معالجة سمية الصوديوم في عقل الخيار *Cucumis sativus* L. بأضافة حامض الهيوميك بدلالة الحالة الهرمونية ومضادات الاكسدة الانزيمية واللانزيمية

عبد الله ابراهيم شهيد ايفان ابراهيم مرهج
قسم علوم الحياة-كلية العلوم-جامعة بابل

الملخص

أجري هذا البحث في مختبرات قسم علوم الحياة/كلية العلوم/جامعة بابل. إذ عوملت عقل الخيار بعمر 10 يوم بالتركيز الافضل من حامض الهيوميك (0.001%) للتخفيف من سمية الصوديوم بهيئة ملح NaCl (75 ملي مكافئ/لتر). حيث جهز حامض الهيوميك قبل وبعد وسويةً مع الصوديوم السام، فكانت اضافتهما سويةً ذات تأثير أفضل كمعالجة. ودرس تأثير إجهاد كلوريد الصوديوم السام وحامض الهيوميك كمحلول معالجة في تركيز الهرمونات النباتية كالـ IAA وGA3 وABA وكذلك في محتوى مضادات الاكسدة اللانزيمية كالـGSH وASA وProline و الانزيمية كالـ SOD وCAT وAPX وIAA-oxidase. وأظهرت النتائج ان معاملة العقل بالصوديوم السام سبب إنخفاضاً معنوياً في محتوى الهرمونين IAA وGA3 بينما أزداد معنوياً تركيز هرمون ABA. كما أنخفض معنوياً كلا من محتوى GSH وASA وأزداد معنوياً محتوى البرولين، وفي الوقت نفسه أزدادت معنوياً فعالية الانزيمات SOD وCAT وAPX. بينما المعاملة بحامض الهيوميك سببت نتائج معكوسة حيث إزداد معنوياً محتوى IAA وGA3 بينما أنخفض معنوياً محتوى ABA، وكذلك إزداد معنوياً محتوى -GSH وASA وأنخفض معنوياً محتوى البرولين. كما أنخفضت معنوياً فعالية الانزيمات SOD وCAT وAPX وIAA-oxidase.

Recovery of sodium toxicity by addition of humic acid in terms of hormonal status & enzymatic & non-enzymatic antioxidants in *Cucumis sativus* L. cuttings

Abdullah I. Shaheed Evan Ibrahim Merhij
Biology Department-College of Science-Babylon university
P.O.Box (4), Hilla, Iraq

Abstract

This research was designed in biology depart. laboratories/college of science/Babylon university. The cucumber cuttings were treated by the best concentration of humic acid (0.001%) was used for alleviation of sodium toxicity (NaCl, 75 meq/L). Humic acid was supplied pre & past-treatment or simultaneously with toxicant sodium. The results were revealed that application of humic acid simultaneously with sodium is the best. Effect of treatments (sodium stress & humic acid) on concentration of IAA, GA3 & ABA, as well as, non-enzymatic antioxidants (GSH, ASA & proline) & non-enzymatic antioxidants (SOD, CAT, APX) in addition to IAA-oxidase were studied. The results showed that sodium caused significantly decrease of IAA & GA3 contents, whereas ABA content significantly increased. Also, GSH & ASA contents significantly decreased, and proline content increased. Meanwhile, the activity of SOD, CAT & APX as well as IAA-oxidase increased. Whereas the treatment by humic acid caused inversed results, IAA & GA3 contents increased, whereas, ABA content decreased. The contents of GSH & ASA significantly increased & proline content significantly decreased. The SOD, CAT, APX & IAA-oxidase significantly decreased.

Key words: *Cucumis sativus*, sodium, toxicity, humic acid, IAA, GA3, ABA, SOD, CAT, APX, IAA-oxidase

المقدمة

تسبب الملوحة نوعين من الاجهادات للنبات اولاً: إجهاد نقص الماء Water-deficient Stress أو مرحلة الاجهاد الاوزموزي السريع (Rapid Osmotic Phase) وتكون ناتجة من زيادة تراكيز الذائبات في التربة وثانياً: الإجهاد الإيوني البطيء Slow ionic stress وتنتج من تغيير نسبة $Na^+\backslash K^+$ وكذلك أيونات الصوديوم والكلور التي تكون مضرة للنبات (Hamdia & Shaddad, 2010). إذ تحتوي الترب المالحة على العديد من الاملاح ولكن كلوريد الصوديوم هو السائد (Rengasamy, 2006). ان نبات الخيار حساس للملوحة وبشكل محدد للـ NaCl فينمو في الترب التي تتراوح قيمها التوصيلية EC من (2-3) ديسيمنز\سم (Trajkova & Papadantonakis, 2006). وأشار Wang وجماعته (2013) ان نمو الجذور في النباتات

المعرضة للاجهاد الملحي يكون مقيداً بفعل التأثيرات الاوزموزية والسمية للايونات التي تسبب قلة إخذ المغذيات خصوصاً البوتاسيوم. كما تختزل الملوحة قابلية النباتات لأخذ الماء (Blumwald *et al*., 2000). يعد الصوديوم هو العنصر السادس من حيث الوفرة في القشرة الارضية (يكون حوالي 2.6%) والثاني من حيث تواجده في مياه المحيطات (470 mM) (Epstein & Bloom, 2005). وهو عنصر غير ضروري لمعظم النباتات ويصنف من العناصر المفيدة Beneficial elements (إي انه عنصر وظيفي Functional nutrient) باستثناء دوره المهم لمعظم النباتات المتحملة للملوحة Halophyta وبعض أنواع C4-plants كالذرة الصفراء (من خلال نقله للبايروفيت Pyruvate عبر غشاء الكلوروبلاست) (Turan *et al*., 2009). كما أشار الاخير الى أن تراكم ملح كلوريد الصوديوم يسبب بيئة غير مفضلة ويختزل التنوع الحياتي ويقلل نمو وانتاج النباتات وقد يؤدي الى السمية في النباتات غير المتحملة للملوحة Glycophyta. ومن التأثيرات السلبية الاخرى لزيادة الصوديوم هو قلة توفر بعض المغذيات (من خلال تثبيط أخذها من قبل النبات) والذي يحدث أما مباشرة عن طريق عرقلة أخذ المغذيات من خلال التداخل Interfering مع النواقل في الغشاء البلازمي للجذر مثل قنوات K^+-Selective Ion Channels أو بشكل غير مباشر عن طريق تثبيط نمو الجذور.

أن حامض الهيوميك هو ليس حامض مفرد بل مزيج معقد من عدة حوامض مختلفة تحتوي مجاميع كاربوكسيلية وفينولية (Stevenson,1994). وأشار Kulikova وجماعته (2005) الى أن المواد الدبالية تظهر تأثيرات مضادة للاجهاد Antistress تحت ظروف الاجهاد اللاحياتي، حيث تعمل على معالجة تحطم الكلوروفيل Chlorosis ويزيد من نفاذية الاغشية الخلوية ويعجل الانقسام الخلوي وتكشف الجذور ويحفز أخذ المغذيات وأختزال أخذ العناصر السامة عن طريق أدمصاصها مع محلول التربة، لذلك عند أضافته الى التربة يشجع نمو النبات تحت ظروف الملوحة (Mahmoudi *et al*., 2013). أضافة الى ما تقدم فأنه يسهل نقل العناصر الضرورية داخل الجذر ويحسن التنفس والبناء الضوئي، وكذلك يزيد من محتوى N وP (Aydin *et al*., 2012). أستعمل حامض الهيوميك في بعض الدراسات لتنظيم مستوى الهرمونات وتحسين نمو الجذر والمجموع الخضري وكذلك زيادة مقاومة النبات للاجهاد البيئي. ان ميكانيكية حامض الهيوميك في تحفيز نمو النبات تعمل من خلال تحفيز أخذ المغذيات واختزال أخذ العناصر السامة (Aydin *et al*., 2012). وان تجهيز حامض الهيوميك يزيد قابلية النبات لمواجهة الظروف البيئية القاسية كالملوحة (Keskin *et al*., 2010). إذ ان الاجهاد الملحي يسبب زيادة كبيرة في تركيز حامض الابسيسك في نبات الرز عند تعريضه لكلوريد الصوديوم بتركيز 20 و40 ملي مولار (Kang *et al*., 2005). وله دور رئيسي في تنظيم فتح وغلق الثغور (Poltronieri *et al*., 2011). كما يحفز ABA تراكم الايونات في الفجوات الموجودة في خلايا جذور الشعير والتي تعد واحدة من أليات الضرورية للتكيف تحت الظروف الملحية (Jeschke *et al*., 1997).

أن النظام الدفاعي المضاد للاكسدة في الخلية النباتية يشمل مضادات انزيمية كـ (SOD وCAT وAPX و...ألخ) واللانزيمية كالـ GSH والاسكوربيت والبرولين و-α tocopherolو....ألخ. أن أنزيم Superoxide dismutase (SOD,1.15.1.1) من الانزيمات النباتية المضادة للاكسدة التي لها دور ضروري في الدفاع ضد الإجهاد التأكسدي (Boscolo *et al*., 2003) ويعد الخط الدفاعي الأول ضد (ROS) المتولد خلال الإجهادات ومنها الإجهاد التأكسدي المتسبب عن سُمية العناصر والذي يزيد إنتاج ROS ويمكن أن يعلب دوراً في كسح الجذور الحرة لكن في الوقت نفسه فان إنزيمات أخرى تكون ضروريةً لكسح بروكسيد الهيدروجين المتولد بواسطة SOD(Landi *et al*., 2012). مثال على ذلك: أنزيم الـCatalase [Peroxidase Hydrogen : peroxidase oxidreductase] (EC: 1.11.1.6) يحتوي على الحديد Heme-containing Enzyme ويوجد في جميع الكائنات حقيقية النواة الهوائية ومهم في إزالة H_2O_2 المتكون في Peroxisomes الناتج من عملية β-oxidation للاحماض الدهنية ومن دورة Glyoxylate(Photorespiration) وكذلك أيض البرولين(Mckersie, 1996). ويعد إنزيم Ascorbate peroxidase (APX) هو أحد أهم الأنزيمات المضادة للأكسدة والاكثر انتشاراً في الخلايا النباتية ومن ضمن انزيمات دورةASA-GSH cycle، ففي هذه الدورة يكسح H_2O_2 بشكل فعال جداً بينما يبقى مستوى الاسكوربيت ثابت، ويلعب دوراً مركزياً في السيطرة على مستويات ROS من خلال تحويل H_2O_2 الى ماء (Hossain & Fujita, 2011).

الاسكوربيت (ASA) يعرف بإسم فيتامين C (Vitamin) وهو مضاد أكسدة مهم إذ يكون متوفر في الكلوروبلاست والبروتوبلاست. ويكون مختزل للعديد من الجذور الحرة وبهذا يقلل التحطيم الناتج من الاجهاد التأكسدي، إذ يتفاعل مع بيروكسيد الهيدروجين ومع السوبر أوكساييد Superoxide وجذور الهيدروكسيل و Lipid hydroperoxide (Yu, 1994). كما يزداد تراكم البرولين في النباتات المعرضة للملوحة، حيث يعد البرولين حامي أوزموزي Osmoprotectant وعامل حماية Protective Agent للانزيمات الخلوية والعضيات للتخلص من الاجهاد واعادة النمو (Aydin *et al*., 2012). إذ أشار Agrawal وPandey (2004) الى أن البرولين يعد مخزناً للكربون والنيتروجين اللازمين للنمو تحت الإجهاد ومضاداً للتسمم بالأمونيا، كاسح للجذور الحرة، وكذلك فى ضبط pH السيتوبلازم، وحماية الأغشية البلازمية من الأكسدة lipid peroxidation (Hare *et al*., 1999).

المواد وطرائق العمل

زراعة البذور وتهيئة العقل

أستعلمت بذور الخيار(*Cucumis sativus* L.) من صنف Alpha Beth 1 وتم انتخاب البذور المتماثلة لغرض الزراعة. نُقعت بذور الخيار بماء الحنفية الجاري

Current Water لمدة 12 ساعة وزرعت في خطوط متوازية على نشارة الخشب المعقم Sterile sawdust كوسط للزراعة باستخدام أحواض بلاستكية مثقبة من الأسفل وبأبعاد(13×19×6) سم وضعت في أحواض أكبر وغير مثقبة وبأبعاد (9×32×23) سم. وأضيف محلول هوكلاند بربع القوة ووضعت في غرفة النمو Plant Growth Chamber من نوع Binder KBW 700 والتي تمتاز بظروف قياسية من أضاءة مستمرة وبشدة 1600-1800لوكس ودرجة حرارة 25 ±1 ºم ورطوبة نسبية 60-70%. وأضيف محلول Hoagland بحسب الحاجة لغاية عمر عشرة أيام للبادرات بعدها انتخبت البادرات المتماثلة لتهيئة العُقل وإجراء التجارب. هيئت العُقل من بادرات متماثلة بعمر عشرة ايام التي تمتاز باحتوائها على بُرعم طرفي صغير Terminal Bud، وزوج من الأوراق الأولية كاملة الاتساع، والساق بطول 3 سم تحت نقطة ألتقاء الاوراق الاولية، بعد إزالة المجموع الجذري. وقد حدد التركيز السام للصوديوم (فكان **75** ملي مكافئ لتر) بدلالة إستجابة تجذير العقل (مرهج وشهيد، 2016). ثم عوملت العقل بحامض الهيوميك بتراكيز (0، 0.00001، 0.0001، 0.001، 0.01، 0.1، 1، 2، 4، 6، 8، 10، 12.4) % كمحلول معالجة للحد أو التخفيف من سمية الصوديوم. بعدها نقلت الى وسط التجذير الحاوي على Boric acid (5 مايكروغرام /مل) لمدة ستة أيام وهي تحت نفس الظروف التي استخدمت لتنمية البادرات بعدها تم حساب معدل عدد الجذور في كل عُقلة. وتم قياس تركيز الهرمونات النباتية (IAA, GA3, ABA) اعتماداً على طريقة (Horgan & Smith, 1991). وقدر محتوى ASA (بوحدة ملغم.غم) بأستخدام الطريقة المتبعة من قبل (Shalata & Neumann, 2001). وتم قياس محتوى GSH (بوحدة ملغم.غم) بأستعمال كاشف ألمانز (Ellman's reagent) 5,5-Di thio bis (2-nitro benzoic acid) (محلول DTNB). (Ellman, 1959). وأتبعت طريقة (Bates *et al.*,1973) لقياس كمية البرولين (بوحدة ملغم.غم). كما قدرت فعالية إنزيم SOD إعتماداً على طريقة (Marklund & Marklund, 1974). وقدرت فعالية إنزيم CAT بالطريقة الموصوفة من قبل (Aebi, 1974). وقدرت الفعالية بحسب طريقة (Asada & Chen, 1992) .

النتائج

تحديد التركيز الأمثل من حامض الهيوميك

يبين الجدول (1) تأثير تراكيز مختلفة من حامض الهيوميك في استجابة التجذير لعُقل الخيار الطرية المأخوذة من البادرات النامية في محلول هوكلاند لمدة عشرة أيام حيث كشفت العُقل تحت **0.001**% من حامض الهيوميك **30.2** جذراً والتي لم تختلف معنوياً مع السيطرة (المعاملة بالماء المقطر) عن (30) جذراً، أما العقل التي جهزت بتراكيز مختلفة من حامض الهيوميك فكانت جميعها مثبطة وأن التثبيط يزداد مع زيادة التركيز وصولاً الى التراكيز العالية 10% فما فوق حيث كانت مميتة (نسبة التثبيط 100%)، بإستثناء التركيز 0.001 % فقد سجل أعلى استجابة تجذير وكشف (30.2 جذر) والتي تعد غير معنوية مقارنة بالسيطرة. وأخيراً فقد أعتمد التركيز 0.001 من حامض الهيوميك على أنه التركيز الأفضل واستعمل في التجارب اللاحقة.

تأثير حامض الهيوميك في إزالة سمية الصوديوم

يشير الجدول (2) الى تأثير حامض الهيوميك في معالجة سمية الصوديوم عندما يجهز قبل وبعد وسوياً مع الصوديوم في آن واحد بدلالة معدل عدد الجذور المتكشفة مقارنة بالسيطرة (الماء مقطر) والتي بلغت 33.3 جذر\عقلة حيث أختزلت المعاملة بالتركيز السام من كلوريد الصوديوم لوحده عدد الجذور المتكشفة الى 13 جذر (فعل تثبيطي) في حين معاملتها بالتركيز الامثل من حامض الهيوميك لوحده 24.3 جذر. إذ يعد الاخير فعل تحفيزي مقارنة بالتركيز السام. وكمحاولة لتقليل التأثير السمي للصوديوم، جهزت العقل بحامض الهيوميك بعد معاملتها بكلوريد الصوديوم أي في 12 ساعة الثانية (بالطريقة العلاجية) فكشفت 25.6 جذر، وعند تجهيزه قبل التركيز السام أي في 12 ساعة الاولى (بالطريقة الوقائية) كشفت 15 جذر. تشير الحالتان أعلاه ان تجهيز الهيوميك بالطريقة العلاجية هي الافضل (حيث أقتربت من السيطرة بحدود 77% على أفتراض السيطرة 100%) مقارنة بالطريقة الوقائية التي لم تكن مؤثرة مقارنة بالتركيز السام لكلوريد الصوديوم. بينما تجهيز حامض الهيوميك سويةً مع كلوريد الصوديوم عمل على إزالة سمية الصوديوم بالكامل إذ كشفت العقل 31 جذر مما جعلها تقترب من السيطرة (الماء المقطر) مع أختفاء الفوارق المعنوية من الناحية الاحصائية. وكأستنتاج فأن معاملة العقل بالهيوميك سوية مع كلوريد الصوديوم هي الافضل في تقليل السمية من خلال زيادة عدد الجذور المتكشفة تليها الطريقة العلاجية.

تأثير حامض الهيوميك في إزالة سمية الصوديوم بدلالة تركيز الهرمونات النباتية في عقل الخيار

يبين الجدول (3) حصول إنخفاض معنوي في تركيز هرمون IAA (0.9×10^{-3}) مولاري بنسبة إنخفاض 59.09% عند معاملة العقل لمدة 24 ساعة بالتركيز السام من كلوريد الصوديوم مقارنة بالسيطرة (2.2×10^{-3}) مولاري، وسجلت معاملة العقل بحامض الهيوميك (1.9×10^{-3}) مولاري. وبهدف المعالجة فقد جهزت العقل بالتركيز الامثل من حامض الهيوميك سويةً مع الصوديوم السام مما زاد من تركيز IAA (1.6×10^{-3}) مولاري إي بنسبة زيادة 77.7% مقارنة بمعاملة الصوديوم السام. وفي الوقت ذاته أوقفت 72.7% من عمليات التسمم بالصوديوم مقارنة بالماء المقطر. كما أنخفض تركيز الجبرلين معنوياً (18×10^{-3}) مولاري أي بنسبة إنخفاض 47.1% عند معاملة العقل لمدة 24 ساعة بالتركيز السام من كلوريد الصوديوم مقارنة بالسيطرة (34×10^{-3}) مولاري، بينما سجلت معاملة العقل بحامض الهيوميك (15×10^{-3}) مولاري. وجهزت العقل بالتركيز الامثل من حامض الهيوميك سويةً مع الصوديوم السام فكان تركيز الجبرلين (35×10^{-3}) مولاري إي بزيادة تركيز GA3 بنسبة 94.4% عن معاملة الصوديوم السام وبدون أي فرق معنوي عن معاملة السيطرة (الماء المقطر). وبعبارة إخرى ان محلول المعالجة أوقف جميع العمليات التي تحدث بسبب إجهاد الصوديوم السام بدلالة تركيز الجبرلين.

وعلى العكس ذلك فقد إزداد تركيز ABA معنوياً (34×10^{-3}) مولاري أي بنسبة زيادة 240% عند معاملة العقل لمدة 24 ساعة بالتركيز السام من كلوريد الصوديوم مقارنة بالسيطرة (10×10^{-3}) مولاري، بينما سجلت معاملة العقل بحامض الهيوميك (9×10^{-3}) مولاري أقل تركيز للـABA وبفرق معنوي مع معاملات NaCl (75 ملي مكافئ/لتر) وHA (0.001%)، وبدون فرق معنوي مع معاملة السيطرة. ونلاحظ عند تجهيز العقل بالتركيز الامثل من حامض الهيوميك سويةً مع الصوديوم السام قد خفض تركيز ABA الى (14×10^{-3}) مولاري إي بنسبة إنخفاض معنوية 58.8% مقارنة بالصوديوم السام.

الجدول (1): تحديد التركيز الأمثل من حامض الهيوميك (%) بدلالة استجابة تجذير عقل الخيار بعمر 10 يوم.

معاملة العقل بحامض الهيوميك (%) لمدة 24 ساعة	معدل عدد الجذور (جذر/عقلة)
الماء المقطر	30.0
0.00001	24.0
0.0001	25.0
0.001	**30.2**
0.01	24.0
0.1	22.1
1	18.0
2	15.6
4	8.0
6	5.0
8	3.1
10	0
12.4	0
LSD (0.05)	**4.369**

جدول (2) : تأثير حامض الهيوميك (HA) في معالجة سمية الصوديوم بدلالة أستجابة تجذير عقل الخيار بعمر 10 يوم.

العقل المعاملة	معدل عدد الجذور (جذر/عقلة)
الماء المقطر لمدة 24 ساعة	33.3
NaCl (75 ملي مكافئ/لتر) لمدة 24 ساعة	13.0
HA (0.001 %) لمدة 24 ساعة	24.3
NaCl (75 ملي مكافئ/لتر) لمدة 12 ساعة ← HA (0.001 %) لمدة 12 ساعة	25.6
HA (0.001 %) لمدة 12 ساعة ← NaCl (75 ملي مكافئ/لتر) لمدة 12 ساعة	15.0
HA (0.001 %) + NaCl (75 ملي مكافئ/لتر) لمدة 24 ساعة	31.0
L.S.D (0.05)	**4.890**

الجدول (3): تأثير سمية الصوديوم في تركيز الهرمونات IAA وGA3 وABA لعقل الخيار بعمر 10 يوم والمعالجة بحامض الهيوميك.

المعاملات (لمدة 24 ساعة)	تركيز IAA (M)	تركيز GA_3 (M)	تركيز ABA (M)
ماء مقطر	2.2×10^{-3}	34×10^{-3}	10×10^{-3}
NaCl (75 ملي مكافئ/لتر)	0.9×10^{-3}	18×10^{-3}	34×10^{-3}
HA (0.001%)	1.9×10^{-3}	15×10^{-3}	9×10^{-3}
NaCl (75 ملي مكافئ/لتر)+HA (0.001%)	1.6×10^{-3}	35×10^{-3}	14×10^{-3}
قيمة $L.S.D_{(0.05)}$	$\mathbf{0.053\times10^{-3}}$	$\mathbf{2.9\times10^{-3}}$	$\mathbf{2.7\times10^{-3}}$

دور حامض الهيوميك في إزالة سمية الصوديوم بدلالة فعالية الانزيمات CAT وSOD وAPX و-IAA oxidase في عقل الخيار

يبين الجدول (4) حصول زيادة معنوية في فعالية إنزيم CAT عند معاملة العقل لمدة 24 ساعة بالتركيز السام من كلوريد الصوديوم وبالتركيز الامثل من حامض الهيوميك سويةً مع كلوريد الصوديوم السام فكانت الفعالية (1.80) وحدة إي إرتفعت بنسبة 275% مقارنة بالمعاملة بحامض الهيوميك (0.68) وحدة وبنسبة إنخفاض 40% مقارنة بمعاملة التركيز السام. وفي نفس الوقت أزدادت معنوياً فعالية إنزيم SOD معنوياً عند معاملة العقل لمدة 24 ساعة بالتركيز السام من كلوريد الصوديوم (11.2 U) مقارنة بالسيطرة (5.56 U) إي بنسبة زيادة 101.1%، في حين لم يكن هنالك فرقاً معنوياً في فعالية الانزيم (6.67) عند معاملة العقل بحامض الهيوميك مقارنة بالسيطرة. ولم ينجح حامض الهيوميك من إيقاف الزيادة الحاصلة في فعالية الانزيم (بسبب الصوديوم السام) عند تجهيزهما سويةً وسجل (10.57) حيث لم تختلف معنوياً عن معاملة كلوريد الصوديوم السام. كما أزدادت فعالية أنزيم APX معنوياً عند معاملة العقل لمدة 24 ساعة بالتركيز السام من كلوريد الصوديوم الى (1.77×10^{-3}) وحدة مقارنة بالسيطرة (1.31×10^{-3}) إي بنسبة زيادة 35.1%، وكانت فعالية الانزيم (1.22×10^{-3}) وحدة عند معاملة العقل بالتركيز الامثل من حامض الهيوميك، وبهدف تخفيض فعالية الانزيم فقد جهزت العقل بالتركيز الافضل من حامض الهيوميك سويةً مع الصوديوم السام فكان فعاليتها (1.37×10^{-3}) وحدة إي بنسبة إنخفاض 22.6%.

سببت سمية الصوديوم زيادة فعالية انزيم IAA-oxidase معنوياً الى (18.40) وحدة وبنسبة زيادة 49.6% عند معاملة العقل لمدة 24 ساعة بالتركيز السام من كلوريد الصوديوم مقارنة بالسيطرة (12.30) وحدة، وسجلت معاملة العقل بحامض الهيوميك (15.26) وحدة. وبهدف الحد من سمية الصوديوم، وعند تجهيز العقل بالتركيز الافضل من حامض الهيوميك سويةً مع الصوديوم السام إنخفضت فعالية الانزيم الى (15.53) وحدة وبنسبة 15.6% مقارنة بالسام، إي ان حامض الهيوميك أوقف ما نسبته 26.2% من العمليات التي يسببها إجهاد الصوديوم السام والتي هي كما تمت الاشارة اليها إعلاه (الجدول-5).

تأثير حامض الهيوميك في إزالة سمية الصوديوم بدلالة محتوى مضادات الاكسدة اللانزيمية GSH وASA وProline في عقل الخيار

يبين الجدول (5) حصول إنخفاض معنوي في محتوى الكلوتاثيون عند معاملة العقل لمدة 24 ساعة بالتركيز السام من كلوريد الصوديوم الى (42.01) مليغرام/غم. وزن طري مقارنة بالسيطرة (53.9) مليغرام/غم. وزن طري إي إنخفضت بنسبة 22.05%، وسجلت معاملة العقل بحامض الهيوميك (59.14) مليغرام/غم. وزن طري. وبهدف الحد من سمية الصوديوم، فقد جهزت العقل بالتركيز الافضل من حامض الهيوميك سويةً مع الصوديوم السام فرفع محتوى الكلوتاثيون (62.68) مليغرا م/غم. وزن طري إي ان حامض الهيوميك زاد من محتوى الكلوتاثيون معنوياً بنسبة 16.2% عن معاملة التركيز السام وبعبارة أخرى لم يختلف معنوياً عن معاملة السيطرة أي ان حامض الهيوميك أوقف بشكل كامل العمليات التي تحدث بسبب الصوديوم السام. كما أنخفض معنوياً محتوى الاسكوربيت (23.18) مليغرام/غم. وزن طري أي بنسبة إنخفاض 63.74% عند معاملة العقل لمدة 24 ساعة بالتركيز السام من كلوريد الصوديوم مقارنة بالسيطرة (63.93) مليغرام/غم. وزن طري، وسجلت معاملة العقل بحامض الهيوميك (33.64) مليغرام/غم. وزن طري. وعند تجهيز العقل بالتركيز الامثل من حامض الهيوميك سويةً مع الصوديوم السام فكان محتوى الاسكوربيت (30.94) مليغرام/غم. وزن طري إي ان هذا الحامض لم يكن له أي تأثير في محتوى الاسكوربيت وبدون أي فرق معنوي عن معاملة الصوديوم السام. كما حصلت زيادة معنوية في محتوى البرولين وبنسبة 374.9% فبلغ (4.39) ملغم/غم. نسيج نباتي عند معاملة العقل لمدة 24 ساعة بالتركيز السام من كلوريد الصوديوم مقارنة بالسيطرة (0.98) ملغم/غم. نسيج نباتي، وسجلت معاملة العقل بحامض الهيوميك (2.45) ملغم/غم. نسيج نباتي. وبهدف الحد من سمية الصوديوم، فقد جهزت العقل بالتركيز الامثل من حامض الهيوميك سويةً مع الصوديوم السام فكان محتوى البرولين (3.72) ملغم/غم. نسيج نباتي إي بنسبة إنخفاض 15.3% مقارنة بمعاملة الصوديوم السام ولكن لا يزال 3.7 ضعف عن معاملة السيطرة.

الجدول (4): تأثير سمية الصوديوم في فعاليات مضادات الاكسدة الانزيمية لعقل الخيار بعمر 10 يوم والمعالجة بحامض الهيوميك.

المعاملات (لمدة 24 ساعة)	(U)CAT	(U) SOD	(U) APX	IAA-oxidase (U)
ماء مقطر	0.48	5.56	1.31×10^{-3}	12.30
NaCl (75 ملي مكافئ/لتر)	1.80	11.20	1.77×10^{-3}	18.40
HA (0.001%)	0.68	6.67	1.22×10^{-3}	15.26
NaCl (75 ملي مكافئ/لتر)+ HA (0.001%)	1.08	10.57	1.37×10^{-3}	15.53

قيمة $L.S.D_{(0.05)}$	**0.414**	**3.731**	**2.97×10^{-5}**	**2.378**

الجدول (5): تأثير سمية الصوديوم في محتوى مضادات الاكسدة اللانزيمية لعقل الخيار بعمر 10 يوم والمعالجة بحامض الهيوميك.

المعاملات (لمدة 24 ساعة)	GSH (mg/g.F.W)	ASA (mg/g.F.W)	Proline (mg/g.D.W)
ماء مقطر	53.90	63.93	0.98
NaCl (75 ملي مكافئ/لتر)	42.01	23.18	4.39
HA (0.001%)	59.14	33.64	2.45
NaCl (75 ملي مكافئ/لتر)+ HA (0.001%)	62.68	30.94	3.72
قيمة $L.S.D_{(0.05)}$	**9.453**	**10.10**	**0.169**

المناقشة

تم دراسة تأثير سمية الصوديوم بهيئة ملح كلوريد الصوديوم NaCl في بعض المعايير الفسلجية والبايوكيميائية لنبات الخيار، وحدد التركيز السام للصوديوم في نبات الخيار اعتماداً على أنخفاض مؤشرات النمو بدلالة عدد الجذور العرضية المتكشفة في العقل الى النصف (50%)، إذ أختزل عدد الجذور بنسبة 47.36% عند التركيز (75ملي مكافئ/لتر) مقارنة بالسيطرة (الماء المقطر) (مرهج وشهيد، 2016) أن هذا قد تزامن مع تضرر الاغشية السايتوبلازمية بدلالة التوصيلية الكهربائية EC وأنخفاض الكلوروفيلات a وb والكلي والمساحة السطحية للورقة ومعدل النتح وكذلك الوزن الطري والجاف (مرهج وشهيد، 2016) وهذا يتفق مع (Hasegawa *et al*., 2000) إذ أوضح أن الصوديوم يكون سام وضار جداً في معظم الخلايا النباتية عندما يكون موجوداً بتراكيز من (1-10) ملي مولار. كما أن أكثر من 50% من عقل *Casuarina equisetifolia* قد ماتت بتعريضها لتراكيز عالية من NaCl والذي يعزى الى عدم قدرة العقل للتجذير في البيئة المجهدة بسبب أمتصاص كميات سامة من Na^+ وCl^- (Kuligod *et al*., 1995).

أن تأثير سمية الصوديوم في المؤشرات الفسلجية أعلاه قد أنعكس على تركيز هرموني IAA وGA3 فأنخفض معنوياً بنسبة 59.09% و47.1% على التوالي مقارنة بالسيطرة (الماء المقطر) (الجدول-3) وأن أنخفاض محتوى IAA قد يعزى الى زيادة فعالية أنزيم IAA-oxidase (الجدول-4). وهذا يتفق مع (Yurekli *et* al., 2004) من أنخفاض تركيز IAA في أوراق نبات *Phaseolus vulgaris* مع زيادة تركيز ملح NaCl. كما إزداد تركيز IAA بنسبة 77.7% مقارنة بالسيطرة عند إستخدام حامض الهيوميك (0.001%) مع كلوريد الصوديوم (الجدول-3) مما يؤكد إختزاله في الوقت نفسه لفعالية أنزيم IAA-oxidase (الجدول-4). وتتفق النتائج الاخيرة في كلا الحالتين مع (Kalaichelvi *et al*., 2006) حول زيادة تركيز IAA وأنخفاض فعالية IAA-oxidase وبالتالي زيادة الانقسام الخلوي وزيادة النمو. وأظهرت المعاملة بحامض HA زيادة بنسبة 94.4% في تركيز هرمون GA3 مقارنة بالسيطرة (الجدول-3). بينما ازداد تركيز حامض الابسيسك ABA في العقل المعاملة بالصوديوم السام بنسبة 240% مقارنة بالسيطرة، وهذا يتفق مع (Tuteja, 2007) من ان الاجهاد الملحي يسبب زيادة في محتوى ABA، وكذلك مع (Kaveh *et al*., 2011) الذي أوضح ان الاجهاد الملحي يسبب أنخفاض محتوى الجبرلين. في حين أدت معاملة العقل بحامض الهيوميك مع كلوريد الصوديوم الى أنخفاض تركيز ABA بنسبة 58.8% عند تجهيز العقل. وهذا يتفق مع ما وجدته (Abbas, 2013) من أن حامض الهيوميك يمنع تحطيم هرموني IAA (من خلال تثبيط فعالية أنزيم IAA-oxidase) وGA3 بالاضافة الى أنخفاض تركيز هرمون ABA عند أضافته لنباتات الباقلاء. والذي قد يعزى الى ان حامض الهيوميك يعمل على توفر مغذيات كالبوتاسيوم (دوره في زيادة نسبة $Na^+\backslash K^+$) والزنك (دوره في البناء الحيوي للاوكسين) (Khaled & Fawy, 2011).

إزدادت فعالية إنزيمات CAT وSOD وAPX في العقل المعاملة بالصوديوم السام بنسبة 275% و101.1% و35.1% مقارنة بالسيطرة (الماء المقطر) (الجدول-4). وقد أشار Soleimanzadeh وجماعته (2010) الى حصول زيادة معنوية في فعالية أنزيم CAT في نباتات زهرة الشمس المعرضة للاجهاد الجفافي. كما يسبب الاجهاد الملحي زيادة في فعالية أنزيم SOD في نباتات *Zea mays* L. (Maathuis, 2014). فضلاً عن ما بينه Shalata وTal (1998) من زيادة فعالية APX في نباتات الطماطم الحساسة والمقاومة للملح عند تنميتها بوجود NaCl. يزداد نشاط هذه الانزيمات بأعتبارها آليات أنزيمية مضادة للأكسدة (Gao *et al*., 2015). وكمعالجة فقد أدت معاملة العقل بحامض الهيوميك مع الصوديوم السام الى إنخفاض فعالية الانزيمات CAT بنسبة 40% وAPX بنسبة 22.6% وSOD بنسبة 5.6% مقارنة بالتركيز السام (الجدول-4). أن سبب زيادة فعالية أنزيم CAT فوق السيطرة الى ما يقرب من ثلاثة أضعاف تقريباً (275%) مقارنة بالـ SOD (101.1%) وAPX (35.1%)، قد يعود الى كون الاجهاد الملحي هو أجهاداً تأكسدياً مما يؤدي الى تراكم

ROS وبالذات H_2O_2 حيث وصلت نسبته الى 470% مقارنة بالسيطرة مما يوفر Substrate عالٍ يتناسب مع الزيادة في فعالية أنزيم CAT أعلاه (الجدول-4). كما سببت سمية الصوديوم زيادة فعالية إنزيم IAA-oxidase في العقل المعاملة بالصوديوم السام بنسبة 49.6% مقارنة بالسيطرة (الماء المقطر) (الجدول-5). وهذا يتفق مع ما بينه Darbyshire (1971) من زيادة فعالية IAA-oxidase عند التعرض للاجهاد المائي Water stress. وأدت معاملة العقل بحامض الهيوميك مع الصوديوم السام الى إنخفاض فعالية الانزيم بنسبة 54.31% مقارنة بالسيطرة (الجدول-4). إذ يحتوى حامض الهيوميك على مواد محفزة للنمو وتساعد بصورة غير مباشرة في تحفيز نمو وأنتاج المحاصيل من خلال تثبيط فعالية IAA-oxidase (Kalaichelvi *et al*., 2006).

أما فيما يخص مضادات الاكسدة اللانزيمية، فقد أنخفض محتوى الكلوتاثيون والاسكوربيت في العقل المعاملة بالصوديوم السام بنسبة 22.05 و 63.74% على التوالي مقارنة بالسيطرة (الجدول-5)، وهذا يتفق مع ما وجده (Arshi *et al*., 2010) من أنخفاض محتوى الكلوتاثيون والاسكوربيت عند معاملة نبات فول الصويا (*Glycine max* L.) بـNaCl. وأدت معاملة المعالجة بحامض الهيوميك الى حصول زيادة معنوية مع GSH (16.2%) وغير معنوية في محتوى الاسكوربيت مقارنة بالماء المقطر. تظهر المواد الدبالية Humic substances تأثيرات مضادة للاجهاد Antistress effects تحت ظروف الاجهاد للاحياتي مثل الملوحة (*Phaseolus vulgaris* L.) bean (Aydin *et al*., 2012).

وأن زيادة محتوى البرولين في العقل المعاملة بالصوديوم السام بنسبة 347.9% مقارنة بالسيطرة (الماء المقطر) (الجدول-5) والذي يعزى الى قيام البرولين بالعديد من الوظائف مثل تنظيم الضغط الاوزموزي وحماية الاغشية وثباتية البروتينات والانزيمات والمحافظة على $NADP^+$/NADPH وكاسح للجذور الحرة الفعالة وأزالة الايونات السامة (Kavi *et al*., 2005)، وحفظ النتروجين والطاقة الى مرحلة ما بعد الاجهاد (Aloni & Rosenshtein, 1984). كما أنه يساهم في تجهيز الطاقة اللازمة لحجز الايونات في الفجوات (McCue & Hanson, 1990). تؤدي المعاملة بـNaCl الى زيادة تراكم البرولين من خلال تنشيط الانزيمات المسؤولة عن تخليق البرولين مثل Pyrroline-5-carboxylate reductase و(OAT) Ornithine aminotransferase (Kohl *et al*., 1990) أو تثبيط تحطيمه (Mattioni *et al*., 1997) من خلال أختزال فعالية أنزيم Proline oxidase (المسؤول عن تحطيم البرولين Proline oxidation) في نبات *Brassica juncea* (Madan *et al*., 1995). وبهدف المعالجة، فأن أضافة HA مع الصوديوم السام سويةً قد أختزل محتوى البرولين بنسبة 15.2% مقارنة بمعاملة الصوديوم السام (الجدول-5)، الا أنه لا يزال 3.7 أضعاف السيطرة. وما يؤكد هذا الانخفاض في النباتات هو أضافة HA الى الترب المالحة أختزل محتوى البرولين في النبات (Maathuis, 2014). وكأقتراح أن سبب كون نسبة الاختزال 15.5% هي قليلة بعد معاملة المعالجة قد يعود الى أستمرارية تأثير NaCl في تنشيط إنزيم Pyrroline-5-carboxylate reductase و Ornithine aminotransferase المسؤولة عن تخليق البرولين أو بضعف حامض الهيوميك في تنشيط فعالية Proline peroxidase المسؤول عن تحطيم البرولين.

المصادر

مرهج، ايفان ابراهيم وشهيد، عبد الله (2016). تأثير سمية الصوديوم في سلامة الاغشية الخلوية وبعض المعايير الفسلجية في عقل الخيار *Cucumis sativus* L.. مجلة الفرات للعلوم الزراعية. (قيد النشر).

Abbas, S.M. (2013).The influence of biostimulants on the growth and on the biochemical composition of *Vicia faba* CV. Giza 3 beans. Romanian Biotechnological Letters ,18 (2): 8061-8068.

Aebi, H.(1974). Catalase In :Methods of Enzymatic Analysis Volume 2 , PP:673-684.

Agarwal, S. & Pandey, V. (2004). Antioxidant enzyme responses to NaCl stress in *Cassia angustifolia*. Biol. Plant, 48: 555-560.

Aloni, B. & Rosenshtein, G. (1984). Proline accumulation: A parameter for evaluation of sensitivity of tomato varieties to drought stress? Physiol. Plant, 61: 231–235.

Arshi, A.; Ahmad, A.; Aref, I.M. & Iqbal, M. (2010). Effect of calcium against salinity-induced inhibition in growth, ion accumulation and proline contents in *Cichorium intybus* L. J. Environ. Bio., 31(6) 939-944.

Asada, K. & Chen, G.(1992). Interaction of ascorbate peroxidase by thoils requires hydrogen peroxide**.** Plant Cell Physiol., 33: 117-123.

Aydin, A.; Knt, C. & Turan, M. (2012). Humic acid application alleviate salinity stress of bean (*Phaseolus vulgaris* L.) plants decreasing membrane leakage. Afr. J. Agricult. Res., 7 (7): 1073-1086.

Bates, L.S.; Waldren, R. & Teare, I.D. (1973). Rapid determination of free proline for water-stress studies. Plant and Soil, 39:205-207.

communis L.) under phosphate deficiency and moderate salinity. J Exp Bot 48:1737–1747.

Kalaichelvi, K.; Chinnusamyl, C. & Swaminathan, A.A. (2006). Exploiting the natural resource-lignite humic acid in agriculture- a review. Agric. Rev., 27 (4) : 276 – 283.

Kang, D.J.; Seo, Y.J.; Lee, J.D.; Ishii, R.; Kim, K.U.; Shin, D.H.; Park, S.K.; Jang, S.W. & Lee, I.J. (2005). Jasmonic acid differentially affects growth, ion uptake and abscisic acid concentration in salt-tolerant.

Kaveh, H.; Nemati, H.; Farsi, M. & Jartoodeh, S.V. (2011). How Salinity Affect Germination and Emergence of Tomato Lines. J. BIOL. ENVIRON. SCI., 5(15), 159-163.

Kavi Kishor, P.B., Sangam, S., Amruth, R.N., Sri Laxmi, P., Naidu, K.R., Rao, K.R., Sreenath, S.S.,Rao Reddy ,K.J., Theriappan, P.and Sreenivasulu, N. (2005). Regulation of proline biosynthesis, degradation, uptake and transport in higher plants: its implications in plant growth and abiotic stress tolerance. Current Science, 88: 424-438.

Keskin, B.C.; Sarikaya, A.T.; Yuksel, B. & Memon, A.R. (2010). Abscisic acid regulated gene expression in bread wheat. Aust. J. Crop Sci., 4:617–625.

Khaled, H. & Fawy, H.A. (2011). Effect of Different Levels of Humic Acids on the Nutrient Content, Plant Growth, and Soil Properties under Conditions of Salinity. *Soil & Water Res., 6, (1): 21–29.*

Kohl, D.H.; J.J. Lin; Shearer, G. & Schubert, K.R. (1990). Activities of the pentose phosphate pathway and enzymes of proline metabolism in legume root nodules. Plant Physiol., 94: 1258-1264.

Kuligod, V.; Doddamani, V.S. & Paul, S.G. (1995). Effect of soil salinity on growth of *Casuarina equisetifolia.* Current Agriculture, 19: 51-53.

Kulikova, N.A.; E.V. Stepanova, & O.V., Koroleva (2005). Mitigating activity of humic substances direct influence on biota, Use of humic substances to

Blumwald, E.; Aharon, G.S. & Apse, A.M. (2000). Sodium transport in plant cells. Biochimica et Biophysica Acta, 1465: 140-151.

Boscolo, P.R.S.; Menossi, M. & Jorge, R.A. (2003). Aluminum induced oxidative stress in maize. Phyto. Chem., 62: 181-189.

Ellman .(1959). 5,5'-Dithiobis(2-nitrobenzoic acid) – a re-examination Anal. Biochem. 94, 75-81.

Epstein, E. & Bloom, A.J. (2005). Mineral Nutrition of Plants: Principles and Perspectives, 2nd ed. (Sunderland, MA: Sinauer Associates).

Gao, H.-J.; Yang, H.-Y.; Bai, J.-P.; Liang, X.-Y.; Lou, Y.; Zhang, J.-L.; Wang, D.; Zhang, J.-L.; Qiniu, S. & Chen, Y.-L. (2015). Ultra structural and physiological responses of potato(*Solanum tuberosum* L.) plantlets to gradient saline stress. Frontiers in plant science, 5:1-14.

Hamdia, M.A. & Shaddad, M.A.K. (2010). salt tolerance of crop plants. J. Stress Physiol. & Biochemist., 6: 64-90.

Hare, PD.; Cress, WA & Van Staden, J. (1999). Proline synthesis and degradation: a model system for elucidating stress-related signal transduction. J. Exp. Bot., 50: 413–434.

Hasegawa, P.M.; Bressan, R.A.; Zhu, J.K. & Bohnert, H.J. (2000). Plant cellular and molecular responses to high salinity. Annu Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 51: 463–499.

Horgan, R. & Smith, I.M. (1991). Methods in Plant Biochemistry. L.J. Rogers Edition, 5, 91-120, London Academic Press.

Hossain, M. A. & Fujita, M. (2011). Regulatory role of components of ascorbate-glutathione (AsA-GSH) pathway in plant tolerance to oxidative stress, In Oxidative Stress in Plants: Causes, Consequences and Tolerance, N. A. Anjum, S. Umar, & Ahmed, A.Eds., IK International Publishing House Pvt. Ltd., New Delhi, India.

Jeschke, W.D.; Peuke, A.D.; Pate, J.S. & Hartung, W. (1997). Transport, synthesis and catabolism of abscisic acid (ABA) in intact plants of castor bean (*Ricinus*

Rengasamy, P. (2006). World salinization with emphasis on Australia. J. Exp. Bot., 57:1017–1023.

Shalata, A. & Neumamnn, P.A. (2001). Exogenous ascorbic acid (vitamin C) increases resistance to salt and reduce lipid peroxidation. J. Experi. Bot. V, 52, No. 364,pp2207-2211.

Shalata, A. & Tal, M. (1998). The effect of salt stress on lipid peroxidation and antioxidants in the leaf of the cultivated tomato and its wild salt-tolerant relative *Lycoperiscon penellii*. Physiologia Plantarum, 104: 169-174.

Soleimanzadeh, H.; Habibi, D.; Ardakani, M.R.; Paknejad, F. & Rejali, F. (2010). Effect of Potassium Levels on Antioxidant Enzymes and Malondialdehyde Content under Drought Stress in Sunflower (*Helianthus annuus* L.). Am. J. Agri. & Bio. Sci. 5 (1): 56-61.

Stevenson, F.J.(1994). Humus Chemistry: Genesis, Composition, Reactions. New York: John Wiley & Sons.

Trajkova, F. & Papadantonakis, N. (2006). Comparative effects of NaCl & $CaCl_2$ salinity on cucumber grown in a closed hydroponic system. Hort. Sci., 41 (2): 437-441.

Turan, M.A.; Awa, Elkarim, A.H.; Taban, N. & Taban, S. (2009). Effect of salt stress on growth, stomatal resistance, proline and chlorophyll concentrations on maize plant. Afr. J. Agric. Res., 4 (9): 893-897.

Tuteja, N. (2007). Mechanisms of High Salinity Tolerance in Plants. Methods in Enzymology, 428: 419-438.

Wang, M.; Zheng, Q.; Shen, Q. & Guo, S. (2013). The critical role of potassium in plant stress response. Int. J. Mol. Sci., 14: 7370-7390.

Yu, B.P. (1994). Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. Physiol. Rev., 74: 139-162.

Yurekli, F.; Porgali, Z. B. & Turkan, I. (2004). Variations in abscisic acid, indole-3-acetic acid, gibberellic acid and zeatine concentrations in two bean species subjected to salt stress. Acta Biologica remediate polluted environments: From theory to practice, Perminova, I.V.; Hatfield, K. and Hertkorn, N.; Springer, Netherlands, pp. 285-310.

Landi, M.; DeglInnocenti, E.; Pardossi, A. & Guidi, L. (2012). Antioxidant and photosynthetic responses in plants under boron toxicity: A Review. Amer. J. of Agric. and Biol. Sci., 7(3): 255-270 .

Maathuis, F. J. M. (2014). Sodium in plants: perception, signalling, and regulation of sodium fluxes. J. Exp. Bot. 65, 849–858.

Madan, S.; Nainawatte, H.S.; Jain, R.K. & Choudhury, J.B. (1995). Proline and proline metabolizing enzymes *in vitro* selected NaCl tolerant *Brassica juncea* under salt stress. Ann. Bot., 76: 51-57.

Mahmoudi, M.; Samavat, S.; Mostafavi, M.; Khalighi, A. & Cherati, A. (2013). The Effects of Humic Acid and Proline on Morphological Properties of Actindia Deliciosa cv. Hayward under Salinity. Journal of Applied Science and Agriculture, 9 (1): 261-267.

Marklund, S., & Marklund, G. (1974). Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. European Journal of Biochemistry, 47(3), 469-474.

Mattoni, R.H.T.; G.F., Pratt; T.R., Longcore; J.F., Emmel & J.N., George (1997). The endangered Quino checkerspot butterfly, *Euphydryas editha quino* (Lepidoptera: Nymphalidae). *Journal of Research on the Lepidoptera* 34:99–118.

McCue, K.F. & Hanson, A.D. (1990). Drought and salt tolerance: towards understanding and application, Biotechnol., 8: 358–362.

McKersie, D.B. (1996).”Oxidative Stress” Retrieved October 25, 2000 from the World Wide Web: http://www.agronomy.psu. edu/Courses/AGRO518 /Oxygen.htm.

Poltronieri, P.; Bonsegna, S.; Domenico, S.D. & Santino, A. (2011). Molecular mechnasims in plant abiotic stress response. Field Veg. Crop. Res., 48: 15-24.

Cracoviensia Series Botanica, 46: 201–212.