نشریه آب و خاک (علوم و صنایع کشاورزی)
جلد ۳۲، شماره ۶، بهمن-اسفند ۱۳۹۷، ص. ۱۲۰۵-۱۱۹۱

Journal of Water and Soil
Vol. 32, No. 6, Jan.-Feb. 2019, p. 1191-1205

اثر اسید هیومیک بر شاخص‌های فیزیولوژیکی کمبود آهن در گیاه کلزا (رقم هایولا ۳۰۸)

طالب نظری[۱]- مجتبی بارانی مطلق[۲*]- اسماعیل دردی پور[۳]- رضا قربانی نصرآبادی[۴]- سمیه سفیدگر شاهکلایی[۵]

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۰۴/۱۱
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۰۷/۱۵

چکیده

در این پژوهش، تأثیر کاربرد خاکی، محلول‌پاشی و مصرف همراه با آب آبیاری اسیدهیومیک بر فرآهمی آهن، انواع کلروفیل و آنزیم‌های گیاهی در گیاه کلزا (رقم هایولا ۳۰۸) مورد بررسی قرار گرفت. بدین منظور، آزمایشی در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۱۰ تیمار در ۴ تکرار به اجرا درآمد که تیمارها شامل مصرف خاکی اسیدهیومیک در سه سطح (۱، ۲ و ۴ گرم بر کیلوگرم خاک)، محلول‌پاشی اسیدهیومیک در سه سطح (۰/۱، ۰/۲ و ۰/۴ درصد)، همراه با آب آبیاری در سه سطح (۱۰۰۰، ۲۰۰۰ و ۴۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر) و تیمار شاهد بود. نتایج به‌دست آمده نشان داد که بیشترین مقدار آهن کل برگ مربوط به تیمار ۰/۴ درصد محلول‌پاشی و کمترین مقدار مربوط به تیمار شاهد بود. همچنین بیشترین مقدار آهن کل ساقه و آهن فعال به ترتیب با میانگین ۸۵ و ۴۴/۸۶ میلی‌گرم بر کیلوگرم مربوط به تیمار ۲۰۰۰ میلی‌گرم بر لیتر مصرف همراه با آب آبیاری اسیدهیومیک بود. بیشترین مقادیر کلروفیل a، b و کلروفیل کل به ترتیب با میانگین ۳/۵۸، ۱/۷۹ و ۵/۳۷ در تیمار محلول‌پاشی اسیدهیومیک باسطح ۰/۴ درصد دیده شد. بیشترین مقدار فعالیت آنزیم‌های گیاهی سوپراکسید دیسموتاز و گلوتاتیون پراکسیداز به ترتیب با میانگین ۴/۲۰ و ۱/۹۵ (Iu /gr.fw) مربوط تیمار ۰/۱ درصد محلول پاشی اسیدهیومیک و بیشترین فعالیت آنزیم کاتالاز با میانگین ۴/۴۶ (Iu /gr.fw) مربوط به تیمار ۱۰۰۰ میلی گرم در لیتر مصرف همراه با آب آبیاری بود. همچنین همبستگی منفی بین آنزیم‌های گیاهی با انواع کلروفیل و آهن فعال وجود داشت. آهن فعال و آنزیم‌های آنتی اکسیدان که نشان‌دهنده آهن درون سیتوپلاسم سلول‌اند، شاخص‌های مناسبی برای ارزیابی تحمل به کمبود آهن در مقایسه با سنجش آهن کل برگ می‌باشند.

واژه‌های کلیدی: آهن فعال، آنزیم‌های گیاهی، اسید هیومیک، کلروفیل

مقدمه

آهن اولین عنصر کم‌مصرف شناخته شده برای گیاهان زراعی است و بیش از تمام عناصر کم‌مصرف برای گیاهان مورد نیاز است. آهن در متابولیسم آنزیم‌ها (به‌عنوان فعال‌کننده آنها)، در متابولیسم پروتئین‌ها (پروتئین‌های سیتوکروم اکسیداز، کاتالاز، لگ هموگلوبین، پروتئین‌های Fe-S، فردوکسین و همچنین آنزیم‌های حاوی آهن مانند نیتروژناز و سوپراکسید دسیموتاز)، در ساخت کلروفیل، تکامل کلروپلاست، فتوسنتز، تنفس گیاه و واکنش‌های اکسایش کاهش و سوخت و ساز اسیدهای آلی (مانند اگزالیک، استیک، مالیک) نقش دارد (۴۲). همچنین آهن عامل مهمی در زدودن رادیکال اکسیژن فعال (ROS)[۶] است، زیرا برخی از آنزیم‌های آنتی اکسیدان حاوی آهن به صورت هم (کاتالاز، پراکسیداز و آسکوربات پراکسیداز) یا غیر هم (سوپراکسید دیسموتاز) هستند (۵۱). کمبود آهن موجب آسیب‌های بیوشیمیایی شدیدی شده و ضمن افزایش تولید گونه‌های اکسیژن فعال، سبب خسارات برگشت ناپذیر به ملکول‌های زنده و نیز موجب آسیب دیدگی زنجیره انتقال الکترون در کلروپلاست می‌شود. افزایش سطح پراکسید هیدروژن ممکن است نتیجه ناکافی بودن فعالیت آنزیم‌های حاوی آهن از جمله کاتالاز، پراکسیداز و آسکوربات پراکسیداز به علت دسترسی ناکافی به آهن باشد (۱۵). کمبود آهن سبب کاهش سنتز کلروفیل و بروز زرد برگی می‌شود. در کلروپلاست گیاهان دچار کمبود آهن، سرعت جذب دی اکسید کربن فتوسنتزی به دلیل کاهش ظرفیت فتوشیمیایی کاهش می‌یابد که در واقع یکی از دلایل مهم تنش اکسیداتیو می‌باشد. تنش اکسیداتیو باعث کاهش تولید کلروفیل می‌شود که پیامد آن، آسیب به دستگاه فتوسنتزی است (۴۲). برای معالجه کلروز آهن روش‌های مختلفی مورد بررسی قرار گرفته است از جمله استفاده از نمک‌های معدنی آهن، مواد اصلاحی اسیدزا، زباله‌ها و تولیدات جانبی صنایع، کلات‌های آهن و ترکیبات آلی (۴۳). لزوم سلامت محصولات تولید شده در نظام‌های مختلف کشاورزی از نظر وجود بقایای سموم و مواد شیمیایی و تأثیر آن‌ها بر سلامت انسان و محیط زیست، سبب شده است تا روش‌های تولید و

۱، ۲، ۳، ۴ و ۵ - به‌ترتیب دانش‌آموخته کارشناسی ارشد، دانشیاران، استادیار و دانش‌آموخته دکتری علوم خاک، دانشکده مهندسی آب و خاک، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان
(*- نویسنده مسئول: (Email: mbarani@gau.ac.ir
DOI: 10.22067/jsw.v32i6.73520
6-ROS: Reactive Oxygen Species

نهاده‌های بکار رفته مورد توجه خاص قرار گیرند. از مهم‌ترین مسائل مؤثر بر سلامت محیط زیست و پایداری تولید غذا، کاربرد کودهای آلی به جای کودهای شیمیایی می‌باشد (۶۲). استفاده از انواع کودهای طبیعی و از جمله اسیدهیومیک بدون اثرات مخرب زیست محیطی به‌خصوص در شرایط متغیر محیطی می‌تواند مثمر ثمر واقع شود، لذا از اسیدهیومیک به عنوان کود آلی دوستدار طبیعت نام برده می‌شود. ترکیبات هوموسی مواد آلی، دارای دو نوع اسید آلی مهم به نام‌های اسیدهیومیک و اسیدفولویک و جزء هومین هستند که از منابع مختلف نظیرخاک، هوموس، پیت، لیگنیت اکسید شده، زغال سنگ و ... استخراج می‌شوند و در اندازه مولکولی و ساختار شیمیایی متفاوت هستند (۹). اسیدهیومیک، نوعی ترکیبات پلیمری طبیعی به همراه مواد آلی هتروژن است که در پی پوسیدگی مواد آلی خاک، پیت، لیگنین و غیره به وجود می‌آید، رنگ آن سیاه و وزن ملکولی ۳۰ تا ۳۰۰ کیلو دالتون دارند که کمپلکس‌های پایدار و نامحلول و کمپلکس‌های محلول با عناصر کم‌مصرف تشکیل می‌دهند (۴). اسیدهیومیک در آب به‌خوبی حل شده و با کودهای دیگر مایع، قابل اختلاط می‌باشد و می‌توان آن را از طریق محلول‌پاشی ، مصرف خاکی و سیستم‌های آبیاری تحت فشار مورد استفاده قرار داد (۶۲). اسیدهیومیک از طریق قدرت کلات کنندگی عناصرغذایی و با کاهش تبخیر و تعرق و در نتیجه قرار دادن آب و مواد غذایی بیشتر و مناسب تر در اختیار گیاه، ساخت رنگیزه‌ها را افزایش می‌دهد و انتقال مواد فتوسنتزی را در گیاه راحت‌تر می‌کند (۵۴). اسیدهیومیک تأثیر مستقیم و غیر مستقیم بر رشد گیاه دارد. اثرهای مستقیم آن‌ها شامل افزایش فعالیت آنزیمی و نفوذپذیری غشاء و اثرهای غیر مستقیم آن‌ها شامل بهبود ویژگی‌های خاک مانند خاکدانه‌سازی، تهویه، نفوذپذیری، ظرفیت نگهداری آب و دسترسی و انتقال عناصر کم‌مصرف می‌باشد (۲۷، ۴۹ و ۷۲). کاربرد اسیدهیومیک کلروز گیاهان را بهبود می‌بخشد که احتمالاً نتیجه‌ای است از توانایی اسیدهیومیک برای نگهداری آهن خاک به فرمی که قابل جذب و سوخت و ساز باشد. این پدیده می‌تواند در خاک‌های قلیایی و آهکی مؤثر باشد که معمولاً کمبود آهن قابل جذب و مواد آلی را دارند (۶۰). استفاده از اسیدهیومیک باعث رشد اندام هوایی و افزایش تولید محصولات زراعی و باغی می‌شود، دلیل آن افزایش جذب عناصری نظیر ازت، کلسیم، فسفر، آهن، روی و منگنز می‌باشد (۲۶). درسن و همکاران (۱۶) گزارش کردند که مواد هیومیک از طریق اثرات بیوشیمیایی و شبه‌هورمونی که دارند باعث افزایش جذب ریزمغذی‌ها توسط گیاهان می‌شوند. ناردی و همکاران (۵۳) دریافتند که اسیدهیومیک باعث زیاد شدن غلظت کلروفیل برگ، آغازش ریشه‌های جانبی بیشتر، بهبود جذب عناصر کم‌مصرف شد. کاراکورت و همکاران (۳۲) کاربرد خاکی و محلول‌پاشی اسیدهیومیک بر عملکرد و کیفیت فلفل (*Capsicum annum* L.) را بررسی کرده و دریافتند که کاربرد اسیدهیومیک میزان کلروفیل کل و بویژه کلروفیل b افزایش داد. فرارا و همکاران (۲۰) گزارش کردند که اسیدهیومیک سبب افزایش رشد ریشه و میزان کلروفیل و رنگیزه‌های فتوسنتزی مانند کارتنوئیدها در برگ‌ها می‌شود. خیاط و همکاران (۳۵) نیز گزارش کردند که مواد هیومیکی در فرآیندهای بیولوژیکی گیاه مانند فتوسنتز و مقدار کلروفیل کل موثر بوده و از این طریق رشد گیاه را افزایش می‌دهد. هدف از این پژوهش بررسی نحوه کاربرد و سطوح مختلف اسیدهیومیک بر فرآهمی آهن و تأثیرات آن بر انواع کلروفیل و فعالیت آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز و گلوتاتیون پراکسیداز تحت کشت گیاه کلزا (Brassica napus) رقم هایولا ۳۰۸ می‌باشد.

مواد و روش‌ها

دراین پژوهش، تأثیر کاربرد خاکی، محلول‌پاشی و مصرف همراه با آب آبیاری اسیدهیومیک بر شاخص‌های فیزیولوژیکی کمبود آهن در گیاه کلزا (رقم هایولا ۳۰۸) مورد بررسی قرار گرفت. بدین منظور آزمایشی در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۱۰ تیمار و در ۴ تکرار به‌صورت گلدانی به اجرا درآمد. تیمارها عبارتند از: ۱) شاهد ۲) یک گرم اسیدهیومیک بر کیلوگرم خاک (به صورت مصرف خاکی)، ۳) دو گرم اسیدهیومیک بر کیلوگرم خاک (به صورت مصرف خاکی)، ۴) چهار گرم اسیدهیومیک بر کیلوگرم خاک (به صورت مصرف خاکی) ، ۵) ۱۰۰۰ میلی‌گرم اسیدهیومیک در لیتر (در آب آبیاری)، ۶) ۲۰۰۰ میلی‌گرم اسیدهیومیک در لیتر (در آب آبیاری)، ۷) ۴۰۰۰ میلی‌گرم اسیدهیومیک در لیتر (در آب آبیاری)، ۸) محلول‌پاشی اسیدهیومیک با غلظت ۰/۱ درصد، ۹) محلول‌پاشی اسیدهیومیک با غلظت ۰/۲ درصد، ۱۰) محلول‌پاشی اسید هیومیک با غلظت ۰/۴ درصد. کاربرد خاکی به‌صورت پودر اسیدهیومیک و در زمان کشت بر اساس وزن خاک گلدان‌ها و برای محلول‌پاشی و مصرف همراه با آب آبیاری، هرکدام از سطوح به سه قسمت مساوی تقسیم و در سه مرحله (استقرار گیاه، به ساقه رفتن، شروع گلدهی) مورد استفاده قرار گرفتند. محلول‌پاشی در زمان عصر صورت گرفت و به‌منظور مؤثرتر بودن آن از چند قطره مویان جهت خیس‌خوردگی بیشتر برگ‌ها استفاده شد. اسیدهیومیک مورد استفاده در این آزمایش اسیدهیومیک ۸۰ درصد بانام تجاری هیومکس (Humax-95WSG) بود (جدول۱). خاک مورد استفاده از عمق ۳۰-۰ سانتی‌متری روستای حاجی‌غراوی در ۳۰ کیلومتری گنبدکاووس برداشته شد. پس از هوا خشک شدن، از سرند ۲ میلی‌متری عبور داده شده و ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی نظیر بافت خاک، کربنات کلسیم معادل، کربنات کلسیم فعال (ACCE)، pH در عصاره ۱:۲، قابلیت هدایت الکتریکی در عصاره اشباع، ماده آلی، ظرفیت تبادل کاتیونی، نیتروژن کل، فسفر، پتاسیم قابل‌استفاده، آهن، مس، روی و منگنز (قابل استخراج با DTPA) با استفاده از

روش‌های استاندارد (۵۶) تعیین شدند (جدول ۲). بر اساس آزمون خاک عناصر نیتروژن، فسفر و پتاسیم از منبع‌های اوره، سوپرفسفات-تریپل و سولفات‌پتاسیم و عناصر کم‌مصرف بجز آهن از منبع سولفات تأمین شدند. کود پتاسه، فسفر و عناصر کم‌مصرف در زمان کاشت گیاه ولی کود ازته به سه قسمت مساوی و در سه مرحله کاشت، به ساقه رفتن و گلدهی به گلدان‌ها اضافه شدند. سپس تعداد ۱۰ عدد بذر در هر گلدان در عمق ۲ سانتی‌متری خاک کاشته شد، که پس از سبز شدن و گذشت دو هفته، تعداد بوته‌ها به چهار عدد در هر گلدان تقلیل یافت. جهت حذف اثرات محیطی در طول دوره رشد جای گلدان‌ها دو بار در هفته به‌صورت تصادفی تغییر داده شد. عملیات آبیاری و وجین علف‌های هرز با دست انجام گرفت. رطوبت خاک گلدان‌ها در طول دوره رشد گیاه در حدود ظرفیت مزرعه به روش وزنی تأمین شد. گیاهان پس از ۱۳۹ روز برداشت شدند. گیاهان پس از برداشت، به دو قسمت ساقه و برگ تفکیک شدند. ساقه‌ها و برگ‌ها پس از شستشو با آب مقطر، به مدت ۷۲ ساعت در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد در آون قرار داده شدند سپس نمونه‌ها به‌وسیله آسیاب پودر گردیدند و غلظت آهن کل در برگ و ساقه به روش خشک اندازه‌گیری شد. لازم به ذکر است، قبل از برداشت گیاهان، به منظور اندازه‌گیری آهن فعال، غلظت کلروفیل‌ها (کلروفیل a، کلروفیل b و کلروفیل کل) و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی سوپراکسید دیسموتاز(SOD)، کاتالاز (CAT) و گلوتاتیون پراکسیداز (GPX)، نمونه‌گیری از برگ‌های جوان و توسعه یافته در پایان فصل رشد یعنی ۱۳۹ روز بعد از کشت صورت پذیرفت. آهن فعال در برگ‌های تازه گیاه به روش ارتوفنانترولین ۱/۵ درصد (۳۳) و میزان کلروفیلa، کلروفیلb و کلروفیل‌کل در برگ‌ها با استفاده از روش آرنون (۵) اندازگیری شد. به منظور سنجش کلروفیل ۰/۲ گرم برگ در استون ۸۰ درصد هموژن گردید. پس از سانتریفیوژ، محلول روئی برداشت و جذب آن در ۶۴۵ و ۶۶۳ نانومتر با استفاده از روش اسپکتروفتومتری اندازه‌گیری شد. آنگاه، توسط فرمول‌های زیر مقادیر کلروفیل برحسب میلی‌گرم در گرم وزن تر برگ محاسبه شد (۵). در این روابط، A بیانگر جذب طول موج بر حسب نانومتر، V حجم نهایی کلروفیل در استون و W وزن تر بافت برحسب گرم می‌باشد.

سنجش سوپراکسید دسموتاز(SOD) بر اساس تغییر شیمیایی نیتروبلوتترازولیوم[1] با استفاده از روش مینامی و یوشیکاوا (۴۶)، سنجش کاتالاز (CAT) به روش ابی (۲) براساس میزان تجزیه آب اکسیژنه و سنجش فعالیت گلوتاتیون پراکسیداز (GPX) از تری‌بوتیل‌هیدروپروکسید[2] به‌عنوان سوبسترا طبق روش هاپکینز و تودهوپ (۲۹) انجام شد. نتایج آماری داده‌های حاصل از آزمایش با استفاده از نرم‌افزار SAS انجام شد و برای مقایسه میانگین‌ها از آزمون LSD (در سطح ۵ درصد) استفاده شد.

$$\text{غلظت کلروفیل a} = 12.7(663A) - 2.69(645A) * V/ W* 1000 \quad (۱)$$

$$\text{غلظت کلروفیل b} = 22.9(645A) - 4.68(663A) * V/ W *1000 \quad (۲)$$

$$\text{غلظت کلروفیل کل} = 20.9(645A) - 8.02(663A) * V/ W* 1000 \quad (۳)$$

جدول ۱- خصوصیات اسیدهیومیک مورد استفاده در پژوهش

Table 1- Characteristics of humic acid used in the research

نام تجاری Trade name	اسیدفولیک Fluvic acid	اکسید پتاسیم K_2O	اسیدهیومیک Humic acid
Humax-95WSG	%15	%5	%80

نتایج و بحث

نتایج مقایسه میانگین‌ها (جدول ۳) نشان داد که بیشترین مقدار آهن برگ در تیمار ۰/۴ درصد با میانگین ۲۴۵/۴۶ میلی‌گرم برکیلوگرم مربوط به روش محلول‌پاشی اسیدهیومیک و کمترین مقدار مربوط به تیمار شاهد با میانگین ۱۲۰/۵۰ میلی‌گرم برکیلوگرم بود. همچنین بیشترین مقدار آهن ساقه در تیمار ۲۰۰۰ میلی‌گرم بر لیتر با میانگین ۸۵ میلی‌گرم برکیلوگرم مربوط به روش مصرف همراه با آب آبیاری اسیدهیومیک بود؛ هرچند که با تیمار ۴۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر از لحاظ آماری اختلاف معنی‌داری نداشت و کمترین مقدار مربوط به تیمار شاهد با میانگین ۵۴/۶۲ میلی‌گرم بر کیلوگرم بود (جدول۳). پژوهش‌ها نشان می‌دهند که ترکیب‌های آلی نقش مهمی در فراهمی آهن گیاه دارند، مواد هومیکی با تشکیل کمپلکس‌های آلی محلول از رسوب اکسیدهای آهن جلوگیری کرده و موجب افزایش پخشیدگی آهن به سمت ریشه و در نتیجه افزایش فراهمی آهن گیاه می‌شوند (۱۳).

1- Nitroblue tetrazolium (NBT)
2- T-butyl hydroperoxide

جدول۲- برخی از خصوصیات فیزیکی و شیمیایی خاک مورد استفاده در آزمایش

Table 2- Soil physical and chemical characteristics using in the experiment

کربنات کلسیم معادل (درصد) CCE (%)	15.5
کربنات کلسیم فعال (درصد) ACCE (%)	5.5
ماده آلی (درصد) OM (%)	1.78
رس (درصد) Sand (%)	27
سیلت (درصد) Silt (%)	48.5
شن (درصد) Clay (%)	24.5
بافت Texture	Silty loam
ظرفیت مزرعه FC	22.1
$pH_{1:2}$	7.2
قابلیت هدایت الکتریکی EC (dSm^{-1})	1.15
ظرفیت تبادل کاتیونی CEC ($cmol_c\ kg^{-1}$)	17.7
نیتروژن کل (درصد) Total Nitrogen (%)	0.056
فسفر قابل جذب Phosphorus ($mg\ kg^{-1}$)	10.4
پتاسیم قابل جذب Potassium ($mg\ kg^{-1}$)	219
آهن عصاره گیری با DTPA DTPA extractable Fe ($mg\ kg^{-1}$)	1.44
روی عصاره گیری با DTPA DTPA extractable Zn ($mg\ kg^{-1}$)	0.46
منگنز عصاره گیری با DTPA DTPA extractable Mn ($mg\ kg^{-1}$)	0.34
مس عصاره گیری با DTPA DTPA extractable Cu ($mg\ kg^{-1}$)	0.44

جدول ۳- مقایسه میانگین اثر روش کاربرد و سطوح مختلف اسید هیومیک بر غلظت آهن در گیاه کلزا

Table 3- Mean comparison for the application method and different levels of humic acid on iron concentration of canola

عامل آزمایش Experiment factor	آهن کل برگ Total iron of leaf ($mg\ kg^{-1}$)	آهن کل ساقه Total iron of stem ($mg\ kg^{-1}$)	آهن فعال Active iron ($mg\ kg^{-1}$)	نسبت آهن فعال به آهن کل (٪) Active iron to total iron Ratio (%)
شاهد Blank	120.50J	54.62e	20.40i	16.93f
مصرف خاکی Soil application				
1 g kg^{-1} soil	175.52i	63.25d	30.40f	17.31e
2 g kg^{-1} soil	180.54h	73.12c	32.17e	17.82d
4 g kg^{-1} soil	192.31f	78.25b	38.58d	20.06c
مصرف با آبیاری With irrigation water				
1000 mg l^{-1}	185.07g	62.75d	24.40h	13.18g
2000 mg l^{-1}	204.61c	85a	44.86a	21.92b
4000 mg l^{-1}	193.50e	83.32a	44.59a	23.04a
محلول‌پاشی Spraying				
0.1 %	201.49d	63.12d	25.17g	12.49h
02 %	226.62b	72.87 c	40.32c	17.79d
0.4 %	245.46a	75.37c	42.30b	17.22ef

در هر ستون برای هر تیمار، حروف مشابه نمایانگر عدم اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد هست

In the each column for every treatment, common letters demonstrate not significant at 0.05 probability levels

کاربرد اسیدهیومیک در گیاهان باعث بهبود کارایی جذب عناصرغذایی مخصوصاً افزایش غلظت آهن و نیتروژن در بافت‌های گیاهی شده و راندمان فتوسنتزی را بهبود می‌دهد (۴۴). از مزایای اسیدهیومیک می‌توان به افزایش رشد اندام‌های هوایی و محتوای نیتروژن، رفع کلروز برگ‌ها، بهبود جذب عناصرغذایی و سهولت جذب عناصر ماکرو و میکرو، افزایش فعالیت‌های شبه‌هورمونی و افزایش تولید و بهبود کیفیت محصولات کشاورزی اشاره کرد (۳۰). سانچز و همکاران (۶۵) گزارش کردند که مواد هومیکی با تحرک بخشیدن به یون‌ها و تأثیر بر متابولیسم و فیزیولوژی گیاه انگور سبب بهبود جذب عناصر آهن و فسفر شده و این امر باعث افزایش وزن حبه می‌شود. حقیقی و کافی (۲۳) بیان داشتند که اسیدهیومیک با افزایش رشد ریشه و سطح تارهای کشنده باعث افزایش جذب عناصری چون پتاسیم، نیتروژن و آهن می‌شود. فرناندزاسکوبار و همکاران (۱۹) در نتیجه یک آزمایش مزرعه‌ای دریافتند که کاربرد مواد هومیکی انباشتگی پتاسیم، کلسیم، منیزیم و آهن را در برگ‌های زیتون افزایش داد. آدانی و همکاران (۱) دریافتند که کاربرد اسیدهیومیک به صورت محلول‌پاشی و کاربرد در خاک موجب افزایش جذب عناصرغذایی از خاک و کارایی عناصرغذایی در گیاه می‌شود.

بیشترین مقدار آهن فعال در تیمار ۲۰۰۰ میلی‌گرم بر لیتر با میانگین ۴۴/۸۶ میلی‌گرم برکیلوگرم مربوط به روش مصرف همراه با آب آبیاری اسیدهیومیک بود هرچند که با تیمار ۴۰۰۰ میلی‌گرم برلیتر مصرف همراه با آب آبیاری اسیدهیومیک از لحاظ آماری اختلاف معنی‌داری نداشت و کمترین مقدار مربوط به تیمار شاهد با میانگین ۲۰/۴۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم بود (جدول ۳). همچنین نسبت میانگین آهن فعال به آهن کل در برگ نشان داد که بیشترین مقدار غلظت آهن برگ به شکل آهن فعال در تیمار ۴۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر مصرف همراه با آب آبیاری اسیدهیومیک با میانگین ۲۳/۰۴ درصد و کمترین مقدار مربوط به تیمار ۰/۱ درصد محلول‌پاشی اسیدهیومیک با میانگین ۱۲/۴۹درصد بود (جدول۳). معمولاً غلظت عناصرغذایی در بافت سالم بیشتر از غلظت این عناصر در بافت گیاهان کمبوددار است اما این قاعده کلی در مورد آهن صدق نمی‌کند. بررسی‌های انجام شده نشان می‌دهد، تمامی آهن جذب شده توسط گیاهان مورد استفاده قرار نگرفته و بخشی از آهن جذب شده به فرم ترکیبات نامحلول در می‌آید، لذا در بعضی از موارد آهن کل گیاه معیار مناسبی از حالت تغذیه‌ای آن در گیاه نمی باشد. معمولاً آهن سه ظرفیتی در داخل گیاهان در حال رشد غیر متحرک است و فرم فعال آهن در گیاه، آهن دو ظرفیتی می‌باشد (۴۵). از تجزیه برگی برای تعیین غلظت آهن کل و تشخیص کلروز ناشی از کمبود آهن به کرات استفاده می‌گردد. اما غلظت آهن کل موجود در گیاه ارتباط معناداری با ظهور کلروز ندارد، به گونه‌ای که برگ‌های کلروزه معمولاً دارای میزان آهن برابر یا بیشتر نسبت به برگ‌های سبز می‌باشند. قسمت اعظم آهن اندازگیری شده توسط روش هضم تر در نمونه‌های برگی غیرفعال بوده و فقط بخش کوچکی از آن که شامل آهن دوظرفیتی می‌باشد در کلروفیل سازی شرکت می‌کند (۴۸). بررسی‌های به عمل آمده توسط محققین مختلف از قبیل کاتیال و شارما (۳۳) بر روی گیاه برنج (*sativa japonica*) و پنبه (Gossypium) و منگل و همکاران (۴۵) در آفتابگردان (*Helianthus annuus* L.) نشان می‌دهد که مقدار آهن موجود در برگ‌های کلروزه برابر یا بیشتر از مقدار آهن موجود دربرگ‌های سبز می‌باشد. همچنین در برگ‌های سبز، غلظت آهن فعال (دوظرفیتی) بیشتر از برگ های کلروزه می‌باشد و میزان کلروفیل با آهن دوظرفیتی برگ در مقایسه با آهن کل دارای همبستگی بیشتری است. به طور کلی زرد برگی ناشی از کمبود آهن، به علت اختلال در جذب و انتقال آهن در گیاه است و این اختلال نیز ناشی از غلظت زیاد یون بی‌کربنات در آپوپلاست سلول می‌باشد که موجب افزایش pH و رسوب آهن در این فضای بین سلولی می‌شود. یون بی‌کربنات همچنین انتقال آهن از رگبرگ‌ها و آپوپلاست به سیتوپلاسم سلول‌های برگ را کاهش می‌دهد. یون آهن برای این که بتواند در گیاه انتقال یابد، باید با کلات‌ها کمپلکس شود (۶۱). مواد هیومیکی اضافه شده به محلول عناصرغذایی، حلالیت عناصر آهن و روی را با تشکیل کمپلکس‌های فلز–هیومیک افزایش می‌دهند. کمپلکس‌های هیومیکی آهن دردسترس گیاه هستند، صرفنظر از اینکه آنها از استراتژی اولیه (گیاهان دولپه و گیاهان غیرغلات تک لپه‌ای) و یا استراتژی ثانویه (گیاهان تک لپه‌ای غلات) برای تحریک و دسترسی آهن استفاده می‌کنند (۱۰ و ۱۳). در حقیقت افزایش رشد مشاهده شده در گیاهان تیمار شده با مواد هیومیکی ناشی از افزایش قابلیت دسترسی به آهن می‌باشد (۱۳) مواد هیومیکی، حلالیت هیدروکسیدهای آهن و همچنین حرکت و پویایی‌شان در خاک را افزایش می‌دهند (۱۰). مواد هیومیکی نشان داده‌اند که می‌توانند جایگزین مناسبی برای کی‌لیت کننده‌های مصنوعی آهن مانند EDDHA[1] در گیاهانی مانند گوجه فرنگی (*Lycopersicum esculentum*)، درختان لیمو (*Citrus limonum*) و درختان انگور (*Vitis vinifera*) در خاک آهکی باشند (۶۵). موادهیومیکی همچنین فعالیت غشای پلاسمای(PM) و آنزیم H^+ATPase را افزایش می‌دهد (۵۹) که می‌تواند منجر به اسیدی شدن ناحیه ریزوسفر ریشه شود که به همین دلیل حلالیت عناصرمیکروغذایی افزایش می‌یابد. حکیمی و فرزامی‌سپهر (۲۴) گزارش کردند اسیدهیومیک احتمالاً با تشکیل کمپلکس‌های فلز– لیگاند بر روی سطوح جذب‌کننده در نمونه خاک‌ها موجب افزایش جذب عناصر میکرو می‌شود.

1-Ethylenediamine-N, N-bis (2-hydroxyphenylacetic acid

اعمال تیمارها و روش‌های مختلف اسیدهیومیک موجب افزایش کلروفیل a گردید(جدول ۴). نتایج مقایسه میانگین داده‌های مربوط به کلروفیل a نشان داد که بیشترین کلروفیل a با میانگین ۳/۵۸ میلی‌گرم در گرم وزن تر برگ مربوط به تیمار ۰/۴ درصد محلول‌پاشی اسیدهیومیک و پس از آن تیمار ۲۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر مصرف اسید هیومیک به صورت آب آبیاری با میانگین ۳/۳ میلی‌گرم در گرم وزن تر برگ گیاه بود و کمترین مقدار آن با میانگین ۲/۱۹ میلی‌گرم در گرم وزن تر برگ در تیمار شاهد بود (جدول ۴). کلروفیل یک نوع رنگدانه مهم فتوسنتزی است که در جذب و تبدیل انرژی شرکت می‌کند و عمدتاً شامل کلروفیل a و کلروفیل b می‌باشد (۷۰). اگرچه Fe جزء ساختاری کلروفیل نیست اما نقش بسیار حیاتی در سنتز کلروفیل دارد. در شرایط کمبود آهن غلظت کلروفیل کاهش می‌یابد (۱۲). تحت شرایط کمبود آهن، غلظت آهن در برگ‌ها کاهش یافته که اغلب باعث کاهش قابل توجه سطح کلروفیل می‌شود. به طورکلی کمبود آهن باعث کلروز برگ‌ها می‌شود که نشان دهنده کاهش سطح کلروفیل و رنگدانه‌های فتوسنتزی است (۲۲). بنابراین می‌توان از محتوای کلروفیل به عنوان شاخص تشخیص کمبود آهن استفاده کرد (۵۷). مهمترین نقش آهن در بیوسنتز کلروفیل کنترل تشکیل گاماآمینولوولینیک اسید[1]، به عنوان پیش ساز مشترک بیوسنتز کلروفیل گروه هیم می‌باشد و تشکیل آن به وسیله آهن مهار می‌شود (۲۱). کلروفیل رنگدانه اصلی جذب نور و فتوسنتز است. عناصری نظیر فسفر، نیتروژن، پتاسیم و آهن در تشکیل کلروفیل استفاده می‌شوند که مصرف اسیدهیومیک موجب فراهمی بیشتر این عناصر برای گیاه می‌گردد (۳۶). تأثیرات مثبت اسیدهیومیک بر متابولیسم سلول‌های گیاهی و افزایش مقدار رنگیزه‌های کلروفیل تأیید شده است. ناسوتی میاندواب و سماوات (۵۴) گزارش کردند که اسیدهیومیک از طریق قدرت کلات‌کنندگی عناصرغذایی و با کاهش تبخیر و تعرق و در اختیار قرار دادن آب و مواد غذایی می‌تواند ساخت رنگیزه‌ها را افزایش دهد. جینگ‌مین و همکاران (۳۱) با بررسی اثر سطوح مختلف آبیاری و اسیدهیومیک بر صنوبر دریافتند که با افزایش آب و استفاده از اسیدهیومیک، مقدار کلروفیل افزایش یافت.

جدول ٤- مقایسه میانگین اثر روش کاربرد و سطوح مختلف اسیدهیومیک بر انواع کلروفیل در گیاه کلزا

Table 4 - Mean comparison for the application method and different levels of humic acid on chlorophyll types of canola

عامل آزمایش Experiment factor	کلروفیل a (میلی‌گرم در گرم وزن تر برگ) Chlorophyll a (mg g^{-1})	کلروفیل b (میلی‌گرم در گرم وزن تر برگ) Chlorophyll b (mg g^{-1})	کلروفیل کل (میلی‌گرم در گرم وزن تر برگ) Total chlorophyll (mg g^{-1})
شاهد Blank	2.19g	1.08f	3.28h
مصرف خاکی Soil application			
1 g kg^{-1} soil	2.57e	1.31d	3.88f
2 g kg^{-1} soil	2.90cd	1.49c	4.39cd
4 g kg^{-1} soil	3.03c	1.51c	4.55c
مصرف با آبیاری With irrigation water			
1000 mg l^{-1}	2.39f	1.19e	3.58g
2000 mg l^{-1}	3.30b	1.64b	4.94b
4000 mg l^{-1}	3.23b	1.63b	4.44cd
محلول‌پاشی Spraying			
0.1 %	2.77d	1.38d	4.16e
02 %	3.37b	1.70b	4.31ed
0.4 %	3.58a	1.79a	5.37a

در هر ستون برای هر تیمار، حروف مشابه نمایانگر عدم اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد هست

In the each column for every treatment, common letters demonstrate not significant at 0.05 probability levels

1- S-amino levulinic acid

نتایج مقایسه میانگین داده‌ها نشان داد که کاربرد سطوح مختلف اسیدهیومیک کلروفیل b و کلروفیل کل را به طور معنی‌داری ($p <۰/۰۱$) افزایش داد (جدول ۴). بیشترین میزان کلروفیل b مربوط به تیمار محلول‌پاشی اسیدهیومیک با سطح ۰/۴ درصد با میانگین ۱/۷۹ میلی‌گرم در گرم وزن تر برگ و کمترین مقدار مربوط به تیمار شاهد با میانگین ۱/۰۸ میلی‌گرم در گرم وزن تر برگ بود. بیشترین مقادیر کلروفیل کل نیز مربوط به تیمارهای محلول‌پاشی اسیدهیومیک با سطح ۰/۴ درصد با میانگین ۵/۳۷ میلی‌گرم در گرم وزن تر برگ و تیمار ۲۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر مصرف اسیدهیومیک به صورت آب آبیاری با میانگین ۴/۹۴ میلی‌گرم در گرم وزن تر برگ گیاه بود و کمترین مقدار مربوط به تیمار شاهد با میانگین ۳/۲۸ میلی‌گرم در گرم وزن تر برگ بود (جدول۴). افزایش در میزان کلروفیل می‌تواند به دلیل افزایش جذب عناصرغذایی توسط گیاه، درنتیجه افزایش رشد رویشی گیاه باشد. در بین عناصرغذایی، نیتروژن و آهن سهم مهمی را در افزایش سبزینه گیاه دارد. آیمان و همکاران (۶) اسیدآمینه‌ها و اسیدهیومیک را به‌عنوان تسریع کننده رشد، عملکرد و عامل افزایش مقاومت به بیماری‌های قارچی لوبیای رقم فابا کاشته شده در خاک‌های رسی به کار بردند همه صفات مورفولوژیک (به غیر از شاخه‌دهی و برگ‌های گیاه) و عملکرد (به غیر از غلاف و وزن ۱۰۰ دانه) همچنین میزان عناصر پرمصرف و میزان کلروفیل به میزان قابل توجهی به وسیله کاربرد محلول‌پاشی اسیدهیومیک ۲۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر افزایش یافت. سبزواری و خزاعی (۶۳) اثر اسیدهیومیک را در پنج غلظت، بر عملکرد و کیفیت گندم (Triticum aestivum L.) به صورت تیمار محلول‌پاشی و مصرف خاکی بررسی کردند و دریافتند که اسیدهیومیک اثر معنی داری بر مقدار کلروفیل برگ‌ها داشت و مقادیر ۲۰ میلی‌لیتر در لیتر اسیدهیومیک چه به‌صورت محلول‌پاشی چه به‌صورت مصرف خاکی بیشترین کلروفیل برگ را سبب شد. ال‌بسیونی و همکاران (۱۷) دریافتند که محلول‌پاشی اسیدهیومیک در لوبیا (Phaseolus vulgaris L.) سبب افزایش پروتئین و کلروفیل در گیاه از طریق افزایش سرعت و میزان جذب موادغذایی شد. کاراکورت و همکاران (۳۲) کاربرد خاکی و محلول‌پاشی اسیدهیومیک بر عملکرد و کیفیت فلفل (Capsicum annum L.) را بررسی کرده و دریافتند که کاربرد اسیدهیومیک میزان کلروفیل کل و بویژه کلروفیلb را افزایش داد. در مطالعه‌ای یانگ و همکاران (۷۳) گزارش کردند که اسیدهیومیک بیش از اسیدفولیک و هیومین بر فعالیت کلروفیلb تأثیر می‌گذارد. همچنین سونگ و همکاران (۶۹) گزارش کردند که کلروز ناشی از کمبود آهن باعث کاهش مقدار کلروفیل a و b می‌شود. ملکوتی و همکارن (۴۰) گزارش کردند که عنصر آهن در ساختار کلروفیل نقش مستقیمی ندارد اما وجود آهن کافی سبب بهبود کلروفیل سازی در گیاه می‌گردد و وضعیت کلروفیل گیاه می‌تواند در میزان فتوسنتز تأثیرگذار باشد.

نتایج مقایسه میانگین‌های اثر کاربرد اسیدهیومیک بر آنزیم‌های گیاهی سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز و گلوتاتیون پراکسیداز در گیاه کلزا درجدول ۵ ارائه شده است. بیشترین مقدار آنزیم سوپراکسید دیسموتاز در تیمارهای ۰/۱ درصد با میانگین ۴/۲۰ (Iu /gr.fw) مربوط به روش محلول‌پاشی اسیدهیومیک و ۱۰۰۰ میلی‌گرم درلیتر مصرف اسیدهیومیک همراه با آب آبیاری با میانگین ۳/۹۱ (Iu /gr.fw) و کمترین مقدار آن مربوط به تیمار شاهد با میانگین ۲/۱۸ (Iu /gr.fw) بود (جدول ۵). استفاده از سطوح مختلف اسیدهیومیک میزان فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز را نسبت به شاهد در هر سه روش مصرف خاکی، مصرف همراه با آب آبیاری و محلول‌پاشی افزایش داد. اما با افزایش غلظت اسیدهیومیک در هر سه روش مصرف از میزان فعالیت این آنزیم کاسته شد (جدول ۵). در شرایط کمبود آهن، بسیاری از آنزیم‌هایی که فعالیت آنها وابسته به آهن است، غیرفعال شده و همین امر سبب تغییرات شدید متابولیکی در گیاه می‌شود (۶۶). آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت نظیر کاتالاز، پراکسیداز و یک ایزوفرم از سوپراکسید دیسموتاز، به آهن نیاز دارند و قسمتی از سازوکار دفاعی سلول در مقابل گونه‌های واکنشی فعال اکسیژن هستند و معمولاً با افزایش کمبود آهن مقدار آن‌ها کاهش می‌یابد (۲۸ و ۳۹). لومباردی و همکاران (۳۹) نشان دادند که کمبود آهن سبب کاهش ۶۰ و ۹۰ درصدی به ترتیب فعالیت آنزیم‌های کاتالاز و سوپراکسید دیسموتاز در پیاز گردید. هلین و همکاران (۲۸) نیز کاهش در فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز را در سویا (Glycine max) و لیمو (Citrus limon L.) گزارش کردند، به‌گونه‌ای که کمبود آهن سبب ناپدید شدن ایزوفرم Fe-SOD در گیاهان لیمو (Citrus limon L.) دچار کمبود شد. کسبا و ال – بلتاگی (۳۴) بیان داشتند که اسیدهیومیک می‌تواند نقش مهمی را در سیستم دفاعی آنتی اکسیدانت گیاهان ایفا نماید چرا که غلظت‌های پایین اسیدهیومیک می‌تواند سبب تحریک القای آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت نظیر سوپراکسید دیسموتاز گردد و مقدار رادیکال‌های فعال اکسیژن (ROS) را در سلول‌های گیاهی کاهش دهد. چمانی و همکاران (۱۱) گزارش کردند که کاربرد اسیدهیومیک بر آنزیم سوپراکسید دیسموتاز در سطح ۰/۰۱ معنی‌دار شده به‌طوری که کاربرد اسیدهیومیک نسبت به عدم کاربرد آن میزان سوپراکسید دیسموتاز را به میزان ۵۶/۴ درصد کاهش داده است.

جدول ۵- مقایسه میانگین اثر روش کاربرد و سطوح مختلف اسیدهیومیک آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز و گلوتاتیون پراکسیداز در گیاه کلزا

Table 5 - Mean comparison for the application method and different levels of humic acid on SOD, CAT and GPX of canola

عامل آزمایش Experiment factor	سوپراکسید دیسموتازSOD ($Iu\ gr^{-1}.fw^{-1}$)	کاتالازCAT ($Iu\ gr^{-1}.fw^{-1}$)	گلوتاتیون‌پراکسیدازGPX ($Iu\ gr^{-1}.fw^{-1}$)
شاهد Blank	2.18f	2.41f	0.80f
مصرف خاکی Soil application			
1 g kg^{-1} soil	3.05ed	3.79c	1.36c
2 g kg^{-1} soil	3.01ed	3.27d	1.10d
4 g kg^{-1} soil	2.80e	2.58f	0.87ef
مصرف با آبیاری With irrigation water			
1000 mg l^{-1}	3.91b	4.46a	1.77b
2000 mg l^{-1}	3.50c	3.78c	1.40c
4000 mg l^{-1}	3.26cd	2.81e	1.19d
محلول‌پاشی Spraying			
0.1 %	4.20a	4.19b	1.95a
02 %	3.87b	2.24d	1.31c
0.4 %	2.40f	2.90e	0.96e

در هر ستون برای هر تیمار، حروف مشابه نمایانگر عدم اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد هست

In the each column for every treatment, common letters demonstrate not significant at 0.05 probability levels

بیشترین مقدار آنزیم کاتالاز در تیمار ۱۰۰۰ میلی‌گرم بر لیتر با میانگین ۴/۴۶ (Iu /gr.fw) مربوط به روش مصرف همراه با آب آبیاری اسیدهیومیک و کمترین مقدار آن مربوط به تیمار شاهد با میانگین ۲/۴۱ (Iu /gr.fw) بود (جدول ۵). استفاده از سطوح مختلف اسیدهیومیک میزان فعالیت آنزیم کاتالاز را نسبت به شاهد در هر سه روش مصرف خاکی، مصرف همراه با آب آبیاری و محلول‌پاشی افزایش داد. اما با افزایش غلظت اسیدهیومیک از میزان فعالیت این آنزیم‌ها کاسته شد (جدول ۵). آنزیم‌های کاتالاز، پراکسیداز و آسکوربات پراکسیداز، از مهم‌ترین آنزیم‌های خنثی کنندهٔ پراکسیدهیدروژن در گیاهان هستند، زیرا آن‌ها حاوی آهن هستند و فعالیت آن‌ها تحت تأثیر کمبود آهن قرار می‌گیرد (۶۸). سان و همکاران (۷۱) کاهش فعالیت آنزیم‌های آسکوربات پراکسیداز، کاتالاز و پراکسیداز، در شرایط کمبود آهن را گزارش کردند. کمبود آهن در گیاهان نه‌تنها موجب کلروز می‌شود، بلکه فعالیت آنزیم‌های مشخصی مانند کاتالاز و پراکسیداز را نیز کاهش می‌دهد. زیرا این آنزیم‌ها دارای آهن پورفیرین هستند و به عنوان گروه‌های پروستتیک، نقش ویژه‌ای را در متابولیسم گیاهی ایفا می کنند (۷). همچنین آهن در سنتز پروتئین گیاهی نقش اساسی دارد. شناخته شده‌ترین پروتئین‌های هیم، سیتوکروم‌ها هستند که به عنوان گروه پروستتیک دارای ترکیبات پیچیده آهن هیم پرفیرین می‌باشند. دیگر آنزیم‌های هیم عبارتند از کاتالاز و پراکسیدازها که در شرایط کمبود آهن، فعالیت هر دو آنزیم کاهش می‌یابد. بنابراین فعالیت این آنزیم‌ها شاخص مناسب وضعیت غذایی آهن در گیاهان است (۴۲). در پژوهشی که پیرامون اثرهای زیست شیمیایی و فیزیولوژیکی کمبود آهن در پایه‌های هلو انجام شد، گزارش شد که هر دو آنزیم سوپراکسید دیسموتاز و کاتالاز به کمبود آهن ناشی از حذف آهن از محیط کشت و یا کمبود آهن ناشی از حضور بی‌کربنات، بسیار حساس بودند (۳۹). مطالعات دیگر نیز کاهش فعالیت آنزیم‌های کاتالاز، سوپراکسید دیسموتاز و پراکسیداز در پیاز (*Allium sativum*) (۴۱) و کاهش فعالیت سوپراکسید دیسموتاز در سویا (*Glycine max*) و لیمو (*Citrus limon* L.) در اثر کمبود آهن را نشان داده‌اند (۲۸). بنابراین می‌توان بیان نمود که در گیاهان، مهم‌ترین آنزیم‌های خنثی کنندهٔ پراکسید هیدروژن، یعنی کاتالاز، پراکسیداز و آسکوربات‌پراکسیداز، آنزیم‌های حاوی عنصر آهن هستند. پیوندی و همکاران (۵۸) نیز گزارش کردند تیمارهای نانو کود کلات آهن و نانوآهن اعمال شده باعث افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانتی (کاتالاز، سوپر اکسید دیسموتازو پراکسیداز) نسبت به شاهد شد، اما با افزایش غلظت نانو کود کلات آهن و نانو آهن از میزان فعالیت این آنزیم‌ها کاسته شد. احمدیان و همکاران (۳) گزارش کردند اسیدهیومیک با افزایش حاصلخیزی خاک و بهبود خصوصیات فیزیکی و شیمیایی خاک مانند نفوذپذیری، تهویه، دانه‌بندی، ظرفیت

نگهداری آب در خاک، تحرک و در دسترس قرار دادن موادغذایی و از طریق فعالیت شبه‌هورمونی سبب افزایش آنتی‌اکسیدان‌ها در گیاه می‌شود. همچنین اسیدهیومیک مانند تنظیم کننده‌های رشد اکسین و سایتوکنین عمل می‌کند و سبب بهبود تحمل به تنش‌های مختلف، فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی و در نهایت کیفیت گیاه می‌شوند. کیانی چالمردی و عبدل زاده (۳۸) گزارش کردند که کمبود آهن منجر به کاهش فعالیت آنزیم کاتالاز بخش هوایی به عنوان آنزیم پالاینده H_2O_2 و کاهش فعالیت پراکسیداز دیواره‌ای ریشه و بخش هوایی شد. در واقع می‌توان گفت که با توجه به نقش اسیدهیومیک در فراهمی و جذب آهن (۱۴) فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدان کاهش می‌یابد. دخالت آهن در فرآیندهای مهم سلول، برای مثال در تشکیل کلروفیل و رشد کلروپلاست (۴۲) کاهش رشد گیاهان در شرایط کمبود آهن قابل توجیه است.

بیشترین مقدار آنزیم گلوتاتیون پراکسیداز در تیمارهای ۰/۱ درصد با میانگین ۱/۹۵ (Iu /gr.fw) مربوط به روش محلول‌پاشی اسیدهیومیک می‌باشد که از لحاظ آماری ارتباط معناداری با تیمار ۱۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر مصرف اسیدهیومیک همراه با آب آبیاری با میانگین ۱/۷۷ (Iu /gr.fw) داشت و کمترین مقدار آن مربوط به تیمار شاهد با میانگین ۰/۸۰ (Iu /gr.fw) بود (جدول ۵). استفاده از سطوح مختلف اسیدهیومیک میزان فعالیت آنزیم گلوتاتیون پراکسیداز را نسبت به شاهد در هر سه روش مصرف خاکی، مصرف همراه با آب آبیاری و محلول‌پاشی افزایش داد. اما با افزایش غلظت اسیدهیومیک از میزان فعالیت این آنزیم کاسته شد (جدول ۵). گلوتاتیون پراکسیداز در کاهش پیشرفت علایم تنش شرکت می‌کند، این آنزیم همچنین برای فرآیند سازش و القای تحمل به تنش مورد نیاز می‌باشد به‌طوری که اکثر تنش‌های غیرزیستی، غلظت گلوتاتیون پراکسیداز را درگیاه افزایش می‌دهند که به نقش آن در پیام‌رسانی تنش اشاره دارد (۵۵). آهن به عنوان کوفاکتور آنزیم‌های نظیر کاتالاز و پراکسیداز در پاسخ‌های آنتی‌اکسیدانی سلول‌ها نقش دارد (۶۷). علاوه بر این آهن یک جزء جدایی ناپذیر یا کوفاکتور بسیاری از آنزیم های آنتی اکسیدان، مانند کاتالاز (CAT)، پراکسیداز (POD)، گلوتاتیون رداکتاز (GR) و آهن – سوپر اکسید دیسموتاز (Fe-SOD) است (۲۵). خوش گفتارمنش و همکاران (۳۷) از فعالیت آنزیم گلوتاتیون پراکسیداز برگ‌ها به عنوان شاخص مناسب ارزیابی وضعیت تغذیه‌ای آهن نام بردند که همبستگی نزدیکی با شدت ظاهری زردبرگی درختان چنار داشت. لذا می‌توان از فعالیت آنزیم گلوتاتیون پراکسیداز در تشخیص زردبرگی ناشی از کمبود آهن در درختان چنار استفاده کرد. سلاما و همکاران (۶۴) گزارش کردند که فعالیت ایزوآنزیم‌های پراکسیداز در برگ‌های سویا و آفتابگردان در محلول غذایی فاقد آهن در فرآیند خنثی- سازی پراکسید هیدروژن کاهش یافت. اندالیو و همکاران (۱۸) در آزمایش‌های خود در گیاه ذرت چنین نتیجه‌گیری نمودند که سطوح مختلف محلول‌پاشی اسیدهیومیک اثر معنی‌دار بر آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت منجمله گلوتاتیون‌پراکسیداز و کاتالاز دارد. هم‌چنین فعالیت آنزیم گلوتاتیون پراکسیداز برگ‌های جوان نیز با افزایش شدت زردبرگی کاهش یافت. محصلی و همکاران (۵۰) گزارش کردند که فعالیت آنزیم کاتالاز و پراکسیداز در بارهنگ در شرایط حضور آلاینده ها در هوا کاهش یافت در حالیکه انتظار می‌رود در شرایط تنش، فعالیت این آنزیم‌ها در گیاه افزایش یابد اما چون فعالیت این آنزیم‌ها در گیاه تحت تأثیر غلظت آهن می‌باشد بنابراین، کاهش فعالیت آن‌ها در گیاه مشاهده شد.

همبستگی ساده بین آهن با انواع کلروفیل و آنزیم‌های گیاهی

بین کلروفیل a، کلروفیل b و کلروفیل کل ضریب همبستگی بالایی r = ۰/۹۹ وجود داشت. بین انواع کلروفیل با میزان آهن کل برگ، میزان آهن کل ساقه و میزان آهن فعال همبستگی مثبت و معنی‌داری مشاهده شد اما بین انواع کلروفیل با آنزیم‌های گیاهی سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز و گلوتاتیون پراکسیداز همبستگی منفی معنی‌دار وجود داشت (جدول ۶) که امری منطقی و قابل قبول است به این دلیل که کلروفیل شاخص مناسبی از فتوسنتز و تولید در گیاه می‌باشد. هر اندازه که کلروفیل گیاه بیشتر باشد مقدار آنزیم‌های گیاهی کاهش می‌یابد. بین میزان آهن کل برگ با میزان آهن کل ساقه، میزان آهن فعال و آنزیم‌های گیاهی همبستگی معنی‌دار وجود نداشت اما بین میزان آهن فعال و آنزم‌های گیاهی کاتالاز (r=-۰/۷۲) و گلوتاتیون پراکسیداز (r=-۰/۶۷) همبستگی منفی معنی‌داری در سطح ۰/۰۵ دیده شد(جدول ۶).

میزان آهن فعال و آنزیم‌های آنتی اکسیدان که به نحوی نشان دهنده میزان آهن درون سیتوپلاسم سلول‌اند، شاخص‌های مناسبی برای ارزیابی تحمل به کمبود آهن در مقایسه با سنجش آهن کل می‌باشند. کمبود آهن می‌تواند منجر به ایجاد محدودیت در ظرفیت چرخه انتقال الکترون و به دنبال آن کاهش کارایی فتوشیمیایی سیستم فتوسنتزی II و کاهش کلروفیل شود که این امر در تحقیقات مورالس و همکاران (۵۲) در چغندرقند نیز ثابت شده است. تحقیقات مورالس و همکاران (۵۲) در چغندرقند نیز نشان داد که کمبود آهن منجر به کاهش غلظت رنگدانه‌های فتوسنتزی از قبیل کلروفیل و کاروتنوئید در واحد سطح برگ شده است. محمدی و همکاران (۴۷) گزارش کردند که همبستگی منفی بین کلروفیل a، کلروفیل b و کلروفیل کل با آنزیم‌های گیاهی سوپراکسید دیسموتاز و کاتالاز وجود دارد، به طوری که با کم شدن مقدار کلروفیل مقدار آنزیم‌های گیاهی مذکور افزایش می‌یابند. بلادی و همکاران (۸) گزارش کردند که همبستگی منفی بین کلروفیل a، کلروفیل b و کلروفیل کل با آنزیم

سوپراکسید دیسموتاز وجود داشت به طوری که با کم شدن مقدار کلروفیل فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز افزایش یافت که احتمالاً این افزایش در پاسخ به تولید اکسیژن‌ها رادیکال آزاد در پاسخ به تنش اکسیداتیو است.

جدول ٦- ضریب همبستگی ساده بین صفات مورد مطالعه

Table 6- Simple correlations coeffcients between studied traits

	کلروفیل a Chlorophyll a	کلروفیل b Chlorophyll b	کلروفیل کل Total chlorophyll	آهن کل برگ Total iron of leaf	آهن کل ساقه Total iron of stem	آهن فعال Active iron	سوپر اکسید دیسموتاز Superoxide dismutase	کاتالاز Catalase	گلوتاتیون پراکسیداز Glutathione peroxidase
کلروفیل a Chlorophyll **a**	1								
کلروفیل b Chlorophyll b	0.99**	1							
کلروفیل کل Total chlorophyll	0.99**	0.99**	1						
آهن کل برگ Total iron of leaf	0.80**	0.77*	0.79*	1					
آهن کل ساقه Total iron of stem	0.75*	0.74*	0.74*	0.27ns	1				
آهن فعال Active iron	0.88**	0.88**	0.88**	0.50ns	0.91**	1			
سوپر اکسید دیسموتاز Superoxide dismutase	-0.39ns	-0.41ns	-0.37ns	-0.15ns	-0.39ns	-0.46ns	1		
کاتالاز Catalase	-0.68*	-0.70*	-068*	-0.31ns	-0.66*	-0.72*	0.71*	1	
گلوتاتیون پراکسیداز Glutathione peroxidase	-0.58ns	-0.61ns	-0.58ns	-0.22ns	-0.61ns	-0.67*	0.87**	0.91**	1

*، ** و ns به ترتیب تفاوت معنی‌داری در سطح پنج درصد و یک درصد و عدم معنی‌داری

ns , * and **:Nonsignificant and significant at %5 and %1 level of probability respectively

نتیجه‌گیری

عناصر کم مصرف نقش مهمی را به عنوان کوفاکتور در ساختمان تعدادی از آنزیم‌های آنتی اکسیدان ایفا می‌نمایند. بنابراین هنگامی که گیاهان با کمبود این عناصر مواجه باشند فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی کاهش یافته و حساسیت به تنش‌های محیطی افزایش می‌یابد. تنش‌های اکسیداتیو باعث کاهش تولید کلروفیل می‌شود که پیامد آن آسیب به دستگاه فتوسنتزی است. نتایج این پژوهش نشان داد که روش‌های مختلف استفاده از اسیدهیومیک باعث افزایش فرآهمی آهن، انواع کلروفیل و آنزیم های گیاهی در گیاه کلزا (رقم هایولا ۳۰۸) شد. بیشترین میزان آهن کل ساقه و میزان آهن فعال به ترتیب با میانگین ۸۵ و ۴۴/۸۶ میلی‌گرم بر کیلوگرم مربوط به تیمار ۲۰۰۰ میلی‌گرم بر لیتر مصرف همراه با آب آبیاری اسیدهیومیک بود. بیشترین مقدار فعالیت آنزیم‌های گیاهی سوپراکسید دیسموتاز و گلوتاتیون پراکسیداز به ترتیب با میانگین ۴/۲۰ و ۱/۹۵ (Iu /gr.fw) مربوط تیمار ۰/۱ درصد محلول پاشی اسیدهیومیک و بیشترین فعالیت آنزیم کاتالاز با میانگین ۴/۴۶ (Iu /gr.fw) مربوط به تیمار ۱۰۰۰ میلی گرم در لیتر مصرف همراه با آب آبیاری بود. استفاده از سطوح مختلف اسیدهیومیک میزان فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز، گلوتاتیون پراکسیداز را نسبت به شاهد در هر سه روش مصرف خاکی، مصرف همراه با آب آبیاری و محلول‌پاشی افزایش داد، اما با افزایش غلظت اسیدهیومیک از میزان فعالیت این آنزیم‌ها کاسته شد. بین میزان آهن کل برگ با میزان آهن کل ساقه، میزان آهن فعال و آنزیم‌های گیاهی همبستگی معنی‌دار وجود نداشت اما بین میزان آهن فعال و آنزم‌های گیاهی کاتالاز (r=-۰/۷۲) و گلوتاتیون پراکسیداز (r=-۰/۶۷) همبستگی منفی معنی‌داری در سطح ۰/۰۵ دیده شد. برای آگاهی از چگونگی اثرات و مکانیسم اسیدهیومیک برروی بهره‌وری عناصرغذایی و یا بر فعالیت آنزیم‌های گیاهی لازم است که کاربرد انواع مختلف از محرک‌های زیستی از

جمله مواد هیومیکی در آزمون‌های آزمایشگاهی بـا مقیـاس کوچـک، سپس در آزمایش‌های گلخانه‌ای و نهایتاً در شرایط مزرعه مورد آزمون و بهـره‌بـرداری قـرار بگیرنـد و بـدین ترتیـب گـامی نـو در نیـل بـه کشاورزی‌های مدرن و پایدار با بهره‌برداری از انواع محرکهای زیستی مانند اسیدهیومیک برداشته شود.

منابع

1. Adani F., Genevini P., Zaccheo P., and Zocchi G. 1998. The effect of commercial humic acid on tomato plant growth and mineral nutrition. Journal of Plant Nutrition, 21 (3): 561-575.
2. Aebi H., 1984. Catalase in vitro. Methods in Enzymology, 105: 121–126.
3. Ahmadian A., Ghanbary A., Gluy M., Siyahsar B., and Arazmjoo A. 2010. Different irrigation regimes and manure on the elements essential oil content and chemical composition cumin. Ecophysiology of Crop Plants and Weeds, 16: 83-94.
4. Aiken G.R., McKnight D.M., Wershaw R.L., and MacCarthy P. 1985. Humic substances in soil, sediment, and water: geochemistry, isolation, and characterization. Wiley-Interscience.
5. Arnon D.I. 1949. Copper enzymes in isolated chloroplasts polyphenol oxidase Beta vulgaris. Plant Physiology, 24(1): 1-15.
6. Ayman M., Kamar M., and Khalid M. 2009. Amino and humic acids promote growth, yield and disease resistance of faba bean cultivated in clayey soil. Australian Journal of Basic and Applied Sciences, 3(2): 731-739.
7. Bannister J.V., Bannister W.H., and Rotills G. 1987. Aspects of the structure, function and application of superoxide dismutase. Critical Reviews in Biochemistry, 22: 110-180.
8. Beladi S.M., Habibi D., Kashani A., Paknezhad F., and Golshan M. 2010. Effect reviw lead and copper on Chlorophyll content, lipid membrane, relative water content and super oxidedismutase activity at plant species guller (Lathyrus sativus). The Crop Ecophysiology Publication. 2(2): 66-74. (In Persian with English abstract).
9. Castro L., Garcia-Balboa C., Gonzalez F., Bahhester A., Luisa Blazquez M., and Muniz J.A. 2013. Effectiveness of anaerobic iron bio-reduction of jarosite and the influence of humic substances. Hydrometallurgy, 131: 29-33.
10. Cesco S., Reomheld V., Varanini Z., and Pinton R. 2000. Solubilization of iron by water extractable humic substances. Journal of Plant Nutrition and Soil Science, 163: 285–290.
11. Chamaani F., Habibi D., Khodabande N., Davoudifard M., and Asgharzade A. 2012. Effects of salinity stress on growth and antioxidant enzyme activity of wheat inoculated with plant growth promoting bacteria (Azotobacter chroocccum, Azospirillum lipoferum, Pseudomonase putida) and humic acid. Journal Agricultuer and Plant Breeding, 8(3): 39-55. (In Persian).
12. Chatterjee C., Gopal R., and Dube B.K. 2006. Impact of iron stress on biomass, yield, metabolism and quality of potato (Solanum tuberosum L.). Scientia Horticulturae, 108:1–6.
13. Chen Y., Clapp C.E., and Magen H., 2004. Mechanisms of plant growth stimulation by humic substances: the role of organo-iron complexes. Soil Science and Plant Nutrition, 50: 1089–1095.
14. De Santiago A., and Delgado A. 2007. Effects of humic substances on iron nutrition of lupin. Biology and Fertility of Soils, 43: 829–836.
15. Donnini S., Dellorto M., and Zocchi G. 2011. Oxidative stress responses and root lignification induced by Fe deficiency conditions in pear and quince genotypes. Tree Physiology, 31: 102-113.
16. Dursun A., Guvenc I., and Turan M. 2002. Effect of different levels of humic acid on seedling growth and macro and micronutrient contents of tomato and eggplant. Acta Agrobotanical, 56: 81-88.
17. El-Bassiony A.M., Fawzy Z.F., El-Baky M.A., and Mahmoud A.R. 2010. Response of snap bean plants to mineral fertilizers and humic acid application. Research Journal of Agriculture and Biological Sciences, 6(2):169-175.
18. Endalew E.K., Kiros Y., and Zanzi R. 2011. Heteregenous catalysis for biodiesel production from Jatropha curcas oil. Energy, 36(5): 2693-2700.
19. Fernandez-Escobar R., Benlloch M., Barranco D., Duenas A., and Gañán J.G. 1996. Response of olive trees to foliar application of humic substances extracted from leonardite. Scientia Horticulturae, 66 (3-4): 191-200.
20. Ferrara G., Pacifico A., Simeone P., and Ferrara E. 2008. Preliminary study on the effects of foliar applications of humic acids on 'Italia' table grape. Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin, 42: 79-87.
21. Ghorbanli M., and Babalar M. 2003. Mineral Nutrition of Plants. Tarbiat Moallem University, Tehran Publication, Iran. (In Persian).
22. Gogorcena Y., Abadía A., and Abadía A. 2004. A new technique for screening iron-efficient genotypes in peach rootstocks: elicitation of root ferric chelate reductase by manipulation of external iron concentrations. Journal of Plant Nutrition, 27: 1701–1715.
23. Haghighi M., and Kafi M. 2010. Effect of humic acid on cadmium accumulation, nitrate and changes activity of nitrate reductase enzymes in lttuce. Journal of Horticultural Science, 24(1): 53-58. (In Persian).

24. Hakimi L., and Farzami sepeher M. 2013. Copper and copper accumulations of iron, copper and antioxidant response of dominant plant species around Sorkhe mine in Marand city. Plant Environment Physiology (Iranian Plant Ecophysiology Research),10(40): 21-30. (In Persian).
25. Halliwell B. 2006. Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. Plant Physiology, 141: 312–322.
26. Harper S.M., Kerven G.L., Edwards D.G., and Ostatek-Boczynski Z. 2000. Characterisation of fulvic and humic acids from leaves of Eucalyptus camaldulensis and from decomposed hay. Soil Biology and Biochemistry, 32 :1331-1336.
27. Hartwigsen J. A., and Evans M. R. 2000. Humic acid seed and substrate treatments promote seedling root development. Horticultural Science, 35(7): 1231-1233.
28. Hellin E., Hernandez-Cortez J.A., Piqueras A., Olmos E., and Sevilla F. 1995. The influence of the iron content on the superoxidedismutase activity and chloroplast ultrastructure of Citrus limon in iron nutrition in soil and plants. Journal of Plant Nutrition, 5(3-7): 211-229.
29. Hopkins J., and Tudhope G.R. 1973. Glutathione peroxidase in human red cells in health and disease. British Journal of Haematolgy, 25: 563–575.
30. Jahan M., ghalenoei Sh., Khamoshi A., and Amiri M. 2015. Investigation Agro-ecological Features of Basil (Ocimum basilicum L.) under the influence of application water super absorbent, humic acid and irrigation periods. Journal of Horticultural Science, 29 (2): 240-254. (In Persian).
31. Jing-min Z., Shang-jun X., Mao-peng S., Bingyao M., Xiu-mei C., and Chunsheng L. 2010. Effect of Humic acid on poplar physiology and biochemistry properties and growth under different water level. J. Soil Water Conserv. Journal of Plant Physiology, 24: 1-150.
32. Karakurt Y., Unlu H., Unlu H., and Padem H. 2009. The influence of foliar and soil fertilization of humic acid on yield and quality of pepper. Acta Agriculturae Scandinavica Section B–Soil and Plant science, 59(3): 233-237.
33. Katyal J.C., and Sharma B.D. 1980. A new technique of plant analysis to resolve iron chorosis. Plant and Soil, 55: 105-119.
34. Kesba H.H., and El-Beltagi H.S. 2012. Biochemical changes in grape rootstocks resulted from humic acid treatments in relation to nematode infection. Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine, 2(4): 287-293.
35. Khayyat M., Tafazoli E., Eshghi S., and Rajaee S. 2007. Effect of nitrogen, boron, potassium and zinc spray on yield and fruit quality of data palm. American- Eurasian Jornal of Agriculturae and Environment Science, 2 (3): 289- 296.
36. Khoram Ghahfarokhi A., Rahimi A., Torabi B., and Maddah Hosseini Sh. 2015. Effect of humic acid application and foliar spraying of compost tea and vermiwash on nutrient absorption and chlorophyll content of safflower (Carthamus tinctorius L.). Journal of Oil Plants Production, 2(1): 71-84. (In Persian with English abstract).
37. Khoshgoftarmanesh A.H., Eshghizadeh H. R., Sanaei Ostovar A., Mirlohi M.S. and Taban M. 2013. Physiological Indices of Iron Chlorosis of Plane Trees (Plantanus orintalis L.) in Green Space of Isfahan City. Journal of Soil and Water Sciences, 17(64):19-31. (In Persian with English abstract).
38. Kiani Chalmardi Z., and Abdul Zadeh A. 2013. The role of silicon in reduction of iron deficiency and toxicity in hydroponics cultivation of rice (Oryza sativa L.). Journal of Greenhouse Crop Science and Technology, 3(4): 79-89. (In Persian with English abstract).
39. Lombardi L., Sebastiani L., and Vitagliano. C. 2003. Physiological, Biochemical and Molecular Effects of in vitro induced iron deficiency in peach rootstock. Journal of Plant Nutrition, 26: 2149-2163.
40. Malakouti M., and Tehrani M. 1999. The role of micronutrients in increasing yield and improving the quality of agricultural products (their elements with a large impact). Tarbiat Modares University publication.
41. Manthey J.A., Tisserat B., and Crowley D. E., 1996. Root responses of sterile grown onion plants to iron deficiency. Journal of Plant Nutrition, 19: 145–161.
42. Marschner H. 1995. Mineral Nutrition of Higher Plants (2th Ed.). Academic Press, London.
43. Mazaherinia Sh., Astaraei A.R. Monshi A., and Fotovat A. 2011. A comparison of uptake and concentration of iron (Fe) in wheat (Triticum aestivum L.) plant using ordinary and nano iron oxides. Agronomy Journal (Pajouhesh and Sazandegi), 92: 103-111. (In Persian with English abstract).
44. Mengel K., and Kirby E.A. 1987. Principles of Plant Nutrition. International Potash Institute, Bern.
45. Mengel K., Planker R., and Hofman B. 1994. Relationship between leaf appoplastic pH and iron chlorosis of sunflower (Heliamthus annuus L.). Journal of Plant Nutrition,17:1053-1065.
46. Minami M., and Yoshikawa H. 1979. A simplified assay method of superoxide dismutase activity for clinical use. Clinica Chimica Acta, 92: 337–342.
47. Mohamadi M., Habibi D., Ardakani M.R., and Asgharzade A. 2010. Effect application of biological fertilizers, humic acid and super absorbent polymer on Chlorophyll content, lipid membrane and catalase and super oxidedismutase activity in plant species annual medic (Medicago scutellata) under toxicity cadmium. Journal of Agriculture and Plant Breeding, 6(2): 65-79. (In persain).

48. Mohammadi M., and Moezi A. 2006. Evaluation of Fananthrin method for determining Fe^{2+} concentration in citrus leaves. Scientific Journal of Agriculture, 29:4.57-67. (In Persian).
49. Mohammdkhani N., and Heidari R. 2007. Effects of drought stress on protective enzyme activities and lipid peroxidation in two maize cultivars. Pakistan Journal of Biological Sciences. 10 (21): 3835-3840.
50. Mohsali V., Khoshtakar Manesh A.H., and Shariatmadari H. 2016. Influence of distance from air contaminating source on iron nutritional status of plantain in Shiraz. Journal of Soil Research (Soil and Water Scince), 30(3): 295-304. (In Persian with English abstract).
51. Molassiotis A., Tanou G., Diamantidis G., Patakas A., and Therios I. 2006. Effects of 4-month Fe deficiency exposure on Fe reduction mechanism, photosynthetic gas exchange, chlorophyll fluorescence and antioxidant defense in two peach rootstocks differing in Fe deficiency tolerance. Plant Physiology, 163: 176-185.
52. Morales F., Abadía A., and Abadía J. 1998. Photosynthesis, quenching of chlorophyll fluorescence and thermaenergy dissipation in iron-deficient sugar beet leaves. Australian Journal of Plant Physiology, 25: 403-412.
53. Nardi S., Pizzeghello D., Muscolo A., and Vianello A. 2002. Physiological effects of humic substances on higherplants. Soil Biology and Biochemistry, 34:11 1527-1536.
54. Nasooti Miandoab R., Samavat S., and Tehrani M.M. 2010. Humic acid fertilizer on plants and soil properties. AgriFood, 101: 53-55. (In Persian).
55. Nurdin S., Misebah F.A., Haron S.F., Ghazali N.S., and Gimbun J. 2014. A cost-effective catalyst for biodiesel synthesis from Rubber and Jatropha curcas seeds. Oil for synthesizing biodiesel by KOH supported on coconut shell activated carbonoil. Chemical Engineering and Applications, 5(6): 483-488.
56. Page A.L., Miller R.H., and Keeney D.R. 1982. Chemical and microbiological properties. Methods of soil analysis. Part, 2. ASA, SSSA, Madison, WI.
57. Pestana M., De Varennes A., Abadía J., and Faria E.A. 2005. Differential tolerance to iron deficiency of citrus rootstocks grown in nutrient solution. Scientia Horticulturae, 104(1): 25-36.
58. Peyvandi M., Kamali Jamakani Z., and Mirza M. 2011. Effect of Iron Nanoclat with Iron Chalate on Growth and Antioxidant Activity of Satureja Hortensis. New Molecular Cell Biotechnology, 2(5): 25-32. (In Persian).
59. Pinton R., Cesco S., Iacolettig G., Astolfi S., and Varanini Z. 1999. Modulation of NO uptake by water- extractable humic substances: involvement of root plasma membrane H ATPase. Plant and Soil, 215: 155–161.
60. Rahii A., Davvodi Fard M., Azizi F., and Habiby. D. 2012. Effects of different amounts of humic acid and response curves in the Dactylis glomerata. Agriculture and Plant Breeding Journal, 8(3): 28-15. (In Persian).
61. Romheld V. 2000. The chlorosis paradox: Fe inactivation as a secondary event in chlorotic leaves of grape vine. Journal of Plant Nutrition, 13: 1629-1643.
62. Roozbahani A., Ghorbani S., Mirzaei M., and Aerojnia S. 2013. The effect of soil application of humic acid and fluvic acid on yield and yield component of barley (Hurdeum vulgare L.). Journal of Agronomy and Plant Breeding, 9(2): 25-33. (In Persian).
63. Sabzavari S., and Reza Khazaee H. 2009. Effect of spraying various levels of humic acid on growth characteristics, yield and yield components of wheat (Triticum aestivum L.) Pishtaz cultivar. Agricultural Ecology,1(2): 53-63. (In Persian with English abstract).
64. Salama Z.A.E., El-Beltagi H.S., and El-Hariri D.M. 2009. Effect of Fe deficiency on Antioxidant system in leaves of three flax cultivars. Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca, 37(1): 122-128.
65. Sanchez Sanchez A., Sanchez Andreu J., Juarez M., Jorda J., and Bermudez D. 2006. Imporvement of iron uptake in table grape by addition of humic substances. Journal of Plant Nutrition, 29(2): 259-272.
66. Schoenwiss D.F., 1973. Correction of lime induced chlorosis of Pin Oak by liquid soil injection. HortScience, 8(4): 333- 334.
67. Shah K., Kumar R.G., Verma S., and Dubey R.S. 2001. Effect of cadmium on lipid peroxidation, superoxidation generation and activities of antioxidant enzymes in growing rice seedlings. Plant Science, 161: 1135–1144.
68. Shigeoka S., Ishikawa T., Tamoi M., Miyagawa Y., Takeda T., and Yabuta Y. 2002. Regulation and function of ascorbate peroxidase isoenzymes. Journal of Experimental Botany, 53: 1305-1319.
69. Song Y.L., Dong Y.J., Tian X.Y., Wang W.W., and He Z.L., 2017. Effects of nitric oxide and Fe supply on recovery of Fe deficiency induced chlorosis in peanut plants. Biologia Plantarum, 61(1): 155-168.
70. Stenbaek A., and Jensen P. E. 2010. Redox regulation of chlorophyll biosynthesis. Phytochemistry, 71(8–9):853–859.
71. Sun B., Jing Y., Chen K., Song L., Chen F., and Zhang L. 2007. Protective effect of nitric oxide on iron deficiency-induced oxidative stress in maize (Zea mays). Journal of Plant Physiology, 164: 536-543.
72. Tan K.H. 2003. Humic Matter in Soil and Environment: Principles and Controversies. CRC Press, New York.
73. Yang C.M., Wang M.C., Lu Y.F., Chang F., and Chou C.H. 2004. Humic substances affect the activity of chlorophylls. Journal of Chemical Ecology, 30: 1057-1065.

Journal of Water and Soil
Vol. 32, No. 6, Jan.-Feb. 2019, p. 1191-1205

نشریه آب و خاک (علوم و صنایع کشاورزی)
جلد ۳۲، شماره ۶، بهمن-اسفند ۱۳۹۷، ص. ۱۲۰۵-۱۱۹۱

Effect of Humic Acid on Physiological Indices of Iron Deficiency in Canola (*Brassica napus*) (cv. Hyola 308)

T. Nazari[1]- M. Baranimotlagh[2*]- E. Dordipour[3]- R. Ghorbani Nasrabadi[4]- S. Sefidgar Shahkolaee[5]

Received: 02-07-2018
Accepted: 07-10-2018

Introduction: Fe is the first identified micronutrient for crops and required in higher amount than other micronutrients. Fe plays important roles in enzyme metabolism, protein metabolism, chlorophyll construction, chloroplast evolution, photosynthesis, respiration and reduction-oxidation reaction as well as organic acids metabolism. Iron, as an essential micronutrient, has great contribution in important antioxidant enzymes activity and through which affects plant tolerance against environmental stresses. Plant enzymes including superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase are among the most important enzymes scavenging the hydrogen peroxide have iron in their structure, so they affected by iron deficiency. In this study, the effect of soil, foliar and fertigation application of humic acid on iron availability, chlorophyll types and superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase enzymes in canola (Hyola 308) were evaluated.

Materials and Methods: The soil was air-dried and ground to pass through a 2-mm sieve then was analyzed to determine various soil physico-chemical properties using standard methods. A greenhouse experiment as a completely randomized design was carried out consisting of 10 treatments and 4 replications. Treatments included humic acid soil application at three levels (1, 2 and 4 g kg^{-1} soil), spraying at three levels (0.1, 0.2 and 0.4%) and with fertigation at three levels (1000, 2000 and 4000 mg L^{-1}) and control treatment (without humic acid)**.** Soil application in the form of humic acid powder and in cropping time based on the soil weight of the pots and treatments as spraying and consumption along with irrigation water were divided into three equal parts and used in three stages (plant establishment, stem elongation and flowering). Spraying was performed at the end of the day and in order to make it more effective, several drops of moyan (foliar soap) were used to wet the leaves. After the soil had been prepared, ten seeds of canola were planted approximately 20 mm deep in the center of the pots and Thinning was done to remain four plants pot^{-1} at plant establishment. Distilled water was used to maintain moisture contents of the soil in all the pots during the experimental period. Plant stem and leaves were Harvested at 139 days after planting, washed with distilled water and dry with tissue paper Plant stem and leaves were Harvested at 139 days after planting, washed with distilled water and dry with tissue paper. The leave and stem samples were air-dried and then oven dried at 65˚C to a constant weight in a forced air driven oven. Then the total Fe content of leaf and stem was detemined after dry ashing. In addition, before harvesting, active iron, concentration of chlorophyll a, chlorophyll b, total chlorophyll and superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase enzymes were determined in fresh leaves. The analysis of variance (ANOVA) were performed using a completely randomized design. Significantly different treatment means were separated using least significant difference (LSD) test at $P<0.05$

Results and Discussion: Results showed that highest total iron content in plant leaves was obtained in 0.4 percent foliar application and the lowest was belonged to control treatment. Highest iron content in plant stem and active iron was obtained in humic acid application through irrigation at 2000 mg L-1 by 85 and 44.86 mg kg-1, respectively, and lowest amounts were obtained in control by 54.62 and 20.40 mg kg-1. Also, greatest concentration of chlorophyll a, chlorophyll b and total chlorophyll were recorded under0.4 percent humic acid foliar application by 3.58, 1.79 and 5.37 and the lowest chlorophyll contents were associated to control. Highest activities for plant enzymes superoxide dismutase and glutathione peroxidase were obtained under0.1 percent foliar application of humic acid by 4.20 and 1.95 (Iu/gr. FW) and the highest activity for catalase enzyme by 4.46 Iu/gr FW in 1000 mg L-1 humic acid through was

1, 2, 3, 4 and 5- M. Sc Graduated, Associate Professors, Assistant Professor and PhD Graduated, Department of Soil Sciences, Faculty of Water and Soil Engineering, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Respectively
(*- Corresponding Atuhor Email: mbarani@gau.ac.ir)

irrigation and the lowest enzyme activity obtained in control treatment. Findings showed that application of various levels of humic acid increased plant enzyme activity compared to control in all of three application method (soil, foliar and application through irrigation water). Increasing humic acid concentration decreased enzyme activities. Also, there was negative correlation between activity of plant enzymes and concentation of chlorophyll types and active iron.

Conclusions: Active iron and antioxidant enzymes represent iron status within cell cytoplasm. Based on the results of this study, active iron concentration and activity of antioxidant enzymes are appropriate indices for evaluating plant tolerance to iron deficiency compared to assessing total iron content in leaves.

Keywords: Active iron, Chlorophyll, Humic acid, Plant enzymes