نشریه علوم باغبانی (علوم و صنایع کشاورزی)
جلد ۳۳، شماره ۲، تابستان ۱۳۹۸، ص. ۲۳۲-۲۱۹
شاپا: ۴۷۳۰ - ۲۰۰۸

Journal of Horticultural Science
Vol. 33, No.2, Summer 2019, P. 219-232
ISSN: 2008 - 4730

بررسی تأثیر سطوح مختلف گوگرد بر رشد، صفات کیفی و عملکرد گل گیاه دارویی آرنیکای چامیسو (*Arnica chamissonis* Less. ssp. *foliosa*)

مژده اسدی[۱]- جواد هادیان[۲*] - صمد نژاد ابراهیمی[۳] - قاسم کریم‌زاده[۴]

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۰۱/۲۹
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۰۱/۱۹

چکیده

آرنیکای چامیسو با نام علمی *Arnica chamissonis* Less. ssp. *foliosa* گیاهی چندساله، ریزوم‌دار، با مصارف دارویی از خانواده آفتابگردان و بومی آمریکای شمالی و کانادا است. با توجه به نیاز این گیاه به مناطق خنک و خاک‌های با pH اسیدی و با هدف بررسی سازگاری این گیاه در ایران، تأثیر سطوح مختلف کود گوگرد بر کاهش pH خاک و عملکرد آرنیکای چامیسو مورد بررسی قرار گرفت. آزمایش در قالب طرح بلوک کامل تصادفی با ۴ تیمار شامل سطوح مختلف کود گوگرد بنتونیتی (صفر، ۲۵۰، ۵۰۰ و ۷۵۰ کیلوگرم در هکتار) به همراه باکتری *Thiobacillus thiooxidans* در سه تکرار انجام شد. صفاتی از جمله ارتفاع، سطح مقطع بوته، تعداد گل در بوته، قطر گل‌آذین، عملکرد وزن تر و خشک گل در بوته و در مترمربع، هم‌چنین محتوای فنل و فلاونوئید کل، روتین، لوتئولین و آپی‌جنین عصاره گل‌ها اندازه‌گیری شدند. نتایج این بررسی نشان داد که آرنیکای چامیسو با منطقه مورد پژوهش سازگاری داشته و می‌توان آن را در اقلیم‌های مشابه، در مقیاس وسیع کشت کرد. در گیاهان تغذیه شده با تیمار ۲۵۰ کیلوگرم گوگرد در هکتار بیش‌ترین ارتفاع بوته (۲۵/۶ سانتی‌متر)، سطح مقطع بوته (۲۵/۴۸ سانتی‌متر)، قطر ساقه (۳/۴۹ میلی‌متر)، قطر گل (۲۹/۶۱ میلی‌متر)، تعداد کل گل در بوته (۵۸/۶۶) و عملکرد گل (۲۰/۶۷ گرم در بوته) نسبت به شاهد مشاهده شد. مصرف سطوح بالای گوگرد سبب کاهش صفات رشدی و عملکردی و افزایش فنل کل، فلاونوئید کل، روتین، لوتئولین و آپی‌جنین عصاره گل‌ها شد که این امر با افزایش قابل ملاحظه هدایت الکتریکی خاک همراه بود.

واژه‌های کلیدی: اصلاح خاک، تغذیه گیاه، سازگاری، کود گوگرد

مقدمه

دو گونه گیاه دارویی *Arnica chamissonis* Less و *A. montana* L. گیاهانی بسیار جذاب برای صنایع دارویی و آرایشی - بهداشتی بوده که تقاضای جهانی برای گل‌های آن در حال افزایش است (۲۳ و ۴۹). این گونه‌ها در ساخت بسیاری از محصولات دارویی (بیش از ۳۰۰ مورد در اروپا و حدود ۲۰ محصول در کانادا) مورداستفاده قرار می‌گیرند (۳۸). اثرات دارویی گل‌ها عمدتاً به‌دلیل حضور سزکوئی‌ترپن لاکتون‌ها، فلاونوئید و فنولیک اسیدها در گل‌های انتهایی گزارش شده است (۲۳، ۴۳ و ۴۴). گل‌های آرنیکا به‌طور گسترده برای درمان عوارضی ازجمله کبودی، رگ به رگ شدن، دردهای عضلانی، درد مفصل، تورم ناشی از شکستگی استخوان و بهبود زخم استفاده می‌شود (۱۳ و ۳۰).

آرنیکای چامیسو با نام علمی *A. chamissonis* ssp. *foliosa* گیاهی چندساله، ریزوم‌دار از خانواده آفتابگردان[5] و بومی آمریکای شمالی و کانادا است. این گیاه از طریق کشت بذر و تقسیم بوته تکثیر می‌شود (۱۸ و۲۷). به‌دلیل نیازهای اکولوژیک خاص، کشت و کار گیاهان جنس آرنیکا به‌خصوص *A. montana* به راحتی امکان‌پذیر نیست (۱۴ و ۴۸). حساسیت آرنیکا به شرایط خاک به‌ویژه pH خاک، زهکش نامناسب، پوسیدگی طوقه، بیماری‌های قارچی نظیر فیتوفتورا[6] و فوما[7] از عوامل عمده محدودکننده کشت آن است (۷). آرنیکای چامیسو در طبیعت پراکنش گسترده‌تری داشته و کشت و کار آن به دلیل نیازهای اکولوژیکی محدودتر نسبت به *A. montana* راحت‌تر

۱، ۲- دانش آموخته کارشناسی ارشد و دانشیار گروه فیزیولوژی و اصلاح گیاهان دارویی، پژوهشکده گیاهان و مواد اولیه دارویی، دانشگاه شهید بهشتی تهران
(*- نویسنده مسئول: Email: J_hadian@sbu.ac.ir)
۳- استادیار گروه فیتوشیمی، پژوهشکده گیاهان و مواد اولیه دارویی، دانشگاه شهید بهشتی تهران
۴- دانشیار گروه ژنتیک و به‌نژادی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس

DOI: 10.22067/jhorts4.v0i0.71858

5- Asteraceae or Compositae
6- *Phytophthora*
7- *Phoma*

است (۴۲). این گیاه خاک‌هایی با زهکش مناسب و مخلوطی از شن، لوم و پیت را ترجیح می‌دهد و حساسیت بالایی به خشکی و شوری دارد. مهم‌ترین محدودیت کشت این گیاه در مناطق مختلف، حساسیت آن به pH خاک است و محدوده‌ی مناسب pH خاک برای آن ۵/۵ تا ۶/۵ است (۳۹).

تاکنون مطالعات مختلفی در زمینه کشت و تولید *A. montana* انجام شده است. رادانوویک و همکاران (۳۳) سازگاری و عملکرد دو ژنوتیپ *A. montana* و *A. chamissonis* را در مناطقی از رشته کوه‌های غرب صربستان مورد بررسی قرار دادند. در این تحقیق، کشت پاییزه آرنیکای چامیسو با نشاء در مقایسه با گیاهان مستقر شده با ریزوم، عملکرد بالاتری داشت. عملکرد گل خشک گیاهان مستقرشده با نشاء، ۳۴۳ و ۴۲۶ کیلوگرم در هکتار برای سال دوم و سوم ثبت گردید و در سال چهارم عملکرد به ۴۵ کیلوگرم در هکتار کاهش یافت. اسمالفیلد و همکاران (۳۹) کشت *A. montana* را در نیوزیلند بررسی نموده و بیان کردند که نیازهای محیطی رشد این گیاه در نیوزیلند هنوز به‌طور واضح شناخته نشده است، زیرا اکثر گیاهان برای تولید گل در طول سه فصل پی‌درپی با شکست مواجه شدند که فقدان گل‌دهی به دلیل عدم دریافت نیاز سرمایی مورد نیاز گیاهان نسبت داده شد. سوگیر (۴۳) در پژوهشی کشت و سازگاری *A. montana* و *A. chamissonis* را در لهستان مورد مطالعه قرار داد. دوره گل‌دهی آرنیکای چامیسو در لهستان ۲۰ تا ۲۵ روز طول کشید. عملکرد گل خشک هر دو گونه تا سال سوم کشت افزایش یافت، اما کاهش قابل‌توجهی در سال چهارم مشاهده شد.

امروزه گوگرد متداول‌ترین و اقتصادی‌ترین ماده‌ای است که برای اسیدی کردن خاک به‌کار می‌رود. اثرات مفید کاربرد گوگرد در خاک شامل کاهش اسیدیته خاک، افزایش قابلیت جذب عناصر غذایی، افزایش کمیت و بهبود کیفیت محصول می‌باشد (۱۷). تأثیر گوگرد به‌منظور تأمین نیاز گیاه به این عنصر و یا بهبود وضعیت تغذیه‌ای گیاه زمانی مؤثر خواهد بود که گوگرد به میزان قابل توجهی در خاک اکسید شود (۱۹). اکسیداسیون کودهای گوگردی به سولفات تحت تأثیر دمای خاک، رطوبت، تهویه و pH خاک قرار دارد (۱۶). باکتری‌های جنس تیوباسیلوس به‌ویژه *Thiobacillus thiooxidans* با اکسید کردن گوگرد ضمن تأمین سولفات موردنیاز گیاه، با کاهش pHخاک به‌طور غیرمستقیم در اطراف ریشه‌ها باعث افزایش جذب عناصری چون فسفر، روی، آهن و دیگر عناصر غذایی کم‌مصرف شده و موجب افزایش کمّی و کیفی محصول می‌شوند (۲۹). بررسی تأثیر کود گوگرد بر تغییرات pH خاک‌های آهکی نشان داد که بیش‌ترین میزان کاهش pH مربوط به تیمار گوگرد همراه تیوباسیلوس بود که pH خاک را طی ۱۸ هفته از ۹/۸ به ۷/۶ کاهش داد، درحالی‌که مصرف گوگرد به‌تنهایی در این مدت pH خاک را از ۹/۸ به ۷/۹ کاهش داد (۵). خاوازی و همکاران (۲۲) اظهار داشتند که اکسایش گوگرد توسط باکتری تیوباسیلوس به جذب گوگرد و سایر عناصر غذایی مانند فسفر، آهن و روی کمک می‌کند و با مصرف کود گوگرد غلظت آهن نسبت به شاهد به طور معنی‌داری افزایش می‌یابد. با عنایت به وجود منابع فراوان گوگرد در کشور و قلیایی بودن اکثر خاک‌ها و با هدف فراهم نمودن خاک با محدوده pH مناسب رشد گیاه دارویی با ارزش آرنیکای چامیسو، در این تحقیق تأثیر کاربرد سطوح مختلف گوگرد به همراه کود بیوسولفور بر سازگاری، رشد و عملکرد این گیاه بررسی شده است.

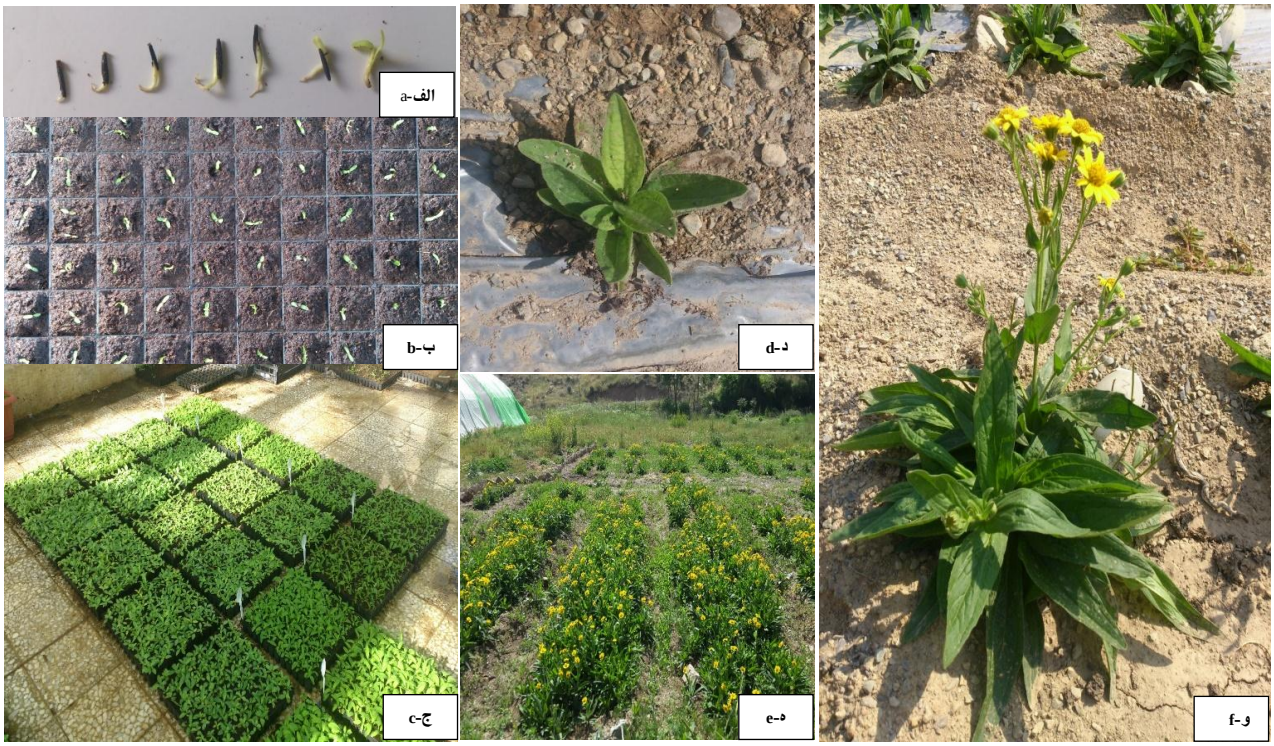
مواد و روش‌ها

این آزمایش در سال زارعی ۹۵-۱۳۹۴ در کلکسیون پژوهشکده گیاهان و مواد اولیه دارویی دانشگاه شهید بهشتی تهران با طول جغرافیایی ″۲۳ -′۲۵ -°۵۱، عرض جغرافیایی ″۴۶ -′۴۱ -°۳۵، متوسط ارتفاع ۱۷۷۶ متر از سطح دریا با آب و هوای معتدل انجام شد. متوسط بارندگی سالیانه ۴۲۰/۵ میلی‌متر، میانگین حداکثر دمای سالیانه ۲۰/۸ درجه سلسیوس و میانگین حداقل دمای سالیانه ۱۰/۵ درجه سلسیوس می‌باشد. این پژوهش در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی با سه تکرار اجرا شد. تیمارها شامل تلقیح خاک با گوگرد بنتونیتی در چهار سطح (صفر، ۲۵۰، ۵۰۰ و ۷۵۰ کیلوگرم در هکتار) انجام شد. جهت اکسیداسیون گوگرد به ازای هر ۵۰ کیلوگرم گوگرد بنتونیت‌دار یک کیلوگرم کود بیوسولفور (حاوی *T. thiooxidans*) استفاده شد (۲۲). به‌منظور بررسی خصوصیات فیزیکی و شیمیایی خاک، قبل از انجام عملیات آماده‌سازی زمین، نمونه‌برداری از عمق ۳۰ سانتی‌متری خاک انجام شد (جدول ۱).

جدول ۱- خصوصیات فیزیکی و شیمیایی خاک محل آزمایش (عمق ۳۰-۰ سانتی‌متر)

Table 1- Physical and Chemical Characteristics of the experimental Location (Depth 0-30 cm)

بافت خاک Soil Texture	EC (dS/m)	اسیدیته pH	مواد آلی Organic Material	پتاسیم قابل جذب Potassium	فسفر قابل جذب Phosphor	منگنز Manganese	آهن Iron	روی Zinc	مس Copper
						(mg/g)			
لومی‌شنی Loam-Sand	1.54	7.38	0.38	334.9	59.4	20.94	2.07	2.3	0.8



شکل ۱- مراحل مختلف فنولوژی گیاه آرنیکای چامیسو الف) جوانه زنی بذر ب) کاشت بذر در سینی نشا ج) گیاهان چهاربرگی د) استقرار نشا در زمین ه) مرحله گلدهی و) بوته کامل

Figure1- Different phenological stages of *Arnica chamissonis* a) seed germination b) sowing seeds in trays c) 4-leaf stage d) plant establishment in field e) flowering stage f) mature plant

بعد از آماده‌سازی زمین، کود دامی پوسیده به مقدار شش تن در هکتار به زمین اضافه شد. عناصر غذایی اصلی شامل فسفر و پتاسیم به‌ترتیب از منابع سوپر فسفات تریپل و سولفات پتاسیم به مقدار ۲۴ و ۶۶/۴ کیلوگرم در هکتار و کود ازته اوره به مقدار ۴۰ کیلوگرم در هکتار طی دو مرحله (اوایل بهار و بعد از جمع‌آوری گل‌ها) به‌طور یکسان در اختیار گیاهان قرار گرفت (۳۳). بذرهای آرنیکای چامیسو با قوه نامیه ۸۷ درصد از شرکت ژلیتو[1] آلمان تهیه شدند. در تاریخ ۲۰ اسفندماه ۱۳۹۴ در خزانه سرپوشیده و داخل سینی کشت با بستری شامل پیت ماس، کوکوپیت و ماسه به نسبت ۱:۱:۲ کشت شدند. جوانه‌زنی بذرها پس از ۱۰ تا ۱۴روز آغاز شد. انتقال نشاء در ۱۲ اردیبهشت‌ماه ۱۳۹۵، پس از رسیدن گیاهچه‌ها به مرحله چهار برگی و اعمال تیمارهای کود گوگرد، با فاصله‌ی بین ردیف ۶۰ سانتی‌متر و بین بوته ۴۰ سانتی‌متر صورت گرفت. کود گوگرد به همراه بیوسولفور مطابق مطابق با سطوح تعیین‌شده به‌صورت جداگانه آماده شد و در شیارهای کوچکی به عمق ده سانتی‌متر و با فاصله پنج سانتی‌متر از خطوط کاشت در تیمارهای موردنظر جایگذاری و سپس روی آن با خاک پوشانیده شد. بلافاصله پس از انتقال نشا، آبیاری به‌صورت غرقابی (جوی و پشته) انجام شد. به منظور جلوگیری از اختلاط اثر تیمارها، آبیاری کرت‌ها و بلوک‌ها به‌صورت جداگانه انجام گرفت. در مرحله گلدهی کامل دراواسط مردادماه صفات کمی مانند ارتفاع و سطح مقطع بوته‌ها با کمک خط‌کش و قطر ساقه به‌وسیله کولیس اندازه‌گیری شد. اولین جمع‌آوری گل‌آذین‌ها در مرحله بلوغ کامل و در تاریخ چهارم مردادماه انجام شد. کپه‌های گل هر هفت روز یک بار تا پایان فصل رشد جمع‌آوری شدند. تعداد گل در بوته با شمارش تمامی گل‌های تولیدشده در هر بوته در طول دوره‌ی زایشی محاسبه گردید. وزن تر و خشک گل برای تک بوته مربوط به گل‌های جمع‌آوری شده در طول دوره‌ی زایشی گیاه محاسبه شد. قطر گل با کولیس اندازه‌گیری شد.

اندازه‌گیری عناصر، هدایت الکتریکی و pH خاک

بافت خاک به‌روش هیدرومتر تعیین گردید. pH خاک در سوسپانسون دو به یک آب به خاک و هدایت الکتریکی در عصاره دو به یک آب تعیین شد (۲۶). میزان سولفات با استفاده از عصاره‌گیر مونوکلسیم فسفات (۳۷) و مقادیر روی، منگنز و آهن قابل جذب به روش عصاره‌گیری با DTPA (دی اتیلن تری آمین پنتا استیک اسید) انجام گرفت. جهت تعیین مقدار عناصر کم مصرف خاک، پس از

1- *Jelitto*

تنظیم دستگاه فلیم اسپکترومتری اتمیک[1] و کالیبراسیون استانداردها، میزان جذب و غلظت عناصر تعیین شد (۴۱).

تهیه عصاره و اندازه‌گیری فنل و فلاوونوئید کل

برای عصاره‌گیری، ابتدا ۲۰۰ میلی‌گرم از گل‌های خشک آرنیکای چامیسو برای هر تیمار وزن شد. سپس ۱۰ میلی‌لیتر متانول به آن اضافه و به مدت ۳۰ دقیقه در حمام اولتراسونیک[2] مدل پاورسونیک ۳۴۰۵[3]، در دمای اتاق قرار گرفت. پس از سونیکیشن[4]، عصاره متانولی حاصل جمع‌آوری و در دستگاه سانتریفیوژ یخچال‌دار مدل R۵۷۰۲ با ۴۰۰۰ دور در دقیقه قرار گرفت. محتوی فنل کل بر اساس واکنشگر Folin Ciocalteus Reagent (FCR) تخمین زده شد. میزان فنل کل گیاه معادل اسید گالیک اندازه‌گیری شد. از واکنش‌گر کلرید آلومینیوم ($AlCl_3$) برای سنجش فلاونوئیدها استفاده شد. از ترکیب فلاونوئیدی روتین برای رسم منحنی استاندارد استفاده شد (۲۱ و ۳۴).

به‌کارگیری کروماتوگرافی مایع با کارکرد بالا[5] (HPLC)

روش مورد استفاده جهت جداسازی و تعیین مقادیر روتین، آپی‌جنین و لوتئولین، کروماتوگرافی مایع با کارکرد بالا بود. دستگاه اچ‌پی‌ال‌سی به کار گرفته شده، مدل Waters 2695 ساخت آمریکا، مجهز به دتکتور UV 2487 Dual λ Absorbance Detector و ستون c18، با ابعاد ۴/۶ در ۱۵۰ میلی‌متر و ۳/۵ میکرومتر و نرم افزار Millennium 32 بود. برای تهیه فاز متحرک جهت تزریق به دستگاه و جداسازی پیک‌ها در سیستم گرادیانت[6]، از حلال متانول با درجه خلوص اچ‌پی‌ال‌سی به همراه ۰/۰۲ درصد تری فلورو استیک اسید[7] (حلال A) و آب به همراه ۰/۰۲ درصد تری فلورو استیک اسید (حلال D) استفاده شد. حلال متانول از شرکت مرک آلمان و استانداردهای روتین، آپی‌جنین و لوتئولین از شرکت سگیما آلدریچ تهیه شدند. برای تهیه محلول استاندارد با غلظت ۲۰۰ پی‌پی‌ام، مقدار ۰/۲ میلی‌گرم از استانداردها جداگانه توزین و هر کدام در یک میلی‌لیتر متانول با خلوص اچ‌پی‌ال‌سی حل شدند. از محلول پایه، غلظت‌های مناسب جهت رسم منحنی‌های کالیبراسیون مربوط به سه استاندارد تهیه و هر کدام طبق روش بهینه شده به ستون C18 تزریق شدند. حجم هر بار تزریق برابر ۲۰ میکرولیتر بود و خوانش در طول موج ۲۷۵ نانومتر صورت گرفت. برای شناسایی ترکیبات از مقایسه زمان بازداری (Rt) پیک مربوط به ترکیب استاندارد با ترکیبات حاصل از عصاره استفاده شد. تعیین کمیت ترکیبات نیز با استفاده از روش اندازه‌گیری سطح زیر منحنی و مقایسه با استانداردهای مربوطه انجام گرفت.

آنالیز

تجزیه واریانس و مقایسه میانگین (با روش LSD) صفات مورد بررسی بوسیله نرم افزار SAS نسخه 9.1 انجام شد. نمودارها بوسیله نرم افزار EXCEL رسم شد.

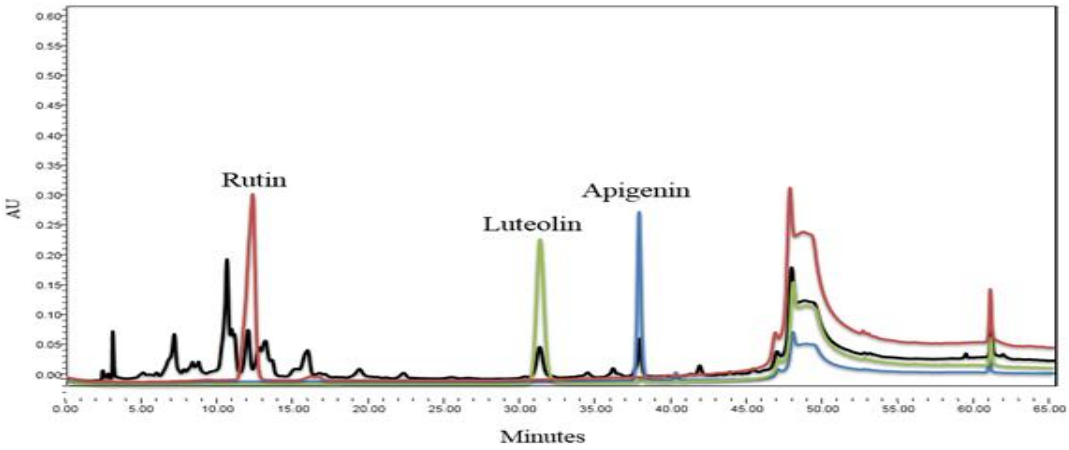
نتایج و بحث

خصوصیات شیمیایی خاک

داده‌های حاصل از جدول تجزیه واریانس نشان داد که اثر کود گوگرد بر تغییرات اسیدیته خاک در سطح یک درصد معنی‌دار بود (جدول ۲). کاربرد ۷۵۰ کیلوگرم گوگرد در هکتار به همراه تیوباسیلوس باعث کاهش اسیدیته خاک (حدود ۰/۹ واحد) شد که با سایر سطوح گوگرد اختلاف معنی‌داری نداشت. کم‌ترین میزان pH خاک (۶/۳۳) در تیمار ۷۵۰ کیلوگرم گوگرد در هکتار و بعد از آن در تیمار ۵۰۰ کیلوگرم در هکتار (۶/۳۸) و بالاترین مقدار آن (۶/۴۱) در تیمار ۲۵۰ کیلوگرم در هکتار اندازه‌گیری شد. کود گوگرد اسیدیته خاک را به مقدار قابل‌توجهی در مقایسه با شاهد به دلیل اکسید شدن و تولید اسید سولفوریک، حداقل در مقیاس ذرات اطراف خود کاهش می‌دهد (۱۶). هدایت الکتریکی خاک در سطح آماری یک درصد تحت تأثیر سطوح مختلف کود گوگرد قرار گرفت (جدول ۳).

استفاده از گوگرد سبب افزایش هدایت الکتریکی خاک از ۱/۵۸ دسی‌زیمنس در متر (تیمار شاهد) به ۷/۴۳ دسی‌زیمنس در متر (تیمار ۷۵۰ کیلوگرم گوگرد در هکتار) شد. علت افزایش هدایت الکتریکی را می‌توان ناشی از تجمع نمک‌های حاصل از اکسایش گوگرد (یکی از یون‌های مؤثر در شوری خاک) دانست (۱۱). استفاده از گوگرد و اکسایش تدریجی آن منجر به تولید یون سولفات (SO_4^{-2}) می‌شود. افزایش غلظت یون سولفات به همراه کلسیم و منیزیم موجود در خاک باعث افزایش هدایت الکتریکی خاک می‌گردد (۲۹). معمولاً تجمع نمک‌های حاصل از افزایش گوگرد در سطوح فوقانی خاک باعث شوری آن می‌شود (۱۱). سطوح مختلف کود گوگرد تأثیر معنی‌دار ($p\leq$۰/۰۱) بر میزان در دسترس عناصر گوگرد، آهن، روی و منگنز داشت. در طول زمان میزان سولفات خاک در نتیجه اکسیداسیون کودهای گوگردی به‌صورت خطی افزایش یافت. در پایان آزمایش سطوح کودی ۲۵۰، ۵۰۰ و ۷۵۰ کیلوگرم گوگرد در هکتار در مقایسه با شاهد به‌ترتیب منجر به افزایش ۱/۲۳، ۱/۶۳ و ۲/۴۸ برابری سولفات شدند.

1- Flame Spectrophotometry Atomic
2- Ultrasonic
3- Power Sonic 405
4- Sonication
5- High Performance Liquid Chromatography
6- Gradient
7- Trifluoroacetic acid



شکل ۲-کروماتوگرام عصاره‌ی گل آرنیکا (تیمار ۲۵۰ کیلوگرم گوگرد در هکتار) و استانداردهای روتین، لوتئولین و آپی‌جنین (طول موج ۲۷۵ نانومتر)

Figure 2- Chromatogram of *Arnica chamissonis* flower extract (250 Kg/ha Sulfur treatment) and Rutin, Luteolin and Apigenin standards (275 nm Wavelength)

جدول ۲- تجزیه واریانس تأثیر کودهای گوگرد در غلظت‌های مختلف بر میزان عناصر قابل جذب در خاک

Table 2- Analysis of variance of sulfur fertilizers in different concentrations on soil absorbable elements

منبع تغییرات Source of Variance	درجه آزادی df	واکنش خاک pH	هدایت الکتریکی EC	گوگرد Sulfur	آهن Iron	روی Zinc	منگنز Manganese
بلوک Block	2	0.007^{ns}	0.031^{ns}	2.92^{ns}	0.0003^{*}	0.001^{ns}	1.94^{ns}
تیمار Treatment	3	0.63^{**}	28.65^{**}	790.95^{**}	0.054^{**}	1.36^{**}	20.62^{**}
خطا Error	6	0.005	0.047	2.48	0.00005	0.0005	0.71
ضریب تغییرات Coefficient of Variation (%)		1.08	4.2	3.99	0.32	0.75	3.43

^{ns} و * و ** به ترتیب غیرمعنی‌دار ، معنی‌دار در سطح ۵ درصد و معنی‌دار در سطح ۱ درصد

^{ns}, * and ** represent nonsignificant, significant at $p \leq 0.05$ and 0.01, respectively

جدول ۳- نتایج تأثیر کودهای گوگرد در غلظت‌های مختلف بر میزان عناصر قابل جذب در خاک

Table 3- Effects of Different concentrations of Sulfur fertilizers on Soil Absorbable Elements

تیمار گوگرد Sulfur treatment	اسیدیته pH	هدایت الکتریکی EC (dS/m)	گوگرد Sulfur ($mg.kg^{-1}$)	آهن Iron ($mg.kg^{-1}$)	روی Zinc ($mg.kg^{-1}$)	منگنز Manganese ($mg.kg^{-1}$)
شاهد Control	7.29a	1.58d	24.86d	2.06c	2.31d	18.94c
250 kg	6.41b	2.92c	30.6c	2.28b	3.26c	24.11b
500 kg	6.38b	5.02b	40.72b	2.3b	3.6b	27.28a
750 kg	6.33b	7.43a	61.77a	2.38a	3.84a	27.94a

اعداد هر ستون که در یک حرف مشترکند، فاقد تفاوت معنی‌دار آماری بر اساس آزمون LSD در سطح احتمال ۵ درصد هستند.

In each column, data having at least one similar letter are not significantly different ar 5% level using LSD test

بیش‌ترین میزان قابل جذب عناصر آهن، روی و منگنز در تیمار ۷۵۰ کیلوگرم گوگرد در هکتار به‌ترتیب ۳/۳۸، ۳/۸۴ و ۲۷/۹۴ میلی‌گرم بر کیلوگرم خاک اندازه‌گیری شد. در بین عناصر کم‌مصرف منگنز بیش‌ترین پاسخ را به افزودن گوگرد نشان داد که با نتایج داود و همکاران (۶) و گودرزی و همکاران (۱۵) مطابقت داشت. میزان آهن، روی، مس و منگنز قابل عصاره‌گیری با DTPA به‌طور متفاوتی تحت تأثیر مقادیر گوگرد قرار می‌گیرد و اکسیداسیون گوگرد عنصری با جمعیت و فعالیت میکروبی همبستگی داشته و به‌صورت خطی افزایش

می‌یابد (۳۲). گوگرد بنتونیتی توسط باکتری‌های تیوباسیلوس و سایر میکروارگانیسم‌ها اکسید شده و اسید سولفوریک تولید می‌شود (۲۴ و ۲۹). کاهش اسیدیته و درنتیجه آزاد شدن عناصرغذایی تثبیت شده و نامحلول، می تواند باعث افزایش قابلیت جذب آنها شده و سبب بهبود رشد و نمو گیاه شود (۳۱).

صفات رویشی و عملکردی

کشت آرنیکای چامیسو در خاک‌هایی با pH بالا جذب عناصر غذایی را مختل و رشد آن را محدود می‌کند (۷ و ۳۹). در چنین شرایطی می‌توان با افزودن گوگرد، pH خاک را برای رشد آرنیکای چامیسو متناسب کرد. نتایج حاصل از جدول تجزیه واریانس داده‌ها (جدول ۴) نشان داد که سطوح مختلف کود گوگرد در سطح احتمال یک درصد تأثیر معنی‌داری بر ارتفاع و سطع مقطع گیاه داشتند. گیاهان تغذیه شده با تیمارهای کودی ۲۵۰ و ۷۵۰ کیلوگرم در هکتار به‌ترتیب بیش‌ترین و کم‌ترین ارتفاع ساقه را دارا بودند. با افزایش میزان کود گوگرد از سطح ۲۵۰ کیلوگرم به بالا ارتفاع بوته‌ها کاهش یافت (جدول ۵). بیش‌ترین سطح مقطع (۲۵/۴۸ سانتی‌متر) گیاه در تیمار ۲۵۰ کیلوگرم گوگرد و کم‌ترین سطح مقطع (۱۲/۵۲ سانتی‌متر) گیاه در تیمار شاهد مشاهده شد. سطوح مختلف کود گوگرد تأثیر معنی‌دار ($p\leq ۰/۰۵$) بر قطر ساقه داشت. بیش‌ترین قطر ساقه (۳/۴۹ میلی‌متر) در تیمار ۲۵۰ کیلوگرم در هکتار (۳/۴۹ میلی‌متر) مشاهده شد که افزایش ۱/۷ برابری نسبت به شاهد (۱/۹۷ میلی‌متر) داشت، اما بین سطوح مختلف کود گوگرد تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد.

برخی پژوهشگران تأثیرات مثبت کود بیوسولفور را بر شاخص‌های فیزیولوژیک و مرفولوژیک گندم، ذرت، چغندرقند و کلزا گزارش نموده اند (۱۶، ۲۲، ۲۹ و ۴۶)، ولی برخی دیگر بر عدم تأثیر آن‌ها تاکید کرده‌اند (۴۵). کسب این نتایج متضاد ممکن است از متفاوت بودن شرایط خاکی و اقلیمی، میزان گوگرد مصرفی و شرایط محیطی متفاوت مکان‌های آزمایش ناشی شود (۲۵ و ۴۰). درودیان و همکاران (۸) گزارش کردند که تولید اکسین یکی از مکانیسم‌های تاثیر باکتری تیوباسیلوس است که نقش مؤثری بر افزایش طویل شدن سلول دارد. ممکن است افزایش ارتفاع گیاه در تیمار ۲۵۰ کیلوگرم گوگرد درهکتار به تأثیر تولید اکسین توسط این باکتری‌ها مربوط باشد، که در نتیجه افزایش ارتفاع ساقه را به دنبال داشته است. همچنین ترشح اکسین از باکتری‌های تیوباسیلوس و به‌تبع آن افزایش تشکیل آوندهای چوبی منجر به افزایش قطر ساقه می‌شود (۱۵).

جدول ۴- تجزیه واریانس تأثیر غلظت‌های مختلف کود گوگرد بر صفات مورفولوژیک و عملکردی آرنیکای چامیسو

Table 4- ANOVA of sulfur fertilizer in different concentrations on *Arnica* morphological and yield characteristics

منبع تغییرات Source of Variance	درجه آزادی df	میانگین مربعات Mean Squares (MS)							
		ارتفاع بوته Plant Height	سطح مقطع بوته Plant Width	قطر ساقه Stem Diameter	قطر گل Flower Diameter	تعداد کل گل بوته Flower Count Per Plant	وزن گل تر در بوته Wet Flower Weight Per Plant	وزن گل خشک در بوته Dry Flower Weight Per Plant	عملکرد Yield
بلوک Block	2	1.28ns	5.17ns	0.511ns	1.66ns	4ns	0.8ns	0.04ns	0.64ns
تیمار Treatment	3	142.66**	108.91**	1.18*	158**	653.86**	245.56**	12.13**	197.24**
خطا Error	6	0.77	3.53	0.21	1.62	32.13	0.24	0.01	0.2
ضریب تغییرات Coefficient of Variation (%)		5.54	10.96	16.43	5.81	2.4	4.98	5.09	5

ns و * و ** به ترتیب غیرمعنی‌دار ، معنی‌دار در سطح ۵ درصد و معنی‌دار در سطح ۱ درصد

ns, * and ** represent nonsignificant, significant at P = 0.05 and 0.01, respectively

جدول ۵- مقایسه میانگین تأثیر غلظت‌های مختلف کود گوگرد بر صفات مورفولوژیک و عملکردی آرنیکای چامیسو

Table 5- Means comparison of the effect of sulfur fertilizer on *Arnica* morphological and yield characteristics

تیمار Treatment	ارتفاع بوته Plant Height (cm)	سطح مقطع بوته Plant Width (cm)	قطر ساقه Stem Diameter (mm)	قطر گل Flower Diameter (mm)	تعداد کل گل بوته Flower Count Per Plant	وزن گل تر در بوته Wet Flower Weight Per Plant (g)	وزن گل خشک در بوته Dry Flower Weight Per Plant (g)	عملکرد گل Yield ($g.m^{-2}$)
شاهد Control	11.57c	12.52c	1.98b	14.52c	29.33c	4.09c	0.91c	3.66c
250 kg	25.6a	25.48a	3.49a	29.61a	58.66a	23.07a	5.16a	20.67a
500 kg	15.93b	17.65b	3a	26.41b	42.66b	8.96b	2b	8.03b
750 kg	10.43d	12.93b	2.72ab	17.04c	26.33c	3.77c	0.84c	3.37c

اعداد هر ستون که در یک حرف مشترکند، فاقد تفاوت معنی‌دار آماری بر اساس آزمون LSD در سطح احتمال ۵ درصد هستند

In each column, data having at least one similar letter are not significantly different at 5% level using LSD test

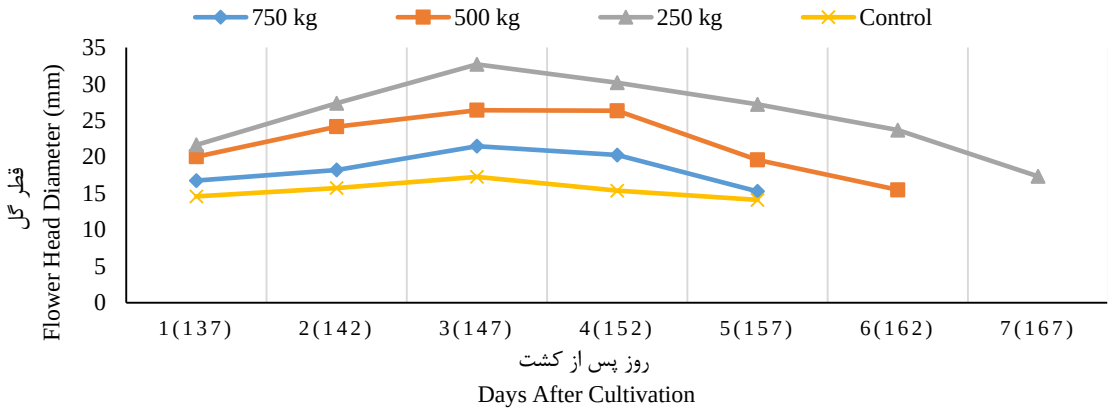
سطوح مختلف کود گوگرد تأثیر معنی‌داری ($p\leq$۰/۰۱) بر تعداد کل گل در بوته داشت. استفاده از ۲۵۰ کیلوگرم کود گوگرد موجب افزایش تعداد گل نسبت به تیمار شاهد شد. اما سایر سطوح کود گوگرد، تعداد کل گل در بوته را کاهش دادند. بیش‌ترین تعداد کل گل در بوته در تیمار ۲۵۰ کیلوگرم گوگرد (۵۸/۶۶ عدد) مشاهده شد که تفاوت معنی‌داری با شاهد (۲۹/۳۳ عدد) نشان داد. گل‌دهی از اواخر تیرماه شروع شد و ۳۵ روز به طول انجامید. بیش‌ترین میزان گل‌دهی در برداشت‌های انجام شده از اواسط تا اواخر مردادماه مشاهده شد. تعداد گل‌آذین در ابتدای دوره گل‌دهی کم بوده و به تدریج تا اواسط برداشت افزایش و سپس کاهش یافت. طبق گزارش بسیاری از محققان *A. chamissonis* کپه‌های گل کوچک با قطر ۱۴-۳۲ میلی‌متر اما تعداد گل‌آذین زیادی دارد (۳۳)، که این موضوع در تحقیق انجام شده نیز مشاهده شد.

قطر گل در سطح آماری یک درصد تحت تأثیر سطوح مختلف کود گوگرد قرار گرفت. بیش‌ترین قطر گل در تیمار ۲۵۰ کیلوگرم گوگرد (۲۹/۶۱میلی‌متر) مشاهده شد که تفاوت معنی‌داری ($p\leq$۰/۰۱) با شاهد نشان داد (جدول ۴). کم‌ترین مقدار این صفت در تیمار شاهد (۱۴/۵۲میلی‌متر) به‌دست آمد که با تیمار ۷۵۰ کیلوگرم گوگرد تفاوت معنی‌داری نشان نداد (جدول ۵). در این پژوهش، مصرف ۲۵۰ کیلوگرم گوگرد در هکتار به همراه بیوسولفور، بهبود صفات مورفولوژیک و بیش‌ترین میزان عملکرد گل (۲۰/۶۷ گرم بر مترمربع) را به‌همراه داشت. همچنین میزان گوگرد و عناصر کم‌مصرف در خاک را افزایش داد، اما در تیمار ۵۰۰ و ۷۵۰ کیلوگرم گوگرد در هکتار، به دلیل زیاد شدن هدایت الکتریکی و شور شدن خاک، رشد آرنیکای چامیسو کاهش یافت لذا این سطوح گوگرد برای این گیاه مناسب نیستند. علاوه بر اندازه‌گیری قطر گل در تیمارهای مختلف، روند تغییرات قطر گل طی ۷ مرحله برداشت بررسی گردید. بیش‌ترین قطر گل در تیمار ۲۵۰ کیلوگرم گوگرد در برداشت سوم (۱۴۷ روز پس از کشت) ثبت گردید اما مقدار آن در برداشت‌های بعدی کاهش یافت به نحوی که در آخرین چین، قطر گل ۳۳ /۲۲ میلی‌متر اندازه‌گیری شد. در تمام مراحل جمع‌آوری کم‌ترین مقدار قطر گل در تیمار شاهد مشاهده شد (شکل ۳). بزرگ بودن و فراوانی گل‌ها در تیمار ۲۵۰ کیلوگرم گوگرد را می‌توان به فراهمی عناصر غذایی به‌خصوص عناصر کم‌مصرف در خاک و عدم شوری خاک نسبت داد (شکل ۴).

اثرات مفید کاربرد گوگرد در افزایش قابلیت جذب عناصر غذایی و بهبود عملکرد گیاهان توسط سایر پژوهشگران گزارش شده است (۲۲، ۲۹، ۳۲ و ۴۵). گوگرد سبب افزایش میزان فتوسنتز می‌شود (۴۶)، اما در حالتی که هدایت الکتریکی خاک از دامنه تحمل گیاه به شوری بیشتر باشد، رشد گیاه کاهش می‌یابد. با افزایش شوری خاک، فشار اسمزی خاک افزایش یافته و گیاه برای جذب آب به مصرف انرژی بیشتر نیاز دارد. چون گیاه نمی‌تواند کل انرژی خود را صرف غلبه بر فشار اسمزی نماید، بخشی از آب موجود در خاک را جذب و مابقی انرژی خود را صرف فعالیت‌های متابولیکی می‌کند و در نتیجه رشد و نمو گیاه محدود و عملکرد آن کاهش می‌یابد (۲۸).

اثر کود گوگرد بر صفات وزن تر و خشک گل در بوته در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار گردید (جدول ۴)، اما مصرف مقادیر بیشتر گوگرد، سبب کاهش وزن تر و خشک گل در بوته شد. استفاده از ۲۵۰ کیلوگرم گوگرد موجب افزایش ۵/۶ برابری وزن تر گل در بوته نسبت به شاهد شد و کم‌ترین میزان این صفت در تیمار ۷۵۰ کیلوگرم گوگرد (۳/۷۷ گرم) مشاهده شد. بیش‌ترین وزن خشک گل در بوته در تیمار ۲۵۰ کیلوگرم گوگرد (۵/۱۶ گرم) و کم‌ترین وزن خشک گل در بوته در تیمار ۷۵۰ کیلوگرم (۰/۸۴ گرم) مشاهده شد (جدول ۵). نتایج تجزیه واریانس نشان داد که سطوح مختلف کود گوگرد تأثیر معنی‌داری ($P\leq$۰/۰۱) بر عملکرد گل داشتند (جدول ۴). بیش‌ترین عملکرد در تیمار ۲۵۰ کیلوگرم گوگرد در هکتار (۲۰/۶۷ گرم در بوته) و کم‌ترین میزان در تیمار ۷۵۰ کیلوگرم (۳/۳۷ گرم در بوته) حاصل شد. کاربرد ۷۵۰ کیلوگرم گوگرد در هکتار تفاوت معنی‌داری نسبت به تیمار شاهد نداشت (جدول ۵). علت کم بودن تعداد گل در سطوح

۵۰۰ و ۷۵۰ کیلوگرم گوگرد در هکتار، علی‌رغم فراهمی بیشتر عناصر کم مصرف نظیر منگنز، روی و آهن در خاک، زیاد بودن هدایت الکتریکی و مشکل شوری خاک می‌باشد. آرنیکای چامیسو حساسیت بالایی به خشکی و شوری خاک دارد و سطوح کم نمک‌های محلول برای آن ایجاد مشکل می‌کند (۳۹). به‌واسطه افزایش شوری و عدم تعادل اسمزی در خاک، دوره رشد رویشی ناقص مانده و گیاه کوچک می‌ماند و سریع وارد فاز زایشی می‌شود و گل‌های کمتر و کوچکتری تولید می‌کند (۱۲).



شکل ۳- روند تغییرات قطر گل طی ۷ مرحله برداشت در تیمارهای مختلف گوگرد

Figure 3- Changes in flower diameter during seven harvest stages in different sulfur treatments (250 Kg Treatment)

شکل ۴- مقایسه قطر گل در تیمار شاهد (a) و تیمار ۲۵۰ کیلوگرم گوگرد (b)

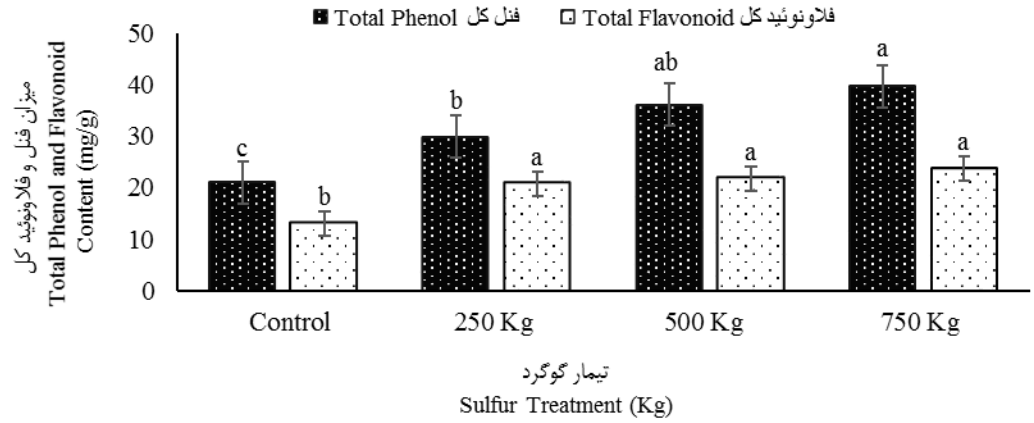
Figure 4- Comparison of flower diameter in treatment between control (a) and treatment of 250 kg sulfur (b)

فنل و فلاونوئید کل

محتوای فنل کل با روش فولین سیو-کالتیو بر اساس معادله‌ی خط منحنی استاندارد (y= 0.0073x + 0.0185; R²= 0.99) و محتوای فلاونوئید کل به روش رنگ سنجی بر مبنای معادله‌ی خط (y= 0.0014x - 0.0051; R²= 0.99) اندازه‌گیری شد. مقدار فنل کل از ۲۱/۰۳ میلی‌گرم اسید گالیک بر گرم برای شاهد تا ۳۹/۶۸ میلی‌گرم اسید گالیک بر گرم برای تیمار ۷۵۰ کیلوگرم گوگرد متغیر بود. کم‌ترین مقدار فلاونوئید کل در تیمار شاهد و بیش‌ترین مقدار آن در غلظت ۷۵۰ کیلوگرم گوگرد به‌ترتیب ۱۳/۰۵ و ۲۳/۷ میلی‌گرم روتین بر گرم پودر خشک مشاهده شد (شکل ۵).

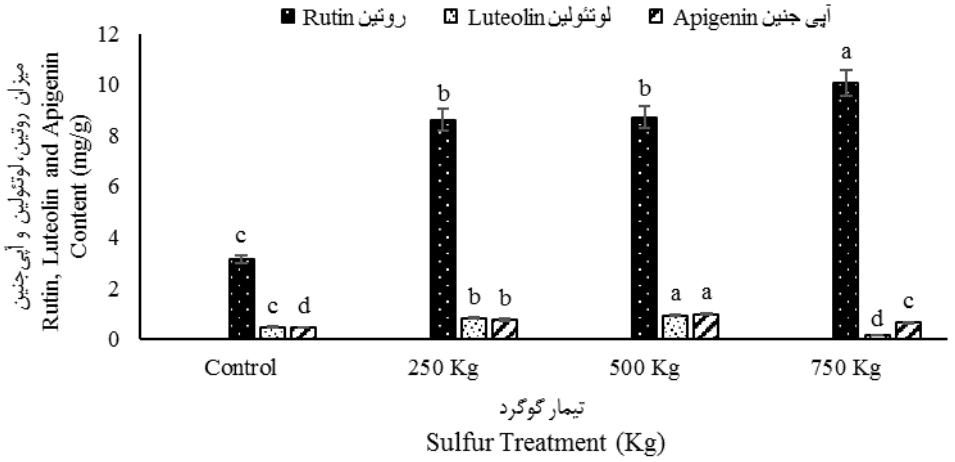
روتین، لوتئولین و آپی‌جنین

بیشترین مقدار روتین در تیمار ۷۵۰ کیلوگرم گوگرد (۱۰/۰۸میلی‌گرم بر گرم) و کمترین مقدار آن در شاهد (۳/۱۲ میلی‌گرم بر گرم)، بیشترین مقدار لوتئولین در تیمار ۵۰۰ کیلوگرم (۰/۹۳ میلی‌گرم بر گرم) و کمترین مقدار آن در تیمار ۷۵۰ کیلوگرم گوگرد (۰/۱۳ میلی‌گرم بر گرم)، بیشترین مقدار آپی‌جنین در تیمار ۵۰۰ کیلوگرم (۰/۹۸ میلی‌گرم بر گرم) و کمترین مقدار آن در تیمار شاهد (۰/۴۵ میلی‌گرم بر گرم) اندازه‌گیری شد (شکل ۶).



شکل ۵- بررسی محتوای فنل و فلاونوئید کل در گل‌های آرنیکای چامیسو تحت تاثیر سطوح مختلف گوگرد. مقایسه میانگین تیمارها در سطح ۵ درصد آزمون LSD است

Figure 5- Evaluation of Total Phenol and Flavonoid Content in *Arnica* Flowers Under the Influence of Different Levels of Sulfur. Mean comparison was carried out at 5% level using LSD test



شکل ۶- بررسی محتوای روتین، لوتئولین و آچی‌جنین در گل‌های آرنیکای چامیسو تحت تأثیر سطوح مختلف گوگرد. مقایسه میانگین تیمارها در سطح ۵٪ آزمون LSD است.

Figure 6- Evaluation of Rutin, Luteolin and Apigenin content in *Arnica* flowers under the influence of different levels of sulfur. Mean comparison has been carried out at 5% level using LSD test

یکی از مهم‌ترین نقش‌های متابولیت‌های ثانویه در گیاهان نقش حفاظتی آن‌ها در شرایط تنش است (۱). شواهد زیادی نشان می‌دهد که در شرایط تنش تولید برخی از این ترکیب‌ها تا چندین برابر افزایش می‌یابد (۹ و ۱۰). ازجمله متابولیت‌های ثانویه می‌توان به ترکیب‌های فنلی و فلاونوئیدها اشاره کرد. فلاونوئیدها به دلیل نقش آنتی اکسیدانی خود به طور مستقیم با وارد شدن در واکنش‌های احیایی و به طور غیرمستقیم به وسیله کلاته کردن آهن مانع تنش اکسیداتیو می‌شوند و مانند بسیاری دیگر از پلی فنل‌ها جمع کننده رادیکال‌های آزاد هستند، زیرا به عنوان گروه‌های قوی الکترون دهنده و پروتون دهنده عمل می‌کنند (۳۶). در نتیجه عوامل محیطی تاثیر بسزایی در محتوای فلاونوئیدها و فنولیک اسیدها دارند و شرایط تنش سبب افزایش بیوسنتز ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی می‌شوند (۱). در این پژوهش بالاترین محتوای فنل کل، فلاونوئید کل و روتین در تیمار ۷۵۰ کیلوگرم گوگرد در هکتار و بالاترین مقادیر لوتئولین و آپی‌جنین در تیمار ۵۰۰ کیلوگرم گوگرد در هکتار به‌دست آمد (شکل ۵ و ۶). در این شرایط گیاه به‌واسطه افزایش میزان شوری، رشد و نمو و عملکرد پایینی داشت. شوری یکی از تنش‌های مهم محیطی است که با تولید انواع گونه‌های اکسیژن فعال از جمله رادیکال‌های سوپراکسید

(O^-)، رادیکال‌های هیدروکسیل (OH^-) و پراکسید هیدروژن (H_2O_2) می‌تواند باعث تخریب عمده غشاء، چربی‌ها، پروتئین‌ها و اسیدهای نوکلئیک شوند. در این شرایط دفاع آنتی‌اکسیدانی جهت محافظت از سلول‌ها وارد عمل و با تولید ترکیبات پلی‌فنلی، سبب مقاومت آن‌ها در برابر عوامل مزاحم خارجی و شرایط نامساعد محیطی می‌شود که نتیجه آن افزایش چندبرابری متابولیت‌های ثانویه تحت تنش شوری است (۳) که در این پژوهش نیز مشاهده شد. بررسی‌های کالسکان و همکاران (۴) در سال ۲۰۱۷ نشان داد که شوری خاک محتوای ترکیبات فنلی همانند کلروژنیک اسید و روتین را در گیاه *Hypericum pruinatum* افزایش می‌دهد. به گزارش ولی فرد و همکاران (۲۰۱۴) افزایش شوری خاک مواد فرار، محتوای فنل کل و فعالیت آنتی اکسیدانی را در گیاه دارویی *Salvia mirzayanii* افزایش داد (۴۷). همچنین بحرینی نژاد (۲۰۱۳)، ال دین و همکاران (۲۰۰۹) گزارش کردند که تنش شوری سبب افزایش معنی‌دار ترکیبات فنلی بخصوص تیمول به ترتیب در گیاه دارویی آویشن دنایی و باغی می‌شود (۲ و ۹). همچنین بررسی میزان فلاونوئید گیاه *Brassica napus* در شرایط تنش غیر زنده نشان داد که این ماده به عنوان متابولیت ثانویه در گیاه افزایش می‌یابد (۳۵). محققان نتایج مشابهی را نیز روی گیاه *Stellaria longipes* گزارش کردند که فلاونوئیدها به عنوان مواد آنتی اکسیدان در تنش‌های اکسیداتیو وارد عمل شده‌اند (۳۶).

نتیجه‌گیری کلی

با توجه به اینکه کشور ما از نظر اقلیمی از تنوع خاصی برخوردار است، انجام چنین پژوهش‌هایی در مناطق مختلف کشور در مورد این گونه گیاهان که بومی کشور ما نیستند ولی از نظر اقتصادی بسیار ارزشمند هستند از اهمیت خاصی برخوردار است. این پژوهش نشان داد که آرنیکای چامیسو به شرایط محل کشت شده سازگاری مناسبی داشته و کاربرد گوگرد به همراه باکتری تیوباسیلوس سبب شد تا مقادیر گوگرد، آهن، روی، منگنز و هم‌چنین تمام صفات مورفولوژیک و عملکردی در مقایسه با شاهد به‌طور معنی‌داری افزایش یابد. باکتری تیوباسیلوس با اکسایش گوگرد، pH خاک را کاهش داده و سبب بهبود شرایط تغذیه و افزایش رشد گیاه شد. اثرات مثبت گوگرد بر این صفات از راه بهبود تغذیه گوگردی گیاه و کاهش pH خاک صورت گرفته است.

منابع

1- Akula, R. and Ravishankar, G. A. 2011. Influence of abiotic stress signals on secondary metabolites in plants. Plant Signaling and Behavior, 6: 1720-1731.
2- Bahreininejad, B., Razmjou, J., and Mirza, M. 2013. Influence of water stress on morpho-physiological and phytochemical traits in *Thymus daenensis*. International Journal of Plant Production, 7(1): 151-166.
3- Bailly, C. 2004. Active oxygen species and antioxidants in seed biology. Seed Science Research, 14: 93-107.
4- Caliskan, O., Radusiene, J., Temizel, K.E., Staunis, Z., Cirak, C., Kurt, D., and Odabas, M.S. 2017. The effects of salt and drought stress on phenolic accumulation in greenhouse-grown *Hypericum pruinatum*. Italian Journal of Agronomy, *12*(3): 271-275.
5- Dash, S. and Gupta, N. 2011. Microbial bioinoculants and their role in plant growth and development. International Journal of Biotechnology and Molecular Biology Research, 2: 232-251.
6- Dawood, F. A., Al-Omari, S. M., & Murtadha, N. S. 1985. High levels of sulfur affecting availability of some micronutrients in calcareous soils (in Iraq). *J. of Agriculture and Water Resources Research (Iraq)*.
7- Delabays, N. and Mange, N. 1991. La culture d' *Arnica montana* L: aspects agronomiques et phytosanitaires. Revue suisse de viticulture, arboriculture, horticulture.
8- Doroudian, H.R., BesharatiKelayeh, H., FallahNosrat Abad, A.R., Heidary Sharif Abadi, H., Darvish, F., and Allahverdi, A. 2010. Study of absorbable phosphorus changes in lime soils and its impact on corn yield. Agricultural Modern Knowledge (Modern Knowledge of Sustainable Agriculture) 6(18): 27-35. (In Persian with English Summary).
9- El-Din, A.E., Aziz, E.E., Hendawy, S.F., and Omer, E.A. 2009. Response of *Thymus vulgaris* L. to salt stress and alar (B9) in newly reclaimed soil. Journal of Applied Sciences Research, *5*: 2165-2170.
10- Esra, K.O.Ç., İŞLEK, C., and Üstün, A.S. 2010. Effect cold on protein, proline, phenolic compounds and chlorophyll content of two pepper (*Capsicum annuum* L.) varieties. Gazi University Journal of Science, *23*(1): 1-6.
11- Finch C., Grant, G., Patersons, J., and Extension, B. C. 2004. Sulfur and soil pH, www.plantansewers.com, garden column.
12- Garcia-gomez, A., Bernal, M., and Roig, A. 2002. Growth of ornamental plants in two composts prepared from agroindustrial wastes. Bioresource Technology, 83: 81-87.
13- Gaspar, A., Cracinescu, O., Trif, M., Moisei, M., and Moldovan, L. 2014. Antioxidantand anti-inflammatory properties of active compounds from *Arnica montana* L. Romanian Biotechnological Letters 19 (3), 9353-9365.
14- Gawlik-Dziki, U.,´Swieca, M., Sugier, D., and Cichocka, J. 2009. Seeds of *Arnica montana* and *Arnica chamissonis* as a potential source of natural antioxidants. HerbaPolonica 55, 60-71.

15- Goodarzi, K. and Hosseini Farahi, M. 2014. Evaluating the ability of sulfur and animal manure to relieve Fe, Mn, Zn, Cu and B deficiency in 'Seah' table grapes in Cisakht region of Iran. I International Symposium on Organic Matter Management and Compost Use in Horticulture, 1018: 287-291.
16- Grant, C., Clayton, G., and Johnston, A. 2003. Sulphur fertilizer and tillage effects on canola seed quality in the black soil zone of western Canada. Canadian Journal of Plant Science, 83: 745-758.
17- Hitsuda, K., Yamada, M., and Klepker, D. 2005. Sulfur requirement of eight crops at early stages of growth. Agronomy Journal, 97: 155-159.
18- Hulten, E. 1968. *Flora of Alaska and neighboring territories: a manual of the vascular plants*. Stanford University Press, USA, pp. 920-921.
19- Janzen, H. and Bettany, J. 1987. The effect of temperature and water potential on sulfur oxidation in soils. Soil Science, 144: 81-89.
20- Kalbas, M., Filsoof, F., and Rezai-nejad, Y. 1988. Effect of sulfur treatments on yield and uptake of Fe, Zn, and Mn by corn, sorghum, and soybeans. Journal of Plant Nutrition, 11: 1353-1360.
21- Kamtekar, S., Keer, V., and Patil, V. 2014. Estimation of phenolic content, flavonoid content, antioxidant and alpha amylase inhibitory activity of marketed polyherbal formulation. Journal of Applied Pharmaceutical Science, *4*(9): 61-65.
22- Khavazi, K., Nourgholipour, F., and Malakouti, M.J. 2001. Effect of thiobacillus and phosphate solubilizing bacteria on increasing P availability from rock phosphate for corn. In *International Meeting on Direct Application of Rock Phosphate and Related Appropriate Technology Latest Development and Practical Experience. Kuala Lumpur, Malaysia*. 4(5):330-334
23- Kowalski, R., Sugier, D., Sugier, P., and Kołodziej, B. 2015. Evaluation of the chemical composition of essential oils with respect to the maturity of flower heads of *Arnica montana* L. and *Arnica chamissonis* Less. cultivated for industry. Industrial Crops and Products, 76: 857-865.
24- Lawrence, J. and Germida, J. 1988. Relationship between microbial biomass and elemental sulfur oxidation in agricultural soils. Soil Science Society of American Journal, 52: 672-677.
25- Li, X. S., Sato, T., Ooiwa, Y., Kusumi, A., Gu, J. D., and Katayama, Y. 2010. Oxidation of elemental sulfur by *Fusarium solani* strain THIF01 harboring endobacterium *Bradyrhizobium* sp. Microbial Ecology, 60: 96-104.
26- Loeppert, R. H. and Suarez, D. L. 1996. Carbonate and gypsum. Publications from USDA-ARS / UNL Faculty, 5: 437-474.
27- Maguire, B. 1943. A monograph of the genus *Arnica*. Brittonia, 4: 386-510.
28- Malakouti, M.J. 2004. Soil Fertility of Arid and Semi-Arid Regions, Tarbiat Modares University Press, 482 pp.
29- Malakouti, M.J., Baybordi, A., Lotfolahi, M., Shahabi, A., Siavoshi, K., Vakil, R., Ghaderi, J., Shahabifar, J., Majidi, A., and Jafarnejadi, A. 2010. Comparison of complete and sulfur coated urea fertilizers with pre-plant urea in increasing grain yield and nitrogen use efficiency in wheat. Journal of Agricultural Science and Technology, 10: 173-183.
30- Merfort, I. 2003. Arnica: new insights on the molecular mode of action of a traditional medicinal plant. Forschende Komplementarmedizin und klassische Naturheilkunde= Research in complementary and natural classical medicine, 10: 45-48.
31- Modaihsh, A.S., Al-Mustafa W. A., and E., Metwallv A. 1989. Effect of elemental sulfur on chemical changes and nutrient availability in calcareous soils. Plant and Soil, 116: 95-101.
32- Mohammadi Torkashvand, A. 2011. Effect of steel converter slag as iron fertilizer in some calcareous soils. Acta Agriculturae Scandinavica Section B-Soil and Plant Science, 61: 14-22.
33- Radanovic, D., Pljevljakusic, D., Markovic, T., Ristic, M., Dragoja, R., Pljevljakusic, D. and Markovic, T. 2007. Influence of fertilization model and PE mulch on yield and quality of *Arnica* (*A. montana*) at dystric cambisol. Zemljište i biljka, 56: 85-95.
34- Salehi, P., Asghari, B., Esmaeili, M. A., Dehghan, H., and Ghazi, I. 2013. α-Glucosidase and α-amylase inhibitory effect and antioxidant activity of ten plant extracts traditionally used in Iran for diabetes. Journal of Medicinal Plants Research, 7: 257-266.
35- Sangtarash, M.H., Qaderi, M.M., Chinnappa, C.C., and Reid, D.M. 2009. Differential sensitivity of canola (*Brassica napus*) seedlings to ultraviolet-B radiation, water stress and abscisic acid. Environmental and Experimental Botany, 66(2): 212-219.
36- Seyoum, A., Asres, K., and El-Fiky, F.K. 2006. Structure–radical scavenging activity relationships of flavonoids. Phytochemistry, 67(18), : 2058-2070.
37- Singh, R., Bhumbla, D., and Keefer, R. 1995. Recommended soil sulfate-S tests. Recommended soil testing procedures for the Northeastern United States. Northeast Regional Bulletin, 493: 46-51.
38- Small, E. and Catling, P. M. 2000. Les cultures médicinales canadiennes, NRC Research Press.
39- Smallfield, B. and Douglas, M. 2008. *Arnica montana* a grower's guide for commercial production in New Zealand. A Report Prepared for New Zealand Arnica Growers' Group, New Zealand Institute for Crop and Food Research Limited, Christchurch, New Zealand, December, 2.

40- Sorokin, D. Y. 2003. Oxidation of inorganic sulfur compounds by obligately organotrophic bacteria. Microbiology, 72: 641-653.
41- Sparks, D. L., Page, A., Helmke, P., Loeppert, R., Soltanpour, P., Tabatabai, M., Johnston, C., and Sumner, M. 1996. Methods of soil analysis. Part 3-Chemical methods, Soil Science Society of America Inc. 1309 pp.
42- Stursa, J., Kwiatkowski, P., Harcarik, J., Zahradníková, J., and Krahulec, F. 2009. Cerný a cervený seznam cévnatých rostlin Krkonos/Black and red list of vascular plants of the Krkonose/Karkonosze Mts. (Western Sudetes CZ, PL). Opera Corcontica, 46: 67-104.
43- Sugier, D. 2007. The flowering pattern of *Arnica montana* L. and *A. chamissonis* Less. Under field cultivation conditions with successive flower head collection. Acta Agrobotanica, 60 (2): 133-139.
44- Sugier, D. 2013. Yield and chemical composition of mountains arnica (*Arnica montana* L.) raw material in relation to the method of plantation establishment andthe harvesting time of flower heads. Annales UMCS Agricultura 68 (3), 51-62.
45- Szulc, P., Waligóra, H., and Skrzypczak, W. 2008. Better effectiveness of maize fertilization with nitrogen through additional application of magnesium and sulphur. Nauka Przyroda Technologie. Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu, 2 (3):art. 19.
46- Terry, N. 1976. Effects of sulfur on the photosynthesis of intact leaves and isolated chloroplasts of sugar beets. Plant Physiology, 57: 477-479.
47- Valifard, M., Mohsenzadeh, S., Kholdebarin, B., and Rowshan, V. 2014. Effects of salt stress on volatile compounds, total phenolic content and antioxidant activities of *Salvia mirzayanii.* South African Journal of Botany, 93:.92-97.
48- Weremczuk-Jeżyna, I., Kisiel, W., and Wysokińska, H. 2006. Thymol derivatives from hairy roots of *Arnica montana*. Plant Cell Reports, 25: 993-996.
49- Willuhn, G. 1972. Studies on the contents of *Arnica* species. V. content and variations in content of volatile oils in the various organs of *Arnica* species. Planta Medica, 21: 221-245.

Journal of Horticultural Science
Vol. 33, No.2, Summer 2019, P. 219-232
ISSN: 2008 - 4730

نشریه علوم باغبانی (علوم و صنایع کشاورزی)
جلد ۳۳، شماره ۲، تابستان ۱۳۹۸، ص. ۲۳۲-۲۱۹
شاپا: ۴۷۳۰ - ۲۰۰۸

Effect of Different Levels of Sulfur on Growth, Quality Characteristics and Yield of *Arnica chamissonis* Less. ssp. *foliosa*

M. Asadi[1]- J. Hadian[2*]- S. Ebrahimi[3]- G. Karimzadeh[4]

Received: 18-04-2018
Accepted: 08-04-2019

Introduction: The genus *Arnica* L. comprises of 32 species predominantly confined to the boreal and montane region of the northern hemisphere. *Arnica* species are rhizomatous perennial herbs belonging to the daisy family, with simple or branched stems bearing opposite leaves, and large, single or cymose heads of yellow flowers. *A. chamissonis* is distributed over North America from Alaska to New Mexico, and due to its low ecological demand it is easier to cultivate than *A. montana*. Arnica is a source of sesquiterpene lactones, flavonoids, essential oils, terpenoids, and phenolic acids and exhibits antiseptic, anti-inflammatory, antiradical, antibacterial, anti-sclerotic, antifungal, and antioxidant activities. The flower heads and other parts of the plant of two of the species have been used therapeutically: *A. montana* and *A. chamissonis*, both of them containing sesquiterpene lactones as pharmacologically active compounds. *Arnica* species are used in as many as 300 drug preparations in Europe and about 20 products in Canada. Moreover, *A. chamissonisis* a good source of bioactive compounds a valuable source of herbal raw material and a pharmaceutical substitute for the endangered mountain arnica. *A. chamissonis* extracts exhibit potent anti-inflammatory and anti-radical activity and possesses high antioxidant abilities that might be helpful in preventing or slowing the progress of free radical-dependent diseases. Low pH soil is one of the principal ecological requirements of *Arnica*. Good plant growth and flower yield was achieved on acid soils with a pH of 6.8 and below. After nitrogen, phosphorus and potassium, sulfur is considered as fourth major element in most crops. Rate of sulfur oxidation in soils vary and depend on population *Thiobacillus* bacteria in soil, particle size and environmental conditions.

Materials and Methods: This study was conducted as a complete randomized block design with three replications and four treatments including different levels of bentonite sulfur (0, 250, 500 and 750 kg/ha) combined with the bacterium *Thibacillus thiooxidans*. Traits such as height and width of plants, number of flowers on each plant, inflorescence diameter, fresh and dry yield of flowers in each plant per square meter and total phenols, total flavonoids, rutin, luteolin and apigenin content in flowers were measured. High-Performance Liquid Chromatography method (HPLC) was used to separate rutin, luteolin and apigenin. HPLC grade methanol and distilled water, each with 0.02% added TFT were used as solvents.

Results and Discussion: The results showed that *A. chamissonis* is compatible with Tehran's climate and it can be cultivated in regions with a similar climate. The use of elemental sulfur has a significant role in reducing soil pH and soil pH decreased more rapidly with increasing sulfur. *Thiobacillus* bacteria by oxidation of sulfur produced some to sulfuric acid and at low buffered properties can considerably reduce pH. Different levels of sulfur fertilizer had a significant effect ($P \leq 0.01$) on soil acidity (pH), electrical conductivity, and sulfur, iron, zinc and manganese levels. The use of 750 kg sulfur bentonite with *Thiobacillus* caused to reduce soil acidity by about 0.9 units, and it increased the electrical conductivity of the soil to 7.33 dS/m. The amount of soil sulfate as a result of oxidation of sulfur fertilizers increased linearly. The highest amounts of iron, zinc and manganese were measured in the treatment of 750 kg sulfur as 3.38, 3.84 and 27.94 mg /kg, respectively. In this study, supplying 250 kg of sulfur plus bio-sulfur caused to improve the morphological traits and the highest flower yield (20.67 g / plant) compared to control (3.66 g / plant). Also, it increased the amount of sulfur and micro-elements in the soil, but in the treatment of 500 and 750 kg sulfur per hectare due to increased electrical conductivity and soil salinity, the growth of Chamisso Arnica decreased. Therefore, these levels of sulfur are not suitable for this plant. Sulfur Bentonite is oxidized by *Thiobacillus* bacteria and other microorganisms and sulfuric acid is produced. Reducing acidity and, as a result, the release of stabilized and insoluble nutrients can increase their uptake capacity and improve plant growth and development. Due to the increased salinity and

1 and 2- Former Msc students and Associate Professor of Physiology and Breeding of Medicinal Plants, Medicinal Plants and Drug Research Institute, Shahid Beheshti University of Tehran
(*-Corresponding Author Email: J_hadian@sbu.ac.ir)
3- Assistant Professor, Medicinal Plants and Drug Research Institute, Shahid Beheshti University of Tehran
4- Associate Professor, Department of Plant Genetics and Breeding, Faculty of Agriculture, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

osmotic imbalance in the soil by the treatments of 500 and 750 g /kg sulfur, vegetation growth will be incomplete and plants quickly enter to the reproductive phase and produce fewer and smaller flowers. The highest content of rutin was measured in plants grown in soil treated with 750 Kg/ha sulfur while soil treatment with 500 Kg/ha sulfur resulted in highest content of luteolin and apigenin, both showing significant difference to the control.

Conclusion: Results of this study indicated that the Chamisso Arnica showed adaptability to the planting location and it can be mass-cultivated under similar conditions.

Keywords: Adaptability, Plant nutrition, Soil amendment, Sulfur fertilizer