002. Protective role of kartolin-4 in wheat plants exposed to soil drought. Applied and Environmental Microbiology, 38: 373–380.
31- Nakano Y., and Asada K. 1981. Hydrogen peroxide is scavenged by ascarbate specific peroxidases in spinach Chloroplasts. Plant cell physiology, 22: 867-880.
32- Nayyar H., and Gupta D. 2006. Differential sensitivity of C3 and C4 plants to water deficit stress: Association with oxidative stress and antioxidants. Environmental and Experimental Botany, 58:106–113.
33- Orozco F.H., Cegarra J., Trujillo L.M., and Roig A. 1996. Vermicomposting of coffee pulp using the earthworm *Eisenia fetida*: effects on C and N contents and the availability of nutrients. Biology and Fertility of Soils, 22: 162-166.
34- Paleg L.G., and Spinall D. 1981. The Physiology and Biochemistry of Drought Resistance in Plant. Academic Press. New York, pp240.
35- Rangana S. 1979. Mannual for analysis of fruit and vegetable products. Tata McGraw Hill Co. Pvt.Ltd., New Delhi., pp. 73-76.
36- Resende M.L.V., Nojosa G.B.A., Aguilar M.A.G., Silva L.H.C., Perez J.O., Andrade G.C.G., Carvalho G.A., and Castro R.M. 2002. Induction of resistance in cocoa against *Crinipellis perniciose* and *Verticillium dahliae* by Acibenzolar-smethyl (BION). Plant Pathology. 51:621-628.
37- Sairam R.K., Deshmukh P.S., and Saxena D.C. 1998. Role of antioxidant systems in wheat genotypes tolerance to water stress. Biologia Plantarum, 41(3): 387-394.
38- Schutz M., and Fangmeir E. 2001. Growth and yield responses of spring wheat (*Triticum aestivum* L. cv.Minaret) to elevated CO_2 and water limitation. Environmental Pollution, 114:187-194.
39- Sharma A.K. 2004. Biofertilizers for sustainable Agriculture .Agrobios,India.351pp.
40- Tas S., and Tas B. 2007. Some physiological responses of drought stress in wheat genotypes with different ploidity in Turkiye. World Journal of Agricultural Sciences, 3: 178–183.
41- Urbanek H., Kuzniak-Gebarowska E., and Herka K. 1991. Elicitation of defense responses in bean leaves by

Botrytis cinerea polyglacturonase. Acta Physiol. Plant, 13: 43-50.
42- Wise R.R., and Naylor A.W. 1989. Chillingenhanced photo-oxidation, the peoxidative destruction of lipids during chilling injury to photosynthesis and ultrasracture. Plant Physiology, 83: 278-282.
43- Xu Y.C., Zhang J.B., Jiang Q.A., Zhou L.Y., and Miao H.B., 2006. Effects of water stress on the growth of *Lonicera japonica* and quality of honeysuckle. Zhong Yao Cai., 29(5): 420-423.
44- Yordanov I., and Tsonev T. 2003. Plant responses to drought and stress tolerance. Bulgarian Journal of Plant Physiology ,Special issue: 189- 206.