دانشگاه فردوسی مشهد

نشریه علمی

علوم باغبانی

(علوم و صنایع کشاورزی)

جلد ۳۸ شماره ۲

سال ۱۴۰۳

شماره پیاپی ۶۲

شاپا: ۴۷۳۰-۲۰۰۸

عنوان مقالات

اثر فواصل آبیاری و ترکیبات ضدتعرق بر عملکرد، اجزای عملکرد و میزان روغن گیاه دارویی سیاهدانه (*Nigella sativa* L.) ۲۵۳

زینب صفائی- مجید عزیزی- غلامحسین داوری نژاد- حسین آرویی

اثر بسترهای مختلف بر ویژگی‌های خاک و صفات فیزیولوژیکی گیاهان ختمی (*Aleca rosea* L.) تحت تنش خشکی........ ۲۶۵

تکتم اورعی- محمود شور- علی تهرانی فر- سیدحسین نعمتی- عطیه اورعی

اثر نانو کلات آهن و سایکوسل بر شاخص‌های رشدی بنت قنسول ۲۸۳

بهزاد کاویانی- ناصر نگهدار

تأثیر باکتری‌های حل‌کننده فسفات در تأمین فسفر از سنگ فسفات و بهبود رشد دانهال‌های پسته (*Pistacia vera* L.) در سطوح مختلف شوری آب آبیاری ۳۰۵

فرهاد آذرمی آتاجان- محمدحسن سیاری زهان- عبدالله میرزایی

ارزیابی کاربرد خاکی اسید هیومیک و تنش کم‌آبیاری بر رشد، خواص کیفی میوه و کارآیی مصرف آب عروسک پشت پرده (*Physalis peruviana* L.) ۳۲۳

سید امیر حسین موسوی- فاطمه نکونام- طاهر برزگر- زهرا قهرمانی- جعفر نیکبخت

بررسی ترکیبات فیتوشیمیایی عصاره‌های اتانولی و اتیل استاتی سه اکوتیپ گیاه دارویی درمنه کوهی (*Artemisia aucheri*) ۳۴۱

سپیده هوشمند- سعیده علیزاده سالطه- صاحبعلی بلند نظر- الیاس آریاکیا

بررسی تأثیر نانو لوله‌های کربن و کیتین بر رشد و باززایی مریم گلی (*Salvia nemorosa*) تحت شرایط درون شیشه‌ای ۳۵۵

یونس پوربیرامی هیر- اسماعیل چمنی- مهسا احدزاده- شبنم شاکر- رقیه نبی پور سنجبد

بررسی واکنش‌های رشدی و بیوشیمیایی گیاه دارویی مرزنجوش (*Origanum majorana*) به فلزات سنگین کادمیم و سرب ۳۶۹

محمد باقر رضوی نیا- نسیبه پورقاسمیان- فرزاد نجفی

تأثیر محلول‌پاشی قبل از برداشت اسید فرولیک و نانوکیتوسان برخصوصیات کیفی و فیتوشیمیایی میوه سیب رقم'رد دلیشز' (*Malus domestica* cv. Red Delicious) ۳۸۳

سجاد مصطفایی- محمد رضا اصغری

بررسی تأثیر سطوح مختلف کود مرغی و سولفات پتاسیم بر صفات کیفی و پارامترهای بیوشیمیایی گیاه شنبلیله (*Trigonella foenum- graceum* L.) ۳۹۵

محمدحسین امینی‌فرد- سجاد تدافان- حسن بیات- مهدی جهانی

اثر باکتری‌های حل‌کننده فسفات بر میزان آلکالوئیدهای مورفین، پاپاورین، و نوسکاپین خشخاش (*Papaver somniferum* L.) ۴۰۹

سمانه سماوات- مهدیه صالحی وژده نظری- مهدی یحیی‌زاده بلالمی- مهشید رحیمی فرد

ارزیابی و مطالعه ارقام پیاز زرد و سفید (*Allium cepa* L.) در شرایط آب‌وهوایی جنوب استان کرمان........ ۴۲۱

مهلا قاسمی- سمیه ساردویی نسب- قاسم محمدی نژاد- سمیه امینی زاده

ادامه فهرست داخل جلد

نشریه علوم باغبانی

(علوم و صنایع کشاورزی)

با شماره پروانه ۲۱/۲۰۱۵ — ۶۸/۴/۱۱ و درجه علمی – پژوهشی شماره ۲۶۵۲۴ — ۷۳/۱۰/۱۹ از وزارت علوم، تحقیقات و فناوری

جلد ۳۸ شماره ۲ تابستان ۱۴۰۳

بر اساس مصوبه وزارت عتف از سال ۱۳۹۸، کلیه نشریات دارای درجه "علمی-پژوهشی" به نشریه "علمی" تغییر نام یافتند.

صاحب امتیاز:	دانشگاه فردوسی مشهد	
مدیر مسئول:	رضا ولی زاده	استاد – تغذیه نشخوارکنندگان (دانشگاه فردوسی مشهد)
سردبیر:	علی تهرانی فر	استاد- علوم باغبانی ومهندسی فضای سبز (دانشگاه فردوسی مشهد)
اعضای هیئت تحریریه:		
	آرویی، حسین	دانشیار- علوم باغبانی ومهندسی فضای سبز (دانشگاه فردوسی مشهد)
	عابدی، بهرام	دانشیار- علوم باغبانی ومهندسی فضای سبز (دانشگاه فردوسی مشهد)
	تهرانی فر، علی	استاد- علوم باغبانی ومهندسی فضای سبز (دانشگاه فردوسی مشهد)
	شور، محمود	دانشیار- علوم باغبانی ومهندسی فضای سبز (دانشگاه فردوسی مشهد)
	حقیقی، مریم	دانشیار- علوم باغبانی (دانشگاه صنعتی اصفهان)
	حسن زاده مبینی، سعید	استاد- بخش بیولوژی (دانشگاه کوبین کانادا)
	خانی زاده، شاهرخ	پژوهشگر – موسسه کشاورزی و غذا اوتاوا کانادا
	خزاعی، حمید	پژوهشگر مرکز جهانی اصلاح و تولید بذر سبزی تایوان
	داوری نژاد، غلامحسین	استاد- علوم باغبانی ومهندسی فضای سبز (دانشگاه فردوسی مشهد)
	راحمی، مجید	استاد – علوم باغبانی (دانشگاه شیراز)
	زمانی، ذبیح اله	استاد – علوم باغبانی (دانشگاه تهران)
	شریفانی، محمد مهدی	دانشیار- علوم باغبانی (دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان)
	عزیزی، مجید	استاد- گیاهان دارویی (دانشگاه فردوسی مشهد)
	عبادی، علی	استاد- علوم باغبانی (دانشگاه تهران)
	فلاحی، اسماعیل	استاد- گروه علوم باغبانی دانشگاه آیداهوی آمریکا
	فارسی، محمد	استاد- ژنتیک واصلاح نباتات (دانشگاه فردوسی مشهد)
	کافی، محسن	استاد- گلکاری ومهندسی فضای سبز (دانشگاه تهران)
	لاهوتی، مهرداد	استاد- فیزیولوژی گیاهی (دانشگاه فردوسی مشهد)
	فوجی، یوشی هارو	استاد- دانشگاه کشاورزی و فناوری توکیو ژاپن

ناشر: دانشگاه فردوسی مشهد

این نشریه درپایگاه‌های زیر نمایه شده است:

AGRIS، CABI، DOAJ، EBSCO، Google scholar، Internet Archive، پایگاه استنادی جهان اسلام (ISC)، سامانه نشریات علمی ایران، پایگاه اطلاعات علمی جهاد دانشگاهی (SID)، بانک اطلاعات نشریات کشور (MAGIRAN)، مرجع دانش CIVILICA

پست الکترونیکی: Jhorts4@um.ac.ir

مقالات این شماره در سایت https://jhs.um.ac.ir به صورت مقاله کامل نمایه شده است .

این نشریه به صورت فصلنامه (۴ شماره در سال) چاپ و منتشر می شود.

مندرجات

مقالات پژوهشی

اثر فواصل آبیاری و ترکیبات ضدتعرق بر عملکرد، اجزای عملکرد و میزان روغن گیاه دارویی سیاهدانه (*Nigella sativa* L.) ۲۵۳
زینب صفائی- مجید عزیزی- غلامحسین داوری نژاد- حسین آرویی

اثر بسترهای مختلف بر ویژگی‌های خاک و صفات فیزیولوژیکی گیاهان ختمی (*Aleca rosea* L.) تحت تنش خشکی ۲۶۵
تکتم اورعی- محمود شور- علی تهرانی فر- سیدحسین نعمتی- عطیه اورعی

اثر نانو کلات آهن و سایکوسل بر شاخص‌های رشدی بنت قنسول ۲۸۳
بهزاد کاویانی- ناصر نگهدار

تأثیر باکتری‌های حل‌کننده فسفات در تأمین فسفر از سنگ فسفات و بهبود رشد دانهال‌های پسته (*Pistacia vera* L.) در سطوح مختلف شوری آب آبیاری ۳۰۵
فرهاد آذرمی آتاجان- محمدحسن سیاری زهان- عبدالله میرزایی

ارزیابی کاربرد خاکی اسید هیومیک و تنش کم‌آبیاری بر رشد، خواص کیفی میوه و کارآیی مصرف آب عروسک پشت پرده (*Physalis peruviana* L.) ۳۲۳
سید امیر حسین موسوی- فاطمه نکونام- طاهر برزگر- زهرا قهرمانی- جعفر نیکبخت

بررسی ترکیبات فیتوشیمیایی عصاره‌های اتانولی و اتیل استاتی سه اکوتیپ گیاه دارویی درمنه کوهی (*Artemisia aucheri*) ۳۴۱
سپیده هوشمند- سعیده علیزاده سالطه- صاحبعلی بلند نظر- الیاس آریاکیا

بررسی تأثیر نانو لوله‌های کربن و کینتین بر رشد و باززایی مریم گلی (*Salvia nemorosa*) تحت شرایط درون شیشه‌ای ۳۵۵
یونس پوربیرامی هیر- اسماعیل چمنی- مهسا احدزاده- شبنم شاکر- رقیه نبی پور سنجبد

بررسی واکنش‌های رشدی و بیوشیمیایی گیاه دارویی مرزنجوش (*Origanum majorana*) به فلزات سنگین کادمیم و سرب ۳۶۹
محمد باقر رضوی نیا- نسیبه پورقاسمیان- فرزاد نجفی

تأثیر محلول‌پاشی قبل از برداشت اسید فرولیک و نانوکیتوسان برخصوصیات کیفی و فیتوشیمیایی میوه سیب رقم'رد دلیشز' (*Malus domestica* cv. Red Delicious) ۳۸۳
سجاد مصطفایی- محمد رضا اصغری

بررسی تأثیر سطوح مختلف کود مرغی و سولفات پتاسیم بر صفات کیفی و پارامترهای بیوشیمیایی گیاه شنبلیله (*Trigonella foenum- graceum* L.) ۳۹۵
محمدحسین امینی‌فرد- سجاد ندافان- حسن بیات- مهدی جهانی

اثر باکتری‌های حل‌کننده فسفات بر میزان آلکالوئیدهای مورفین، پاپاورین، و نوسکاپین خشخاش (*Papaver somniferum* L.) ۴۰۹
سمانه سماوات- مهدیه صالحی وژده نظری- مهدی یحیی‌زاده بلالمی- مهشید رحیمی فرد

ارزیابی و مطالعه ارقام پیاز زرد و سفید (*Allium cepa* L.) در شرایط آب‌وهوایی جنوب استان کرمان ۴۲۱
مهلا قاسمی- سمیه ساردویی نسب- قاسم محمدی نژاد- سمیه امینی زاده

اثرات محلول‌پاشی محرک‌های رشدی بر ویژگی‌های فیزیولوژیکی و فیتوشیمیایی گیاه دارویی زوفا (*Hyssopus officinalis* L. Subsp. *angustifolius* Bieb.) در شرایط آبیاری مختلف ۴۳۳
مهراب یادگاری

کاربرد تیمار گاما آمینو بوتیریک اسید بر آسیب سرمازدگی و خواص آنتی‌اکسیدانی موز رقم 'کاوندیش' (*Musa acuminata* cv. Cavendish) در طی انبارمانی سرد ۴۵۳
زهرا پاک کیش- سمیه مهاجرپور- صفورا سعادتی

Journal of Horticultural Science
https://jhs.um.ac.ir

Research Article
Vol. 38, No. 2, Summer 2024, p. 251-261

Effect of Different Irrigation Intervals and Anti-transpirants Compounds on Yield and Yield Components and Oil of Black Cumin (*Nigella sativa* L.)

Z. Safaei[1], M. Azizi[2*], Gh. Davarinejad[2], H. Arouiee[3]

1, 2 and 3- Former M.Sc. Student, Professor and Associate Profesor, Department of Horticultural Science and Landscape Architecture, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran, respectively.
(*- Corresponding Author Email: azizi@um.ac.ir)

Received:	13-09-2015	**How to cite this article:**
Revised:	26-05-2017	Safaei, Z., Azizi, M., Davarinejad, Gh., & Arouiee, H. (2024). Effect of different irrigation intervals and anti-transpirants compounds on yield and yield components and oil of black cumin (*Nigella sativa* L.). *Journal of Horticultural Science, 38*(2), 251-261. (In Persian with English abstract). https://doi.org/10.22067/jhs.2021.57369.0
Accepted:	05-07-2017	
Available Online:	03-10-2017	

Introduction

The ever-increasing tendency to the use of medicinal plants in the world has grown concerns about their cultivation and production processes. As medicinal plants are more compatible with the nature, special interest and attention has recently been given to herb therapy, and use of medicinal plants, being limited by the rise of pharmaceutical drugs, has become again common and widespread due to a number of reasons. *Nigella sativa* L. is one of the herbs that has a variety of uses and has been being used in iran's traditional medicine since old times. Today this plant is considered as one of the most important kinds of medicine. Therefore, it is of great importance to conduct some researches on the herbs around the country due to different ecological requirements. *N. sativa* belonging to buttercup family, with the scientific name of Ranunculaceae, is an annual, dicotyledonous, herbaceous plant. In several studies, *N. sativa* has been reported to have anti-oxidative, anti-inflammatory, strengthening of immune system, and anti-histamine and oil extract properties. Furthermore, several effects such as lowering blood sugar, lipids, and hypertension, excretion of bile and uric acid, protection of liver, kidney and cardiovascular tissues as well as anti-seizure, anti-cancer, anti-microbial and anti-parasitic effects related to this plant have been reported. The aim of the present study is to improve the yield and yield components and oil of medicinal plant *N. sativa* by anti-transpiration compounds under drought stress conditions.

Materials and Methods

An experiment was conducted at Research Station,Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, in 2012-2013. The research was performed using a split plot experiment based on a randomized complete block design with three replications. The irrigation intervals (8 and 16 days) in main plots and anti-transpiration compounds of chitosan (0.25, 0.5 and 1%), Plantogopsyllium mucilage (0.5, 1 and 1.5%) and arabic gum (0.25, 0.5 and 0.75 %) were put in subplots with three replications. Also, the distance between the main plots in each block and distance between the two blocks were assigned as 100 cm and 200 cm, respectively; so that the moisture content of a plot had no effect on the adjacent plots. Planting date was April16 and planting was performed by hand in 0.5cm-deep furrows. Throughout the growing season, anti-transpiration compounds were applied concurrently with the imposition of drought stress, administered weekly at sunset until the flowering stage. Subsequently, yield, yield components, and oil content were measured.

Results and Discussion

Results showed that irrigation intervals had significant effects on all studied characteristics with the exception

©2017 The author(s). This is an open access article distributed under Creative Commons Attribution 4.0 International License (CC BY 4.0).

https://doi.org/10.22067/jhs.2021.57369.0

of 1000 seed weight. ncreasing irrigation intervals reduced percentage yield and yield components and oil of black cumin grains. Anti-transpirants compounds did have significant effects on percentage of oil and yield and yield components of black cumin grains. There were significant difference between different anti-transpirants compounds in terms of oil and yield components yield and of black cumin grains. The 8 days irrigation interval produced more grain yield compared with 16 days irrigation intervals (621.56 *vs.* 484.23 kg/ha). The highest oil (27.74%) and lowest (21.74%), respectively, at treatment anti-transpirants compound chitosan1 percent With 8 days irrigation interval and gam arabic 0.25 percent was obtained with 16 days irrigation interval and chitosan stimulating abscisic acid synthesis in the treated plant would result in stomatal closure, reduction of stomatal conductance, transpiration rate and water content. They also pointed out that the anti-transpiration effect of chitosan was because of its stimulatory effect in increasing abscisic acid concentration in the treated leaves of bean plant. As the above compounds are natural and biodegradable, as well as safer and less expensive than other chemical anti-transpiration compounds, they can serve as a good alternative to the chemical compounds. Cognition and expertise in water relations of plant and drought stress tolerance is considered as the main program in agriculture and the ability to withstand this stress is of great economic importance.

Conclusion

The anti-transpiration compounds led to significant changes in terms of all the studied traits compared to the control, indicating the effectiveness of theses natural compounds. Providing the appropriate conditions, 1% chitosan treatment can enhance the yield under drought stress. Spraying by arabic gum did not improve the growth conditions. According to this experiment, 1% chitosan treatment and 1.5% *Plantago psyllium* mucilage is considered the most appropriate strategy to enhance the yield of *Nigella sativa* under drought stress.

Keywords: Anti-transrpirants compounds, Medicinal plants, Water stress, Yield

نشریه علوم باغبانی
https://jhs.um.ac.ir

مقاله پژوهشی

جلد ۳۸، شماره ۲، تابستان ۱۴۰۳، ص. ۲۶۱-۲۵۱

اثر فواصل آبیاری و ترکیبات ضدتعرق بر عملکرد، اجزای عملکرد و میزان روغن گیاه دارویی سیاهدانه (*Nigella sativa* L.)

زینب صفائی[۱]- مجید عزیزی[۲]*- غلامحسین داوری نژاد[۲]- حسین آرویی[۳]

تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۲۶/۲۲
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۰۴/۱۴

چکیده

خشکی از جمله تنش‌های فیزیکی است که به‌عنوان عامل محدودکننده رشد گیاهان در بیشتر نقاط جهان شناخته شده است. به‌منظور ارزیابی اثر فواصل آبیاری و ترکیبات ضدتعرق بر عملکرد، اجزای عملکرد و میزان روغن سیاهدانه، تحقیقی در سال زراعی ۱۳۹۲- ۱۳۹۱ در دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد در قالب آزمایش کرت‌های خرد شده با طرح پایه بلوک‌های کامل تصادفی انجام شد. در کرت‌های اصلی فواصل آبیاری (۸ و ۱۶ روز) و در کرت‌های فرعی ترکیبات ضدتعرق کیتوزان (۱، ۰/۵، ۰/۲۵ و صفر درصد)، موسیلاژ اسفرزه (۱/۵، ۱، ۰/۵ و صفر درصد) و صمغ عربی (۰/۷۵، ۰/۵، ۰/۲۵ و صفر درصد) با سه تکرار قرار گرفتند. صفات اندازه‌گیری شده عبارت بودند از: عملکرد دانه، تعداد کپسول در بوته، تعداد دانه در کپسول، وزن دانه در بوته، وزن هزار دانه، تعداد دانه در بوته، شاخص برداشت و میزان روغن. نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد که تیمارهای مختلف آبیاری و ترکیبات ضدتعرق تأثیر معنی‌داری بر تمامی صفات مورد مطالعه به‌جز وزن هزار دانه داشتند. افزایش فواصل آبیاری عملکرد، اجزای عملکرد و میزان روغن سیاهدانه را کاهش داد. ترکیبات ضدتعرق تأثیر معنی‌داری بر عملکرد، اجزای عملکرد و میزان روغن داشتند. در بین تیمارهای مورد مطالعه، بیشترین عملکرد دانه (۷۶۰ کیلوگرم در هکتار) و درصد روغن (۲۷/۰۵ درصد) و کمترین آن‌ها (۴۱۹ کیلوگرم در هکتار و ۲۳/۵۷ درصد) به‌ترتیب در تیمارهای ترکیب ضدتعرق کیتوزان ۱ درصد با فاصله آبیاری هشت روز و تیمار صمغ عربی ۰/۲۵ درصد با فاصله آبیاری ۱۶ روز حاصل شد.

واژه‌های کلیدی: ترکیبات ضدتعرق، تنش خشکی، عملکرد، گیاه دارویی

مقدمه

سیاهدانه گیاهی است دولپه، علفی و یکساله متعلق به خانواده آلاله با نام علمی *Nigella sativa* L. که در زبان انگلیسی Black cumin و در عربی به آن شونیز و کمون اسود گفته می‌شود؛ برای دانه این گیاه خواصی مانند شیرآوری، ضدنفخ، مسهل، ضدانگل، ضدصرع، ضدباکتری، ضدتومور، مسکن و کاهش‌دهنده قند خون را ذکر نموده‌اند (Davazdahemami & Majnoonhossein, 2008; Mozzafari *et al.*, 2000; Shaalan, 2005). نوروزپور و رضوانی مقدم (Norozpoor & Rezvanimoghaddam, 2002) گزارش کردند که مقدار روغن سیاهدانه بین ۵۰- ۴۵ درصد متغیر می‌باشد. بررسی‌های انجام گرفته حاکی از آن است که ساخت مواد مؤثره گیاهان دارویی تحت تأثیر ژنوتیپ و عوامل محیطی است. آب نه تنها به لحاظ اکولوژیکی بلکه به لحاظ فیزیولوژیکی نیز دارای اهمیت است، زیرا در اکثر فرآیندهای داخلی گیاه دخالت داشته و تقریباً تمام فعالیت‌های متابولیکی سلول‌های گیاهی از جمله ساخت مواد مؤثره در گیاهان دارویی بستگی به آب دارد (Safikhani *et al.*, 2007; Babaeei *et al.*, 2010). کمبود آب قابل جذب در گیاه، منجر به بروز تغییرات مورفولوژیکی، فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی از جمله کاهش آماس و رشد سلولی و در نتیجه، کاهش سطح برگ، کاهش ارتفاع گیاه، بسته شدن روزنه‌ها و محدودیت فتوسنتز، افزایش ترکیبات محلول جهت تنظیم

۱، ۲ و ۳- به‌ترتیب دانش‌آموخته کارشناسی ارشد گیاهان دارویی، استاد و دانشیار، گروه مهندسی علوم باغبانی و فضای سبز، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران
(*- نویسندهٔ مسئول: Email: azizi@um.ac.ir)

https://doi.org/10.22067/jhs.2021.57369.0

فشار اسمزی و کاهش جذب مواد غذایی و در نهایت، کاهش تولید گیاه می‌شود و این واکنش‌ها بسته به مرحله رشدی گیاه، شدت و طول مدت تنش اثرات متفاوتی ایجاد می‌کنند (Hassani, 2005; Lebaschi *et al*., 2003). ایران با متوسط نزولات آسمانی ۲۴۰ میلی‌لیتر در گروه مناطق خشک جهان طبقه‌بندی می‌گردد. بالا بودن میزان تبخیر و تعرق، محدودیت منابع آبی و سایر عوامل باعث توجه بیشتری به مطالعه در مورد اثرات تنش خشکی شده است (Safikhani *et al*., 2007). در مناطق خشک قسمت عمده تلفات آب به‌صورت تعرق گیاهی صورت می‌گیرد. با کاهش میزان تلفات آب از طریق تبخیر و تعرق می‌توان علاوه‌بر کاهش مصرف آب، ضمن حفظ منابع آب موجود و استفاده بهینه از آن‌ها، از افزایش شوری خاک در بخش‌های وسیعی از کشور نیز تا حدی جلوگیری کرد. در این بین، کاربرد مواد ضدتعرق یک ابزار نویدبخش برای تنظیم تعرق در حفظ آب گیاه در حد مطلوب است که استراتژی‌هایی مانند استفاده از مواد ضدتعرق، پتانسیل تنظیم تعرق را دارد. ماده ضدتعرق از طریق سازوکارهایی از قبیل بستن روزنه‌ها، انعکاس بیشتر نور خورشید و کاهش رشد اندام‌های هوایی، در افزایش مقاومت گیاه به شرایط کمبود آب مؤثر می‌باشند (Safikhani *et al*., 2007; Del Amora *et al*., 2010). امروزه در بخش کشاورزی مواد مختلفی تحت عنوان مواد ضدتعرق مورد استفاده قرار گرفته‌اند، از جمله این مواد می‌توان به کیتوسان و ترکیبات طبیعی گیاهان دارویی اشاره کرد. کیتوزان با تحریک بیوسنتز اسید آبسیزیک باعث بسته شدن روزنه‌ها و جلوگیری از تبخیر می‌شود. در یک آزمایشی توسط دل آمارو و همکاران (Del Amora *et al*., 2010)، اثر ترکیبات ضدتعرق پینول وتیمارهای غلظت گاز کربنیک و دور آبیاری بر گیاه فلفل تحت تنش خشکی مورد بررسی قرار گرفت. ترکیب ضدتعرق با غلظت ۲/۵ درصد گازکربنیک در دو غلظت ۳۸۰ و ۲۰۰ میکرومول و دور آبیاری در فواصل زمانی چهار و هشت روز بر روی گیاه اعمال شد. نتایج نشان داد که پتانسیل آب گیاه تیمار شده با ترکیبات ضدتعرق بیشتر از گیاه شاهد بود، همچنین گیاهان تیمار شده با این ترکیب مقاومت بیشتری را نسبت به شرایط تنش از خود نشان دادند. ایریتی و همکاران (Iriti *et al*., 2009) اثر ترکیب ضدتعرق کیتوزان بر گیاه لوبیا مورد بررسی قرار دادند. نتایج نشان داد که کیتوسان با تحریک سنتز اسید آبسزیک در گیاه تیمار شده موجب بسته شدن روزنه‌ها، کاهش میزان هدایت روزنه‌ای، میزان تعرق و مقدار آب در گیاه تیمار شده می‌شود. همچنین خاطر نشان نمودند که اثر ضدتعرقی کیتوسان به‌دلیل اثر تحریکی در افزایش غلظت اسید آبسزیک در برگ‌های تیمار شده گیاه لوبیا بوده است. بنایان و همکاران (Bannayan *et al*., 2008) افزایش تعداد دانه در سیاهدانه را با کاهش فواصل آبیاری گزارش کردند. اکبری‌نیا و همکاران (Akbarinia *et al*., 2003) گزارش کردند که با افزایش دور آبیاری عملکرد و اجزای عملکرد در گیاه دارویی سیاهدانه کاهش یافت. همچنین بیان کردند که حداکثر مقاومت به خشکی سیاهدانه در شرایط مزرعه دور آبیاری ۲۰ روز است. با بررسی‌های انجام شده در خصوص تأثیر ترکیبات ضدتعرق تحت شرایط تنش خشکی بر روی گیاه مذکور یافته‌های تحقیقاتی به‌دست نیامد لذا، این تحقیق با هدف بررسی عملکرد، اجزای عملکرد و میزان روغن گیاه دارویی سیاهدانه توسط ترکیبات ضدتعرق تحت شرایط تنش خشکی انجام شد.

مواد و روش‌ها

این آزمایش در سال زراعی ۱۳۹۲- ۱۳۹۱ در دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد به اجرا درآمد. پیش از شروع آزمایش از خاک مزرعه از عمق صفر تا ۳۰ سانتیمتری نمونه‌برداری و آنالیز انجام شد (جدول ۱). این تحقیق با استفاده از آزمایش کرت‌های خرد شده و در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی و با سه تکرار انجام شد، به‌طوری‌که در کرت‌های اصلی فواصل آبیاری (۸ و ۱۶ روز) و در کرت های فرعی ترکیبات ضدتعرق کیتوزان (۱، ۰/۵، ۰/۲۵ و صفر درصد)، موسیلاژ اسفرزه (۱/۵، ۱، ۰/۵ و صفر درصد) و صمغ عربی (۰/۷۵، ۰/۵، ۰/۲۵و صفر درصد) با سه تکرار قرار گرفتند. ترکیب ضدتعرق کیتوزان از شرکت سیگما آلدریچ تهیه شد و مقدار گرم ماده مورد نیاز را برای هر بار محلول‌پاشی نمودن در محلول یک درصد اسید استیک حل نموده و به درصد مورد نیاز رسانیده شد. به‌منظور تهیه موسیلاژ از بذر گیاه مورد نظر، ۲۰۰ گرم بذر گیاه اسفرزه را با ۱۰ برابر آب مقطر به حجم رسانده و آن را بر روی دستگاه لرزاننده قرار داده شد و پس از ۲۴ ساعت موسیلاژ به‌طور کامل در جدار خارجی بذور رسوب نموده و با مالش شدید بذرها و گذراندن آن‌ها از پارچهململ موسیلاژ از بذر جدا شد. به‌منظور تعیین درصد ماده خشک موسیلاژ، سه نمونه از موسیلاژ به حجم یک میلی لیتر را جدا نموده و در شیشه ساعت توزین شده قرار دادیم. سپس به آون °۷۰ درجه سانتی‌گراد منتقل و پس از خشک شدن کامل نمونه‌ها آن‌ها را وزن نموده و درصد ماده خشک موسیلاژ استخراج شده تعیین شد. به‌منظور تهیه غلظت‌های صمغ عربی ۰/۲۵، ۰/۵ و ۰/۷۵ گرم صمغ را در ۵۰ میلی لیتر آب مقطر حل کرده و به مدت ۲۴ ساعت بر روی دستگاه لرزاننده قرار گرفت و سپس، به حجم ۱۰۰ میلی لیتر رسانده شد. طول هر کرت فرعی ۱/۵ متر و عرض آن یک متر و فاصله بین کرت‌های فرعی ۵۰ سانتی‌متر و فاصله بین ردیف ها ۳۰ سانتی‌متر در نظر گرفته شد. همچنین در یک بلوک، فاصله کرت های اصلی یک متر و فاصله بین دو بلوک دو متر در نظر گرفته شد تا رطوبت کرت‌های مجاور روی هم اثری نداشته باشد. تاریخ کاشت ۲۸ فروردین ماه بود و کاشت به‌صورت دستی در شیارهایی با عمق ۰/۵ سانتی‌متر انجام گرفت. عملیات تنک کردن در مرحله چهار و هشت

برگی انجام شد. جهت یکنواختی در سبز شدن بذور، پس از کاشت آبیاری متوالی (هر سه تا چهار روز یکبار به‌صورت غرقابی) صورت گرفت و اعمال تیمار آبیاری پس از استقرار کامل گیاهچه در مرحله شش برگی (یک ماه پس از کاشت) آغاز شد و تا مرحله رسیدگی فیزیولوژیکی (اواسط تیرماه) ادامه یافت. آبیاری در کرت‌ها با یک حجم مشخص آب انجام شد. ابتدا یک کرت را به‌صورت آزمایشی با یک مقدار مشخص آب، آبیاری نموده به‌طوری‌که پشته‌های کرت کاملاً خیس شد. سپس، حجم آب مصرفی کرت را تعیین نموده (۴۰۰ متر مکعب در هکتار که این حجم آب مصرفی در حد میانگین نیاز آبی گیاه در نظر گرفته شد) و آبیاری در فواصل ذکر شده (هشت روز و ۱۶ روز) براساس آن انجام شد. ترکیبات ضدتعرق همزمان با اعمال تنش خشکی تا مرحله گل‌دهی، هفته‌ای یکبار در هنگام غروب آفتاب محلول‌پاشی شد. عملیات برداشت هنگامی که رنگ بوته‌ها متمایل به زرد شده، ولی هنوز فولیکول‌ها شکاف بر نداشته بودند، در تاریخ‌های ۲۵ تیر ماه (فواصل آبیاری ۱۶ روز) و ۵ مرداد ماه (فواصل آبیاری هشت روز) انجام شد. در ابتدا، از هر کرت ۱۰ بوته به‌طور تصادفی جهت اندازه‌گیری اجزای عملکرد انتخاب شد. پس از حذف حاشیه‌ها، سطح باقی‌مانده برای تعیین عملکرد، شاخص برداشت (نسبت عملکرد دانه به عملکرد بیولوژیک) تعیین گردید. برای استخراج روغن از دانه‌های گیاه از دستگاه سوکسله استفاده شد. بدین صورت که مقدار مشخصی دانه (پنج گرم) پس از توزین، آسیاب شده و سپس، در دستگاه سوکسله به‌مدت چهار ساعت تحت اثر هگزان قرار گرفت. در ادامه و به‌منظور خارج کردن بقایای هگزان، مایع حاصل در دستگاه روتاری قرارداده شد و مجدداً توزین گردید و در نهایت، درصد روغن مربوط به هر نمونه با محاسبه اختلاف وزن نهایی نمونه تعیین شد. میزان روغن براساس درصد حجم به وزن اندازه‌گیری شد. برای تجزیه واریانس داده‌های آزمایش و رسم نمودارها، به‌ترتیب از نرم‌افزارهای JMP 8 و Excel استفاده شد و مقایسه میانگین‌ها در سطح احتمال پنج درصد بر اساس آزمون LSD انجام شد.

جدول ۱- خصوصیات فیزیکوشیمیایی خاک محل اجرای آزمایش

Table 1- Physicochemical properties of the soil

اسیدیته خاک pH	هدایت الکتریکی EC (dS.cm^{-3})	نیتروژن کل Total N (%)	فسفر P (mg.kg^{-1})	پتاسیم K (mg.kg^{-1})	بافت خاک Soil texture
7.9	3.35	0.3	19.7	334	لوم رسی Clay loam

نتایج و بحث

عملکرد و اجزای عملکرد دانه

عملکرد دانه حاصل برآیند مجموعه‌ای از اجزا است. در این آزمایش، تأثیر فواصل آبیاری و ترکیبات ضدتعرق بر عملکرد دانه، تعداد کپسول در بوته، تعداد دانه در کپسول، وزن دانه در بوته، وزن هزار دانه و تعداد دانه در بوته در سطح یک درصد معنی‌دار بود. (جدول ۲). نتایج جدول مقایسه میانگین (جدول ۳) بیشترین عملکرد دانه، تعداد کپسول در بوته، تعداد دانه درکپسول، وزن دانه در بوته و تعداد دانه در بوته در فواصل آبیاری هشت روز و در بین ترکیبات ضدتعرق تیمار کیتوزان نسبت به شاهد و سایر تیمارها اختلاف معنی‌داری را نشان داد. غلظت ۱ درصد تیمار کیتوزان دارای بالاترین عملکرد دانه، تعداد کپسول در بوته، تعداد دانه در کپسول، وزن دانه در بوته و تعداد دانه در بوته و کمترین این مقادیر در تیمار غلظت ۰/۲۵ درصد تیمار صمغ عربی مشاهده شد. اثر متقابل فواصل آبیاری و ترکیبات ضدتعرق بر تعداد کپسول در گیاه، تعداد دانه در کپسول، وزن دانه در بوته و عملکرد دانه در سطح یک درصد معنی‌دار شد، به‌طوری‌که بیشترین و کمترین تعداد کپسول به‌ترتیب در فواصل آبیاری هشت روز و غلظت ۱ درصد کیتوزان و فواصل آبیاری ۱۶ روز و تیمار شاهد و غلظت ۰/۲۵ درصد تیمار صمغ عربی مشاهده گردید (جدول ۴، شکل ۱). تعداد کپسول در گیاه یکی از مهم‌ترین اجزای عملکرد است، زیرا کپسول، از یک طرف دربرگیرنده تعداد دانه بوده و از طرفی، تولیدکننده آسیمیلات مورد نیاز دانه می‌باشد. از بین اجزای عملکرد، وزن دانه و تعداد دانه در کپسول در کنترل خصوصیات ژنتیکی بوده و کمتر تحت تأثیر عوامل زراعی و محیطی قرار می‌گیرند. تعداد دانه در کپسول در واقع ظرفیت مخزن گیاه را مشخص می‌کند. هر چه تعداد دانه بیشتر باشد، گیاه دارای مخزن بزرگ‌تری برای آسیمیلات تولید شده می‌باشد و باعث افزایش عملکرد می‌شود. وجود شرایط مناسب از جمله تأمین آب و عناصر غذایی کافی ضروری است، در غیر این صورت شرایط نامناسب منجر به پوکی و توخالی شدن کپسول‌ها می‌شود، یعنی یا دانه‌ها تشکیل نمی‌شود و یا ممکن است تشکیل شود، امّا پر نگردد (Filippo *et al*., 2002; Ghamarnia *et al*., 2011; Khoram Del *et al*., 2008). با توجه به اینکه سیاهدانه گیاهی است با گل انتهایی و رشد محدود که گل و میوه در انتهای هر شاخه تشکیل می‌شود، تعداد کپسول گیاه از تعداد

شاخه‌های گل‌دهنده تبعیت می‌کند. به نظر می‌رسد که در شرایط مطلوب از لحاظ آبیاری گیاه امکان این را دارد که تعداد کپسول در هر بوته خود را به پتانسیل ژنتیکی نزدیک نماید. با مطلوب بودن شرایط آبیاری گیاه رشد رویشی بیشتری داشته و تعداد شاخه فرعی بیشتری تولید کرده و در نتیجه، تعداد کپسول را افزایش داده است (Bannayan et al., 2008; El-Mekawy, 2012). در بسیاری از گیاهان زراعی، بروز تنش آب در دوره گل‌دهی بحرانی است و وقوع آن در این مرحله، تعداد گل‌هایی را که به دانه تبدیل می‌شوند، به‌طور قابل توجهی کاهش می‌دهد. کاظم پور و تاج بخش (Kazempour & Tagbakhsh, 2002) افزایش تعداد دانه در ذرت را در اثر کاربرد مواد ضدتعرق تحت آبیاری محدود گزارش کردند. گیاه در مرحله دانه‌بندی با قرار گرفتن در شرایط مناسب محیطی که توسط ماده ضدتعرق ایجاد شده است حداکثر نیروی خود را در مرحله گل‌دهی صرف افزایش تعداد دانه در کپسول کرده است. به نظر می‌رسد با فراهمی رطوبت، تعداد کپسول در بوته افزایش یافت که این امر به نوبه خود باعث افزایش تعداد دانه در گیاه می‌شود (Del Amora et al., 2010; Filippo et al., 2002). اسلاتیر و بیرهیوزین (Slatyer & Bierhuizen, 1964) گزارش کردند که ترکیبات ضدتعرق باعث افزایش تعداد دانه در گیاه ذرت شده است. به نظر می رسد که افزایش تعداد دانه در تنش‌های کمتر خشکی ممکن است به تعداد کپسول بیشتر و بزرگ‌تر و رشد بهتر بوته‌ها مربوط باشد. افزایش وزن دانه در شرایطی که آب کافی در اختیار گیاه است، با طول مدت پر شدن دانه و سرعت پر شدن دانه در ارتباط می‌باشد و هر چه این دوره طولانی‌تر و سرعت نیز سریع باشد، وزن بالاتری از دانه حاصل می‌شود. همچنین با افزایش سرعت فتوسنتز که در اثر محلول‌پاشی ترکیبات ضدتعرق ایجاد شده است، گیاه در زمان دانه‌بندی مواد فتوسنتزی بیشتری به‌سمت دانه منتقل نموده که باعث افزایش وزن دانه‌ها گردیده است (Bagheri et al., 2010). وزن هزار دانه از فاکتورهایی است که بیشتر تحت کنترل ژنتیکی است و از توارث‌پذیری بالایی برخوردار است و کمتر تحت تأثیر عوامل محیطی قرار می‌گیرد (Norozpoor & Rezvanimoghaddam, 2002). افزایش عملکرد دانه را می‌توان به رشد رویشی بهتر، توسعه کانوپی و در نتیجه، استفاده بهتر از تشعشع خورشیدی و فتوسنتز بالاتر در شرایط آبیاری مطلوب نسبت داد (Filippo et al., 2002). محلول‌پاشی ترکیبات ضدتعرق در شرایط تنش خشکی، با توجه به تعداد کپسول در گیاه، تعداد دانه در کپسول و وزن دانه‌ها که هر سه از اجزای عملکرد سیاهدانه محسوب می‌شوند، منجر به حصول حداکثر عملکرد دانه شده است. به‌دلیل قرار گرفتن گیاه در شرایط مساعد تمایل دارد که شرایط مساعد محیطی را که در اثر محلول‌پاشی ترکیبات ضدتعرق ایجاد شده است را جهت تکمیل فاز زایشی به‌کار گیرد. شاید بتوان گفت که افزایش عملکرد دانه در شرایط مطلوب آبیاری، بیشتر به‌دلیل تأثیر آن بر تعداد کپسول در هر بوته به‌صورت مستقیم و افزیش تعداد دانه در هر بوته به‌صورت غیرمستقیم بوده است (Bagheri et al., 2010; Koutroubas et al., 2000; Kattlewell et al., 2010).

شاخص برداشت

نتایج جدول تجزیه واریانس (جدول ۲) نشان داد که اثر فواصل آبیاری، ترکیبات ضدتعرق بر شاخص برداشت در سطح ۱ درصد معنی دار شد. نتایج جدول مقایسه میانگین حاکی از آن است که فواصل آبیاری هشت روز و ۱۶ روز اختلاف معنی داری را نسبت به هم نشان دادند. همچنین، سطوح مختلف ترکیبات ضدتعرق نسبت به شاهد اختلاف معنی‌داری داشتند. بالاترین شاخص برداشت در سطوح ۱ و ۰/۵ درصد ترکیب ضدتعرق کیتوزان و کم ترین شاخص برداشت در شاهد مشاهده شد؛ و اثر متقابل فواصل آبیاری و ترکیبات ضدتعرق بر شاخص برداشت در سطح ۱ درصد معنی دار شد (جدول ۲ و ۳). همچنین، بالاترین شاخص برداشت در آبیاری مطلوب (هشت روز) و سطوح مختلف ترکیب ضدتعرق کیتوزان و کم‌ترین شاخص برداشت در فواصل آبیاری ۱۶ روز و شاهد مشاهده شد (جدول ۴). به نظر می‌رسد که کاهش شاخص برداشت در تیمار فواصل آبیاری ۱۶ روز و شاهد به دلیل کاهش رشد رویشی و رقابت اندام‌های سبزینه‌ای با اندام‌های زایشی بود که در نتیجه، مواد فتوسنتزی کمتری به دانه اختصاص خواهد یافت. گیاهان تحت تیمار فواصل آبیاری هشت روز و ترکیب ضدتعرق کیتوزان به بهترین وجه از آب بهره‌برداری کرده و با یک رشد رویشی مناسب که اندام‌های زایشی را به بهترین وجه حمایت کرد به شاخص برداشت بالایی دست یافتند. پس از پایان گرده‌افشانی انتقال مواد به دانه‌ها صورت می‌گیرد و آب در فرآیند انتقال مواد به دانه نقش مهمی دارد، لذا به نظر می‌رسد که در تیمار فواصل آبیاری ۱۶ روز و شاهد به‌علت کمبود آب فرآیند انتقال کاهش یافت که حاصل آن کاهش شاخص برداشت بود. تأثیر مواد ضدتعرق در افزایش شاخص برداشت در شرایط تنش خشکی به بهبود فعالیت متابولیسمی، آنزیمی، سنتز پروتئینی و تنظیم اسمزی گیاه در شرایط مصرف مواد ضدتعرق مربوط می‌باشد (Kattlewell et al., 2010; Mozzafari et al., 2000).

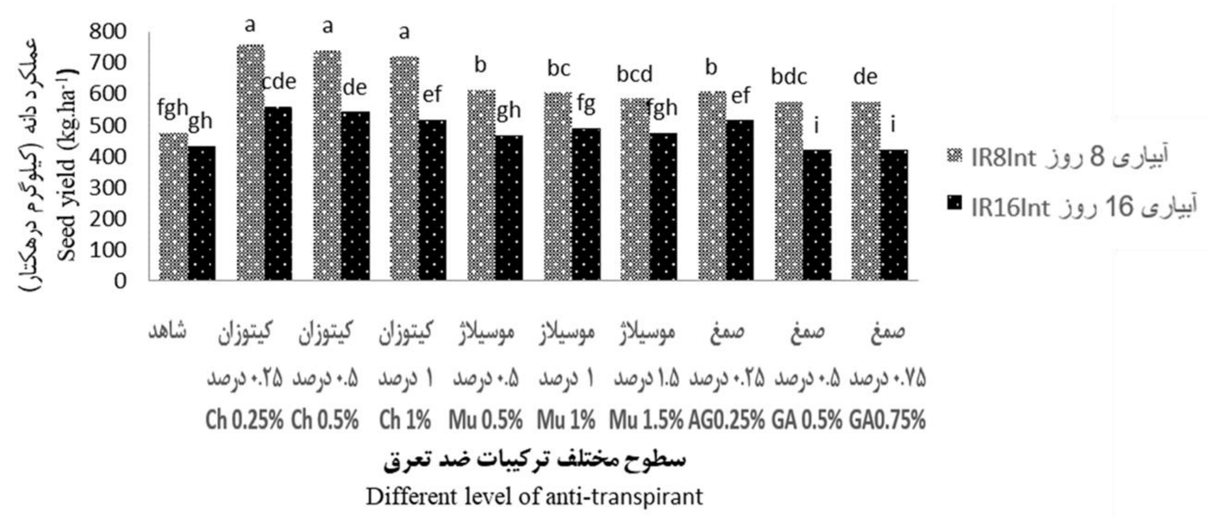
جدول ۲- تجزیه واریانس (میانگین مربعات) اثر دور آبیاری و کاربرد ترکیبات ضدتعرق بر تعداد کپسول در بوته، تعداد دانه در کپسول، تعداد دانه در گیاه، وزن دانه در گیاه، وزن هزاردانه، عملکرد دانه، شاخص برداشت و میزان روغن در گیاه دارویی سیاهدانه

Table 2- ANOVA (mean squares) for the effect of irrigation interval and anti- transpirant compounds on the number of capsules per plant, number of seeds per capsule, seed number per plant, seed weight per plant,1000 seed weight, seed yield oil content, and harvest index in *Nigella sativa.*

منابع تغییر S.O.V	درجه آزادی df	تعداد کپسول در بوته Capsules per plant	تعداد دانه در کپسول Number number of capof seeds per capsule	تعداد دانه در گیاه Seed number per plant	وزن دانه در گیاه Seed weight per plant	وزن هزاردانه 1000 seed weight	عملکرد دانه Seed yeild	درصد روغن Oil percentage	شاخص برداشت Harvest index
تکرار Replication	2	1.5*	8.49**	38140.19*	0.011*	1.25^{ns}	291.56^{ns}	0.082^{ns}	0.87*
دور آبیاری Irrigation interval (A)	1	2.71**	112.99**	22847.7*	0.15**	0.18^{ns}	286305.25**	182.49**	16.06**
خطای اصلی Error a	2	1.26	0.12	7854.51	0.007	0.15	2201.46	1.14	0.35
ترکیبات ضدتعرق Anti-transpirant compound (B)	9	42.91**	963.44**	399691.6**	1.43**	2.12^{ns}	260928.82**	27.53**	127.19**
A × B	9	5.89**	62.81**	24080.21^{ns}	0.11**	0.90^{ns}	39031.93**	11.65**	20.58**
خطای فرعی Error b	36	3.08	5.39	168636.39	0.043	7.48	27076.4	0.86	3.1

*: معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد. **: معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد. ns: عدم معنی‌داری.

ns, * and ** :non- significant and significant at the 5% and 1% of probability levels, respectively.



شکل ۱- اثر متقابل فواصل آبیاری × ترکیبات ضدتعرق بر عملکرد دانه سیاهدانه

Figure 1- The interactioneffect of irrigation intervals ×anti- transpirant compounds on the seed yield of *Nigella sativa* (LSD, *p≤0.05*)

Ch: کیتوزان، Mu: موسیلاژ، GA: صمغ

IR8Int: آبیاری با فاصله ۸ روز، IR16Int:آبیاری با فاصله ۱۶ روز

جدول ۳- عملکرد، اجزای عملکرد و میزان روغن سیاهدانه تحت تأثیر سطوح مختلف فواصل آبیاری و ترکیبات ضدتعرق

Table 3- The yield, yield components and oil content of *Nigella sativa* under different levels of irrigation intervals and anti -transpiration compounds in *Nigella sativa*

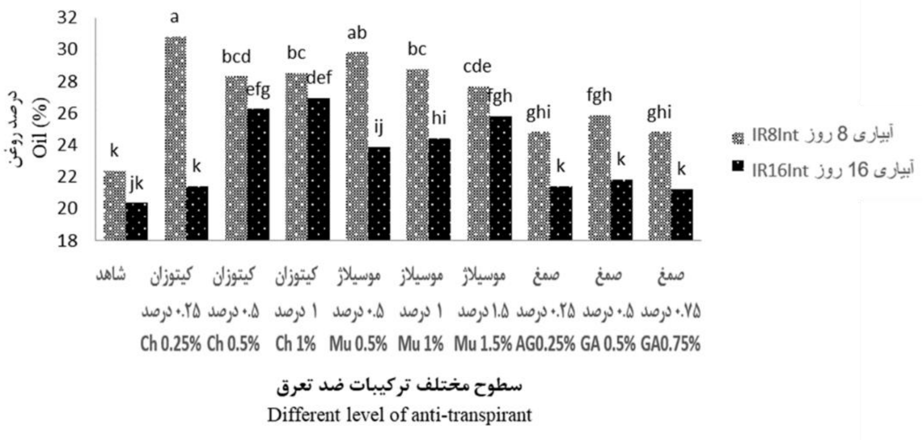
تیمارها Treatments	تعداد کپسول در بوته Number of capsules per plant	تعداد دانه در کپسول Number of seeds per capsule	تعداد دانه در گیاه Seed number per plant	وزن دانه در گیاه Seed weight per plant (g)	عملکرد دانه Seed yeild (Kg.ha-1)	روغن Oil (w/w)	شاخص برداشت Harvest index (%)
فواصل آبیاری Irrigation intervals (day)							
8	6.1a	61.48a	353.25a	0.78a	621.56a	27.05a	31.36a
16	5.6b	58.73b	314.22b	0.68b	484.23b	23.57b	30.32b
ترکیبات ضدتعرق Anti-transpirant compounds							
شاهد Control	4.7g	56.79h	180.73e	0.57f	454.31e	21.77e	29.16e
کیتوزان ۱ درصد Chitosan 1%	7.24b	66.98a	471.76a	1a	659.5a	27.74a	33.31a
کیتوزان ۰/۵ درصد Chitosan 0.5%	7.32a	65.73b	442.12ab	0.94b	640.66ab	27.28ab	33.16a
کیتوزان ۰/۲۵ درصد Chitosan 0.25%	6.39a	64.37c	389.24bc	0.94b	618.5ab	26.19c	32.47b
موسیلاژ اسفرزه ۱/۵ درصد Mucilage 1.5%	5.91bc	61.38d	342.29cd	0.67c	540.66c	26.84abc	30.37c
موسیلاژ اسفرزه ۱ درصد Mucilage 1%	5.89cd	57.93f	334.7cd	0.66cd	547c	26.58 cb	30.18c
موسیلاژ اسفرزه ۰/۵ درصد Mucilage 0.5%	6c	57.39g	335.24cd	0.62ed	530.16c	26.74abc	30.17c
صمغ عربی ۰/۷۵ درصد Gum Arabic(GA) 0.75%	5.17ed	57.93f	262.06de	0.61ef	561.16c	23.12d	30.26c
صمغ عربی ۰/۵ درصد Gum Arabic(GA) 0.5%	4.88gf	56.95hg	281.83d	0.62ed	493d	23.84d	29.73d
صمغ عربی ۰/۲۵ درصد Gum Arabic(GA) 0.25%	5.46ef	54.94i	296.85d	0.64cde	484ed	23.02d	29.60d

میانگین‌های دارای حروف مشابه در هر ستون از نظر آماری در سطح احتمال ۵ درصد با استفاده از آزمون LSD اختلاف معنی‌داری ندارند.

In each column, means followed by at least one common letter are not significantly different at 5% of probability level based on LSD test.

درصد روغن

نتایج جدول تجزیه واریانس نشان داد که درصد روغن تحت تأثیر عوامل آبیاری قرار گرفت (جدول ۲). مقابسه میانگین‌های نشان داد که بالاترین درصد روغن (۲۷/۰۵ درصد) و کمترین (۲۳/۵۷ درصد) به ترتیب در فواصل آبیاری هشت روز و ۱۶ روز مشاهده گردید. اثر ترکیبات ضدتعرق بر درصد روغن معنی‌دار شد. مقایسه میانگین‌ها نشان داد که بیشترین درصد روغن (۲۷/۷۴ درصد) و کمترین (۲۱/۷۷ درصد) به‌ترتیب در تیمار کیتوزان ۱ درصد و شاهد مشاهده گردید (جدول ۳). اثر متقابل فواصل آبیاری و ترکیبات ضدتعرق بر درصد معنی‌دار شد، به‌طوری‌که بالاترین درصد روغن در تیمار ۱ درصد کیتوزان و فواصل آبیاری ۱۰ روز و کمترین درصد روغن در شاهد و فواصل آبیاری هشت روز و کمترین در تیمار ۰/۲۵ درصد صمغ عربی و فواصل آبیاری ۱۶ روز مشاهده گردید (جدول ۲)، (شکل ۲). نتایج نشان داد که تنش خشکی میزان روغن را در گیاه سیاهدانه کاهش داد، به‌طوری‌که گیاهان بدون تنش دارای بیشترین میزان روغن بودند (Iiriti *et al*., 2009; (Hassani, 2005; Kazempour & Tagbakhsh, 2002. آب نیز یکی از مهم‌ترین عوامل محیطی مؤثر در تولید محصولات مختلف می‌باشد، به‌طوری‌که کمبود آب در جریان تولید گیاهان می‌تواند صدمات سنگینی بر رشدونمو و همچنین، مواد مؤثره گیاهان دارویی وارد نماید. آب در بیوسنتز روغن مؤثر بوده و می‌تواند در کیفیت و کمیت سیاهدانه تأثیرگذار باشد (Omidbaigi, 2009; Mozzafari *et al*., 2000).



شکل ۲- اثر متقابل فواصل آبیاری × ترکیبات ضدتعرق بر میزان روغن دانه سیاهدانه

Figure 2-The interaction effect of irrigation intervals ×anti-transpirant compounds on the oil content of *Nigella sativa* seeds (LSD, *p≤0.05*)

Ch: کیتوزان، Mu: موسیلاژ، GA: صمغ

IR8Int: آبیاری با فاصله ۸ روز، IR16Int:آبیاری با فاصله ۱۶ روز

جدول ٤- اثر متقابل فواصل آبیاری × ترکیبات ضدتعرق بر عملکرد، اجزای عملکرد و میزان روغن دانه سیاهدانه

Table 4- The interaction effect of irrigation intervals ×anti- transpirant compounds on the yield, yield components and oil contents of *Nigella sativa* seeds

تیمارها Treatments	تعداد کپسول در گیاه Number of capsules per plant	تعداد دانه در کپسول Number of seeds per capsule	وزن دانه در گیاه Seed weight per plant	شاخص برداشت Harvest index
I_1K_1	6.45c	65.88c	1.02b	34.15a
I_1K_2	7.36b	66.63b	1.06b	34.35a
I_1K_3	8.2a	70.93a	1.14a	34.51a
I_1M_1	6.29cd	57.86i	0.68d	30.22defg
I_1M_2	6cde	59.25h	0.68d	30.27def
I_1M_3	6cde	61.84f	0.69d	30.59cd
I_1G_1	5.34fg	56.87kj	0.64ed	29.73ghi
I_1G_2	5.21fg	58.93h	0.64ed	29.81efghi
I_1G_3	4.97gh	59.35h	0.64ed	30.21defg
I_1C	5.18fg	57.27ji	0.64ed	29.77fghi
I_2K_1	6.33c	62.87e	0.83c	30.80c
I_2K_2	7.28b	64.83d	0.86c	31.98b
I_2K_3	6.28cd	63.02e	0.86c	32.11b
I_2M_1	5.7ef	56.92kj	0.57f	30.11defgh
I_2M_2	5.7ef	56.87kj	0.64ed	30.10defgh
I_2M_3	5.74def	60.92g	0.64ed	30.16defgh
I_2G_1	5.58ef	53.01m	0.64ed	29.46i
I_2G_2	4.55hi	54.97l	0.60ef	29.65hi
I_2G_3	5.38fg	57.97i	0.58f	30.31cde
I_2C	4.32i	57.92i	0.55f	28.55j

میانگین‌های دارای حروف مشابه در هر ستون از نظر آماری در سطح احتمال ۵ درصد با استفاده از آزمون LSD اختلاف معنی‌داری ندارند.

In each column, means followed by at least one common letter are not significantly different at 5% of probability level based on LSD test.

I_1 دور آبیاری ۸ روز، I_2 دور آبیاری ۱۶ روز، K_1 کیتوزان ۰/۲۵ درصد، K_2 کیتوزان ۰/۵ درصد، K_3 کیتوزان ۱ درصد، M_1 موسیلاژ ۰/۵ درصد،M_2 موسیلاژ ۱ درصد، M_3 موسیلاژ ۱/۵درصد، G_1 صمغ ۰/۲۵ درصد، G_2 صمغ ۰/۵ درصد، G_3 ۰/۷۵ درصد

I1=8 days irrigation interval, I2=16 days irrigation interval, K1=chitosan 0.25%, K2=chitosan 0.5%, K3=chitosan 1%, M1=mucilage 0.5%, M2=mucilage 1%, M3= mucilage 1.5%, G1=gum 0.25%, G2=gum 0.5%, G3=0.75%

در این آزمایش نیز شاید بتوان کاهش درصد روغن در تیمار تنش شدید را به رشد ضعیف رویشی گیاه و کاهش گل‌دهی گیاه و نهایتاً کاهش تولید دانه نسبت داد. ولد آبادی و همکاران (Valadabadi *et al*., 2004) در آزمایشی روی کرچک به این نتیجه رسیدند که برداشت زودهنگام این گیاه به‌طوری‌که گیاه‌ها نارس باشند و یا کپسول‌ها سبز باشند، به‌طور چشمگیری باعث کاهش میزان روغن دانه می‌شود. همچنین، درجه حرارت بیش از ۳۵ درجه سانتی‌گراد، ذخیره‌سازی آب در هنگام گل‌دهی و تشکیل روغن نیز می‌تواند به‌طور نامطلوبی میزان روغن را تحت تأثیر خود قرار دهد همچنین آن‌ها نتیجه گرفتند که مقدار نیاز آبی جهت آبیاری محصول بستگی به رقم، سیکل زندگی و شرایط محیطی دارد. میزان روغن تابع عملکرد دانه گیاه می‌باشد. لذا افزایش میزان روغن در تیمار کیتوزان را می‌توان به افزایش عملکرد دانه و همچنین، فراهم بودن شرایط مساعد جهت رشدونمو گیاه در تمام مراحل رشد رویشی و زایشی نسبت داد.

نتیجه‌گیری

با توجه به نتایج به‌دست آمده در پژوهش حاضر، استفاده از ترکیبات ضدتعرق تحت شرایط تنش خشکی تأثیر معنی‌داری بر عملکرد، اجزای عملکرد و میزان روغن سیاهدانه نشان داد. محلول‌پاشی ترکیب ضدتعرق کیتوزان نسبت به شاهد موجب تقلیل اثر تنش خشکی شد و اثرات منفی تنش خشکی را بهبود بخشید. ترکیبات ضدتعرق عملکرد، اجزای عملکرد میزان روغن را نسبت به شاهد افزایش دادند. با توجه به مقایسه‌های میانگین و روابط بین صفات مشخص شد که انتخاب مقدار محلول‌پاشی مناسب، تأثیر زیادی در افزایش هر یک از صفات دارد. تیمار کیتوزان ۱ درصد با ایجاد شرایط مناسب باعث افزایش عملکرد تحت شرایط تنش خشکی گردید. محلول‌پاشی با تیمار صمغ عربی موجب بهبود رشد نشد. با توجه به این آزمایش، تیمار کیتوزان ۱ درصد و موسیلاژ اسفرزه ۱/۵ درصد مناسب‌ترین راهکار برای افزایش عملکرد گیاه دارویی سیاهدانه در شرایط تنش خشکی است.

References

1- Akbarinia, A., Khosravifard, M., Ashorabadi, A., & Babakhano, P. (2003). Effect of irrigation on yield and agronomic characteristics of black cumin (*Nigella sativa*). *Journal of Medicinal Plants Research*, *21*(1), 65-73. (In Persian with English abstract). https://doi.org/10.22092/ijmapr.2005.115208

2- Bagheri, H., Andalibi B., & Azimimoghaddam, M.R. (2010). Effect of atrazine anti transpiration application on improving physiological traits, yield and yield components of safflower under rain fed condition. *Journal of Crops Improvement*, *14*(2), 1-16. (In Persian with English abstract). https://doi.org/10.22059/jci.2013.29497

3- Bannayan, M., Nadjafi, F., Azizi, M., Tabrizi, L., & Rastgoo, M. (2008). Yield and seed quality of *Plantago ovata* and *Nigella sativa* under different irrigation treatments. *Industrial Crops and Products*, *27*, 11-16. https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2007.05.002

4- Babaeei, K., Aminidehaghi, M., Modaressanav, S.A.M., & Jabbari, R. (2010).Water deficit effect on morphology, prolin content and thymol percentage of thyme (*Thymus vulgaris* L.). *Journal of Medicinal Plants Research*, *26*, 239-251. (In Persian with English abstract). https://doi.org/10.22092/ijmapr.2010.6939

5- Davazdahemami, S., & Majnoonhossein, N. (2008). *Cultivation and production of some medicinal and spice plants*. Tehran University Press, Tehran, Iran. 300 p.

6- Del Amora, F.M., Cuadra-Crespoa, P., Walkera, D.J., Cámarab, J.M., & Madridc, R. (2010). Effect of foliar application of antitranspirant on photosynthesis and water relations of pepper plants under different. Levels of CO_2 and water stress. *Journal of Plant Physiology*, *167*, 1232-1238. https://doi.org/10.1016/j.jplph.2010.04.010

7- Del-Valle V., Hernandez-Munoz P., Guarda A., & Galotto M.J. (2005). Development of a cactus mucilage edible coating (*Opuntiaficus indica*) and its application to extend strawberry (*Fragaria ananassa*) shelf-life. *Food Chemistry*, *91*, 751-756. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.07.002

8- El-Mekawy M.A.M. (2012). Growth and yield of (*Nigella sativa* L.) plant influenced by sowing date and irrigation treatments. *Journal of Agricultur and Environ. Research*, *12*(4), 499-505.

9- Filippo, l., Moretti., A., & Lovat, A. (2002). Seed yield, yield, yield components essential oil content and composition of *Nigella sativa* L. and *Nigella damascenal*. *Industrial Crops and Products*, *15*, 59-69. https://doi.org/10.1016/S0926-6690(01)00096-6

10- Ghamarnia, H., Khosravy, H., & Sepehri, S. (2011). Yield and water use efficiency of (*Nigella sativa* L.) under different irrigation treatments in a semiarid region in the West of Iran. *Journal of Medicinal Plants Research*, *4*(16), 1612-1616.

11- Iiriti M., Picchi V., Rossoni M., Gomarasca S., Ludwig N., Garganoand M., & Faoro F. (2009). Chitosan antitranspirant activity is due to abscisic acid-dependent stomatal closure. *Environmental and Experimentan Botany*, *66*, 493-500. https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2009.01.004

12- Ibrahim, E.A., & Selim, E.M. (2010). Effect of irrigation interval and Faoro *F. antitranpirant*. (kaolin) on summer squah (*Cucurbitapepo* L) growth, yield quality 10 and economics. *Agricultural and Forest Meteorology*, *1*(8), 883-894. https://doi.org/10.21608/jssae.2010.75212

13- Istanbulluoglu A., Arslan B., Gocmen E., Gezer E., & Pasa C. (2010). Effects of deficit irrigation regimes on the yield and growth of oil seed rape (*Brassica napus*L.). *Original Research Article Biosystems Engineering*, *105*(3), 388-394. https://doi.org/10.1016/j.biosystemseng.2009.12.010

14- Hassani, A. (2005). Effect of water deficit on growth, yield and essential oil herb Iran. *Journal of Medicinal Plants Research*, *22*(3), 256-261. (In Persian).

15- Kazempour, S., & Tagbakhsh, M. (2002). Effect of some anti-transpiration convegetive haracteristics, yield and yield parameters of corn under limited irrigation. *Journal of Agronomy Crop Science*, *32*(2), 205-211. (In Persian with English abstract)

16- Koutroubas S.D., Papakosta D.K., & Doitsinis A. (2000). Water requirements for castor oil crop (*Ricinuscommunis*L.) in a Mediterranean climate. *Journal of Agronomy Crop Science*, *184*, 33-41. https://doi.org/10.1046/j.1439-037x.2000.00357.x

17- Kattlewell, P.S, Heath, W.L, & Haigh, I.M. (2010). Yield enhancement of droughted wheat by film antitranspirant application. *Agriculture Scince*, *3*, 143-147. https://doi.org/10.4236/as.2010.13017

18-Khorramdel, S., koocheki, A., Nassiri Mahallati, M., & Ghorbani, R. (2008). Effect of biofertilizers on growth indices of black cumin. *Journal of AgricultureResearch*, *6*(2), 294-285. (In Persian with English abstract). https://doi.org/10.22067/gsc.v6i2.2435

19-Omidbaigi R. (2009). Production and processing of medicinal plant (3rd edition.Vol. 1). Razavi Ghods Astan Publication, Mashhad, Iran. 347 pp.

20- Lebaschi, M. H., Ashourabadi, E., & Mazaheri, D. (2003). Fluctuation of hypericin under water deficit. *Pajouhesh-va-Sazandegi in Agronomy and Horticulture*, *16*(58), 44-51.(In Persian with English abstract)

21- Ludwig, N., Cabrini, R., Faoro, F., Gargano, M., Gomarasca, S. Iriti, M., Picchi, V., & Soave, C. (2010). Reduction of evaporative flux in bean leaves due to chitosan treatment assessed by infrared thermogragh. *Infrared Physics and Technology*, *53: 65-70.* https://doi.org/10.1016/j.infrared.2009.08.008

22- Mozzafari, F., Ghorbanli, S.M., & BabaiFarzami, A. (2000). The effect of water stress on the seed oil of *Nigella sativa* L. *Journal of Essential Oil Research*, *12*, 36-38. https://doi.org/10.1080/10412905.2000.9712036

23- Nabipour, M., Meskarbashee, M., & Yosefpour, H. (2007). The Effect of water deficit on yield and yield components of safflower (*CarthamustinctorriusL.*). *Journal of Biological Sciences*, *10*, 421-426. https://doi.org/10.3923/pjbs.2007.421.426

24- Norozpoor, G., & Rezvanimoghaddam , P. (2002. Effect of different irrigation intervals and plant density on oil yield and essences percentage of black cumin (*Nigella sativa*). *Pajouhesh and Sazandegi*, *73* , 133-138. (In Persian with English abstract). https://doi.org/10.22067/gsc.v3i2.1313

25- Safikhani, F., sharifabadi, H., Syadat, A., Ashorabadi, A., Syednedjad, M., & Abbaszadeh, B. (2007). The effect of drought on yield and morphologic characteristics *Deracoce phalummoldvica*L. *Journal of Medicinal Plants Research*,. *23*(2), 183-194. (In Persian with English abstract)

26- Shaalan M.N. (2005). Influence of biofertilizers and chicken manure on growth, yield and seeds quality of *(Nigella sativa* L.) plants. *Egyptian Journal of Agricultural Research*, *83*, 811-828. https://doi.org/10.21608/ejar.2005.245568

27- Slatyer, P.O., & Bierhuizen, J.F. (1964). The influence of several transpiration suppressants on transpiration, photosynthesis and water use efficiency of cotton leaves. *Australian Journal of Biological Sciences*, *19*(17), 31-46. https://doi.org/10.1071/BI9640131

28- Terzi, A., Coban, S., Yildiz, F., Ates, M., Bitiren, M., Taskin, A., & Aksoy, N. (2010). Protective effects of black cumin*(Nigella sativa)* on intestinal ischemia-reperfusion injury in rats. *Journal of Investigative Surgery*, *23*(1), 21-27.

29- Thakuria, R.K., Singh, H., & Singh, T. (2004). Effect of irrigation and antitranspirant on biometric components, seed yield and plant water-use of spring sunflower (*Helianthus annuus*). *Indian Journal Agrology*, *49*, 121-123. https://doi.org/10.59797/ija.v49i2.5174

30- Valadabadi, A., Usofi, F., & Shirani, H. (2004). Effect of water holding and different nitrogen levels on some of agronomic characteristics of castor bean (*Ricimus communis*). *Journal of Agronomy and Plant Breeding*, *6*(1), 99-110. (In Persian with English abstract)

Journal of Horticultural Science
https://jhs.um.ac.ir

Research Article
Vol. 38, No. 2, Summer 2024, p. 263-279

Effect of Different Growth Medium on Soil Properties and Physiological Traits of Hollyhocks (*Alcea rosea* L.) under Drought Stress

T. Oraee[1], M. Shoor[2*], A. Tehranifar[3], S.H. Nemati[4], A. Oraee[5]

1, 2, 3, 4 and 5- Ph.D., Associate Professor, Professor, Assistant Professor and Postdoc, Department of Horticulture and Landscape Architecture, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran, respectively.
(*- Corresponding Author Email: shoor@um.ac.ir)

Received:	12-07-2021	**How to cite this article:**
Revised:	30-10-2021	Oraee, T., Shoor, M., Tehranifar, A., Nemati, S.H., & Oraee, A. (2024). Effect of different growth medium on soil properties and physiological traits of hollyhocks (*Alcea rosea* L.) under drought stress. *Journal of Horticultural Science, 38*(2), 263-279. (In Persian with English abstract). https://doi.org/10.22067/jhs.2021.71383.1073
Accepted:	08-11-2021	
Available Online:	08-11-2021	

Introduction

Climate change predictions indicate that drought and extreme heatwaves will become more frequent and extreme in many regions. Drought is the main abiotic stress that severely reduces plant yield across the globe. Thus, this may have negative consequences for the agricultural soils, as it limits the availability of water and nutrients to soil microorganisms and plants that develop on these soils. To cope with this situation, the use of organic amendments is the best option. Recent studies have shown that the application of organic fertilizers can affect soil moisture and thus, mitigate the negative effect of climate change on that parameter. Organic amendments increase soil organic matter content thus improving soil physical, chemical, and biological properties, and therefore, can confer drought resistance to soils. The application of organic residues has been presented as a great strategy against soil degradation in semiarid environments. However, the interactions between organic amendments and drought in hollyhock plants are not fully known. Here, we evaluate whether the organic amendment influences the physiological traits of hollyhocks and soil properties under drought conditions.

Materials and Methods

The experiment was conducted in the research field at Ferdowsi University of Mashhad, Iran. The experiment consisted of three factors (cultivars, organic amendments, and drought) with organic amendments and drought having four and three levels, respectively. Drought treatments were controlled by a TDR at 80, 60, and 40% FC. The three sources of organic amendments were used cow manure, rice hull and wheat straw. Seeds were planted in cocopeat, perlite, and peat mixture trays in the greenhouse with an average temperature of 20 °C and under a photoperiod of 14 hours of light and 10 hours of darkness with a light intensity of 400 μmol^{-1} m^{2}. In the 5-6 leaf stage, seedlings were transferred in pots (18 cm high and 8 cm in diameter) containing field soil. The plants were transferred to the field with four different substrates (field soil, field soil + manure, field soil + rice hull, and field soil + wheat straw) and were exposed to drought stress for one month during the flowering stage. This analysis examined both the physical and chemical properties of the soil, including changes in the macroelements nitrogen, phosphorus, and potassium.

Results and Discussion

Soil nitrogen changes were significantly affected by the interactions of ecotype with drought, ecotype with the medium, and drought stress with medium. The highest nitrogen changes were recorded in Mashhad ecotype under 80% FC. Nitrogen content in amended soil had an increasing trend during the experiment, but the amount of nitrogen had a decreasing trend in soil. In all media under stress, the amount of soil phosphorus was increased and the highest

©2021 The author(s). This is an open access article distributed under Creative Commons Attribution 4.0 International License (CC BY 4.0).

https://doi.org/ 10.22067/jhs.2021.71383.1073

amount of phosphorus was observed in soil + manure at all irrigation regimes. The highest amount of potassium in both ecotypes was observed in soil + manure. The amount of potassium in amended soils under stress significantly increased, but in all organic amendments with increasing drought stress from 80 to 40% FC, the potassium content decreased. In both ecotypes, soil salinity was increased in all culture media. Han *et al*. (2016) stated that the amount of nitrogen, phosphorus, and potassium in the amended soil was higher than the substrates containing chemical fertilizer. The medium EC was alkaline at the end of the experiment and the salinity of the culture medium increased compared to the control. This study revealed a negative correlation between electrolyte leakage and dry weight in hollyhock plants. Furthermore, all measured physiological and growth parameters were significantly affected by the treatments. Notably, the Mashhad ecotype grown in soil supplemented with animal manure at 80% field capacity (FC) exhibited the highest levels of physiological traits (SPAD and relative water content) and growth index (dry weight).The application of manure + soil by providing macro elements reduces the negative effects of drought stress.

Conclusion

The type of crops grown in arid and semi-arid regions should be reconsidered. Also, some plants with high water requirements should be replaced with plants with low and unexpected water requirements. Because hollyhocks are low-expected plants that grow well in drought areas, so they can be considered as suitable species for cultivation in low-input systems and can tolerate drought situations by 40% FC in amended soil.

Keywords: Nutrients, Organic matter, Ornamental Hollyhock, Stress

نشریه علوم باغبانی
https://jhs.um.ac.ir

مقاله پژوهشی
جلد ۳۸، شماره ۲، تابستان ۱۴۰۳، ص. ۲۷۹-۲۶۳

اثر بسترهای مختلف بر ویژگی‌های خاک و صفات فیزیولوژیکی گیاهان ختمی (*Aleca rosea* L.) تحت تنش خشکی

تکتم اورعی[1]- محمود شور[2*]- علی تهرانی فر[3]- سیدحسین نعمتی[4]- عطیه اورعی[5]

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۴/۲۱
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۸/۱۷

چکیده

کاربرد مواد آلی به‌عنوان یک استراتژی مناسب به‌منظور کاهش تخریب خاک در آب‌وهوای خشک و نیمه خشک ارائه شده است. به‌منظور بررسی اثر آبیاری و بسترهای کشت بر رشد دو اکوتیپ ختمی زینتی، آزمایشی در شرایط مزرعه تعریف شد. تیمارهای آزمایش شامل دو اکوتیپ (مشهد و تهران)، سه سطح رطوبتی (۸۰، ۶۰ و ۴۰ درصد ظرفیت زراعی) و چهار بستر کشت (خاک، خاک + کود حیوانی، خاک + شلتوک برنج، خاک + کاه و کلش گندم) بودند. عناصر ماکرو (نیتروژن، فسفر و پتاسیم)، هدایت الکتریکی، pH خاک و صفات فیزیولوژیکی گیاه (نشت الکترولیت، محتوای نسبی آب، پرولین، کربوهیدرات) و وزن خشک اندازه‌گیری شد. نتایج آزمایش نشان داد که اثرات سه‌گانه اکوتیپ× تنش خشکی × بسترهای کشت بر تغییرات میزان عناصر نیتروژن، فسفر و پتاسیم خاک مزرعه در پایان آزمایش معنی‌دار نشد، امّا بیشترین تغییرات این عناصر در بستر خاک + کود حیوانی مشاهده شد و همچنین، این تغییرات در خاک حاوی اکوتیپ مشهد بیشتر بود. میزان شوری بستر خاک + کود حیوانی در هر دو اکوتیپ نسبت به بستر خاک، ۷۸ درصد افزایش یافت. از طرفی، تغییرات اسیدیته خاک در سطح آبیاری ۴۰ درصد نسبت به شاهد کمتر بود و این تغییرات در بستر خاکی ۶۰ درصد کاهش یافت. تمامی پارامترهای فیزیولوژیکی و رشدی گیاهان ختمی تحت تیمارهای آزمایش قرار گرفت و بیشترین میزان شاخص کلروفیل (۶۸)، محتوای نسبی آب (۷۲ درصد) و وزن خشک (۹۵ گرم) در اکوتیپ مشهد تحت تیمار ۸۰ درصد ظرفیت زراعی در بستر خاک + کود حیوانی و بیشترین کربوهیدرات (۸۲ میلی‌گرم در گرم وزن خشک) در اکوتیپ مشهد تحت تیمار ۴۰ درصد ظرفیت زراعی در بستر خاک + کود حیوانی به ثبت رسید. بدین منظور، کاربرد کود حیوانی همراه با خاک با فراهم نمودن عناصر ماکرو اثرات منفی تنش خشکی را کاهش می‌دهد.

واژه‌های کلیدی: ختمی زینتی، عناصر غذایی، کم‌آبیاری، مواد آلی

مقدمه

امروزه به‌دلیل روند روزافزون رشد جمعیت شهری، پایداری در فضای سبز از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. تشدید تنش‌های محیطی زمینه‌ساز از بین رفتن گیاهان زینتی است، لذا ارائه گیاهان باکیفیت و مقاوم در برابر تنش‌های زیستی، جهت استقرار مناسب در فضای سبز یکی از اهداف مهم تولیدکنندگان و اصلاح‌کنندگان گیاهی می‌باشد. در بین گیاهان زینتی، گل ختمی[6] با نام عمومی Hollyhock، از خانواده پنیرک‌سانان به‌عنوان گیاهی چندساله شناخته می‌شود. علاوه‌بر جنبه زینتی در فضای سبز (Pakravan & Ghahreman, 2003)، به‌دلیل حضور رنگ‌دانه‌ها و به‌منظور تولید مواد رنگی بسیار مورد توجه است. از گل‌های این گیاه به‌منظور تولید چای دارویی استفاده می‌شود. از طرفی، خاصیت‌های ضدباکتریایی (Ahmed *et al.*, 2016)، آنتی‌اکسیدانی (Hussain *et al.*, 2014)، ضدافسردگی، دهان‌شویه، توقف خستگی، بهبود جریان خون (Burt & Reinders, 2003) این گیاه به اثبات رسیده است. با توجه به شرایط آب‌وهوایی مشهد و مقاومت این گیاه به

۱، ۲، ۳، ۴ و ۵- به‌ترتیب دکتری، دانشیار، استاد، استادیار و پسا دکتری، گروه مهندسی علوم باغبانی و فضای سبز، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران
(*- نویسندهٔ مسئول: (Email: shoor@um.ac.ir

https://doi.org/ 10.22067/jhs.2021.71383.1073

6- *Alcea rosea* L.

شرایط شوری (Asghari, 2014)، در فضای سبز گیاه مطلوبی می‌تواند باشد.

در بین فاکتورهای محیطی، خشکی به‌عنوان مهم‌ترین عامل محدودکننده رشد در بسیاری از مناطق مورد توجه است. دانشمندان پیش‌بینی کرده‌اند که تا پایان قرن اخیر افزایش دمای کره زمین به میزان سه تا نه درجه سانتی‌گراد منجر به افزایش خشکی زمین‌های قابل کشت خواهد شد (Wang *et al.*, 2003).

در کشاورزی برای افزایش قدرت حاصلخیزی خاک و افزایش عملکرد گیاهان، عناصر موردنیاز به‌صورت مواد آلی و با روش‌های مختلف در اختیار آن‌ها قرار می‌گیرد. کودهای آلی، عناصر غذایی ضروری موردنیاز گیاه را به‌طور متعادل در خاک تأمین می‌کنند (Shaji *et al.*, 2021). این مواد آلی، دارای مزایایی می‌باشد، از جمله اینکه آب شویی و هدرروی عناصر غذایی را کاهش داده و به فرایند رهاسازی این عناصر کمک می‌کنند (Kirchmann, 2021)، همچنین رشد ریشه را به‌دلیل بهبود ساختمان خاک افزایش می‌دهند، مقدار ماده آلی و ظرفیت تبادلی خاک را افزایش می‌دهند (Kane *et al.*, 2021) و در نهایت، به‌عنوان منبعی برای رشد جانداران خاک بوده و افزایش عملکرد مفید خاک می‌شوند (Mahajan & Gupta, 2009).

در شرایط کمبود آب از مواد آلی می‌توان برای حفظ آب در خاک و جلوگیری از اثرات مخرب تنش خشکی به‌منظور افزایش عملکرد گیاهان استفاده نمود (Kang *et al.*, 2014). کاهش انتقال عناصر در گیاهان در شرایط تنش خشکی در خاک در برخی تحقیقات به ثبت رسیده است (Kang *et al.*, 2014; Kazemalilou *et al.*, 2021).

در بررسی اثر کودهای شیمیایی و آلی در تنش خشکی بابونه[1] نتایج نشان داد که کاربرد کود دامی و کمپوست در شرایط خشکی، سبب افزایش عملکرد شد (Ahmadia *et al.*, 2011). در بررسی اثرات متقابل تنش خشکی و مصرف کود آلی (سه منبع: کود مرغی، کمپوست و کود دامی) بر خصوصیات کمّی و کیفی همیشه‌بهار[2] گزارش‌شده که مصرف کود دامی مرغی می‌تواند ضمن کاهش اثرات منفی تنش خشکی، باعث افزایش میزان ماده مؤثره، عملکرد و وزن خشک گل شود (Massoud *et al.*, 2014).

با توجه به تغییرات جوی، لزوم تجدیدنظر در انتخاب محصولات قابل‌کشت در مناطق خشک و نیمه خشک امری ضروری است، همچنین باید برخی گیاهان با نیاز آبی پایین و کم‌توقع جایگزین گیاهانی حساس به کم آبیاری شوند. با توجه به این امر که ختمی گیاهی کم‌توقع است و در طبیعت و مناطق حاشیه‌ای رشد خوبی دارد، بنابراین به‌عنوان گونه‌ای مناسب جهت کشت در سیستم‌های کم نهاده می‌تواند به‌کار رود. بدین منظور، آزمایشی باهدف بررسی مقاومت به کم‌آبی ختمی و همچنین مقایسه بسترهای مختلف کشت بر مقاومت به تنش خشکی دو اکوتیپ ختمی انجام شد.

مواد و روش‌ها

این آزمایش به‌منظور بررسی سطح تحمل به تنش خشکی اکوتیپ‌های گیاه ختمی در بسترهای مختلف در مزرعه دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد به‌صورت آزمایش فاکتوریل (۴×۳×۲) بر پایه طرح کامل تصادفی اجرا شد. این آزمایش دارای ۲۴ تیمار و سه تکرار بود که عامل اول شامل سه تیمار خشکی (۸۰، ۶۰ و ۴۰ درصد ظرفیت زراعی) و عامل دوم شامل چهار بستر کشت (خاک مزرعه، خاک مزرعه و کود دامی، خاک مزرعه و شلتوک برنج کوبیده شده و خاک مزرعه و کاه و کلش گندم) بر روی دو اکوتیپ ختمی مشهد (اکوتیپ ُمشهد: در عرض جغرافیایی '۳۶°۲۰ N و '۵۹°۳۵ E و ارتفاع از سطح دریا ۱۰۵۰ متر) و اکوتیپ ُتهران' (اکوتیپ تهران: در عرض جغرافیایی '۱۸/۷ ۳۵°۵۴ N و '۵/۸ ۵۰°۵۳ E و ارتفاع از سطح دریا ۱۴۶۸ متر) اجرا شد.

بذرها در سینی‌های کشت محتوی مخلوط کوکوپیت، پرلایت و پیت در گلخانه با میانگین دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد و تحت فتوپریود ۱۴ ساعت روشنایی و ۱۰ ساعت تاریکی با شدت نور ۴۰۰ میکرومول در مترمربع در ثانیه در مردادماه کشت شده و سپس تمامی گیاهچه‌ها در مرحله ۵–۶ برگی در گلدان‌هایی (ارتفاع ۱۸ و قطر هشت سانتی‌متر) حاوی خاک مزرعه تا قبل از انتقال به مزرعه نگهداری شدند. گیاهان به مزرعه با چهار بستر متفاوت (خاک مزرعه، خاک مزرعه و کود دامی، خاک مزرعه و شلتوک، و خاک مزرعه و کاه و کلش گندم) منتقل شدند و در مرحله ظهور گل‌دهی به‌مدت یک ماه تحت تنش خشکی قرار گرفتند. به‌منظور ایجاد تنش خشکی پیش از اجرای آزمایش از خاک مورد استفاده در مزرعه نمونه‌برداری و خصوصیات فیزیکی و شیمیایی آن مورد بررسی قرار گرفت (جدول ۱).

به‌منظور کنترل دقیق میزان رطوبت خاک از دستگاه TDR استفاده شد. دو اکوتیپ به‌مدت یک ماه در معرض تنش خشکی قرار گرفتند و براساس معادله زیر میزان آب موردنیاز محاسبه شد:

$$Vw= \{(FC - \theta)(Bd \times D \times A)\} \quad (۱)$$

در این معادله، FC: درصد وزنی ظرفیت زراعی، θ: درصد وزنی رطوبت خاک، D: عمق توسعه ریشه (متر) Bd: جرم مخصوص ظاهری خاک (کیلوگرم بر مترمکعب)، A: مساحت هر کرت می‌باشد (Ahmadian *et al.*, 2011). آب مورد نظر تیمارهای آبیاری از طریق کنتور در اختیار گیاهان قرار گرفت.

1- *Matricaria chamomilla* L.

2- *Calendula officinalis* L.

در پایان آزمایش، تغییرات هدایت الکتریکی، pH، نیتروژن، پتاسیم، فسفر بسترهای خاکی محاسبه شد. شاخص کلروفیل (SPAD)، نشت الکترولیت (درصد)، محتوای نسبی آب (درصد)، پرولین (میکرومول بر گرم وزن تر)، کربوهیدرات (میلی‌گرم بر گرم وزن خشک) اندازه‌گیری شد. همچنین وزن خشک گیاه (گرم) اندازه‌گیری شد.

جدول ۱- خصوصیات فیزیکوشیمیایی خاک مورد استفاده در آزمایش

Table 1- Physicochemical properties of soil used in the experiment

Growth bed بستر کشت	هدایت الکتریکی EC (dS.m^{-1})	اسیدیته pH	نیتروژن N (%)	پتاسیم K (mg.kg^{-1})	فسفر P (mg.kg^{-1})
Field soil خاک مزرعه	1.93	7.15	0.065	235	23
Soil + manure خاک + کود حیوانی	2.53	7.76	0.42	343	2214
Soil + rrice hull خاک + شلتوک برنج	1.77	7.26	0.23	1592	271
soil + wheat straw خاک + کاه و کلش گندم	3.13	6.68	0.21	1572	117

سنجش نشت الکترولیت

بعد از اعمال تیمارهای خشکی، دیسک‌های برگی به قطر هشت میلی‌متر تهیه و به ویال‌های حاوی ۵۰ میلی‌لیتر آب دو بار تقطیر منتقل شدند. نمونه‌ها به‌مدت ۲۴ ساعت در دمای آزمایشگاه قرار داده شده و سپس، نشت اولیه با استفاده از دستگاه ECمتر (مدل Jenway) اندازه گیری شد (EC_1). سپس، ویال‌ها به‌مدت ۲۰ دقیقه در اتوکلاو (با فشار ۱/۲ بار و دمای ۱۲۰ درجه سانتی‌گراد) قرار داده شدند و بعد از ۲۴ ساعت، نشت نهایی (EC_2) اندازه‌گیری شد. درصد نشت الکترولیت‌ها با استفاده از معادله زیر محاسبه شد (Reddy *et al.*, 2004).

$$EL\%=\frac{EC1}{EC2}\times 100 \qquad (۲)$$

در این معادله، EL%، EC_1 و EC_2: به‌ترتیب نشان‌دهنده درصد نشت الکترولیت‌ها، نشت الکترولیت اولیه و نشت الکترولیت نهایی می باشند.

سنجش محتوای نسبی آب

برای ارزیابی محتوای نسبی آب برگ به‌ترتیب بعد از اعمال تنش خشکی، وزن تر برگ، وزن آماس و وزن خشک نمونه‌های برگی تهیه گردید. از گیاهان دیسک‌هایی با قطر هشت میلی‌متر تهیه و با استفاده از ترازو توزین گردیدند. سپس دیسک‌ها به‌مدت ۲۴ ساعت در دمای اتاق در داخل آب مقطر غوطه‌ور گردیده و پس از آن، وزن آماس آن‌ها اندازه‌گیری شد. سپس، نمونه‌ها را به‌مدت ۲۴ ساعت در دمای ۷۵ درجه سانتی‌گراد در داخل آون حرارت داده و وزن خشک آن‌ها تعیین گردید. در نهایت، محتوای نسبی آب برگ با استفاده از معادله ۳ محاسبه شد (Turner, 2018):

$$RWC\ (\%)=((FW-DW)/(TW-DW))\times 100 \qquad (۳)$$

در این معادله، FW: وزن تر برگ، DW: وزن خشک برگ، TW: وزن آماس برگ می‌باشد.

سنجش میزان پرولین

۰/۵ گرم از بافت برگ با پنج میلی‌لیتر اتانول ۹۵ درصد مخلوط و به‌شدت تکان داده شد. درنهایت ۱۵ میلی‌لیتر از عصاره به‌دست‌آمده را با سانتریفوژ ۴۵۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شد. یک میلی‌لیتر از عصاره الکلی همراه با ۱۰ میلی‌لیتر آب دو بار تقطیر با پنج میلی‌لیتر نین‌هیدرین به مخلوط اضافه گردید. در مرحله بعد، پنج میلی‌لیتر اسید استیک گلاسیال به هر نمونه اضافه شد و نمونه داخل حمام آب جوش به‌مدت ۴۵ دقیقه قرارداد شد. به هر نمونه ۱۰ میلی‌لیتر تولوئن اضافه و سپس میزان جذب نور نمونه‌ها در طول موج ۵۱۵ نانومتر با استفاده از اسپکتروفتومتر قرائت گردید. منحنی کالیبراسیون با استفاده از استاندارد ال پرولین رسم و میزان پرولین آزاد نمونه‌ها براساس میکرومول بر گرم وزن تر برگ محاسبه شد (Bates *et al.*, 1973).

اندازه‌گیری کربوهیدرات

میزان کربوهیدرات به‌روش پیشنهادی مک کردی و همکاران (McCready *et al.*, 1950) اندازه‌گیری شد. در پایان تنش خشکی، نمونه‌های برگ به‌مدت ۷۲ ساعت در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد خشک شدند و ۱۰۰ میلی‌گرم از پودر خشک نمونه‌ها مورد استفاده قرار گرفت، به آن ۲۵ میلی‌لیتر اتانول ۸۰ درصد افزوده شد و توسط شیکر مخلوط

گردید. پس از سانتریفیوژ در ۳۵۰۰ دور در دقیقه به‌مدت ۱۰ دقیقه، محلول رویی جدا شده و توسط آب مقطر به حجم ۱۰۰ میلی‌لیتر رسانده شد. پس از این مرحله، به یک میلی‌لیتر از روشناوری محلول مذکور ۱۰ میلی‌لیتر محلول آنترون ۰/۱۵ درصد افزوده شد و در نهایت، نمونه‌ها در دمای ۹۵ درجه سلسیوس حرارت داده شده، بلافاصله به حمام یخ منتقل شدند. آنگاه میزان جذب نور نمونه‌ها، توسط دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۶۲۵ نانومتر خوانده و ثبت شده و غلظت قند کل نمونه‌ها با استفاده از منحنی استاندارد گلوکز براساس میلی‌گرم بر گرم وزن خشک محاسبه شد (Ebell, 1969).

تجزیه و تحلیل آماری

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار JMP 13.2 انجام و رسم شکل‌های مربوط به آن‌ها، توسط نرم‌افزار Excel صورت گرفت. مقایسه میانگین داده‌ها نیز با استفاده از آزمون LSD در سطح احتمال پنج درصد انجام شد.

نتایج و بحث

اثرات متقابل اکوتیپ، تنش خشکی و بسترهای کشت بر تغییرات عناصر خاک مزرعه شامل نیتروژن، فسفر و پتاسیم در پایان آزمایش معنی‌دار نشد (جدول ۲)، امّا تغییرات نیتروژن خاک تحت اثرات متقابل اکوتیپ با خشکی، اکوتیپ با بسترهای کشت و تنش خشکی با بستر کشت قرار گرفت. بیشترین تغییرات نیتروژن در اکوتیپ مشهد تحت تنش خشکی ۸۰ درصد ظرفیت زراعی به ثبت رسید و تفاوت معنی‌داری بین اکوتیپ‌ها در تنش خشکی ۴۰ درصد ظرفیت زراعی مشاهده نشد (شکل ۱ الف). اثرات متقابل تنش خشکی و بستر کشت نشان داد که میزان نیتروژن در بسترهای خاک + کود حیوانی، خاک + شلتوک برنج، خاک + کاه و کلش در طول آزمایش روندی افزایشی داشت، امّا در بستر خاک میزان نیتروژن خاک روندی نزولی داشت (شکل ۱ ب)، از طرفی نتایج متقابل اکوتیپ و بستر کشت نشان داد که میزان نیتروژن خاک هر دو اکوتیپ در تمامی بسترها به‌جز بستر خاکی روندی صعودی داشت (شکل ۱ ج). تغییرات فسفر به‌طور معنی‌داری تحت اثرات متقابل تنش خشکی و بستر کشت قرار گرفت (جدول ۲). در تمامی بسترهای کشت تحت تنش، بر میزان فسفر خاک در پایان آزمایش افزوده شد و بیشترین میزان فسفر در سه تنش خشکی در بستر خاک + کود حیوانی مشاهده شد (شکل ۱ د).

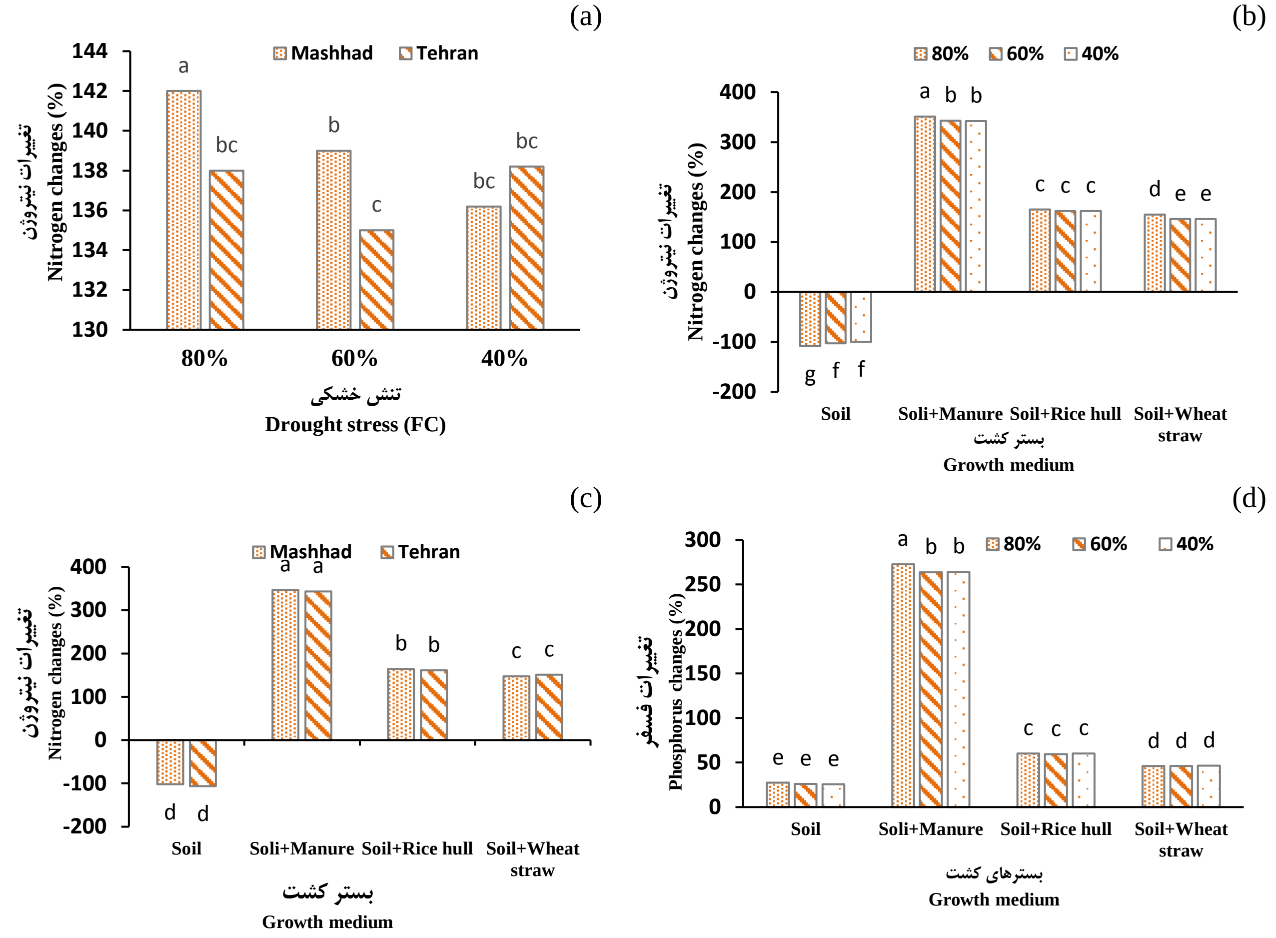
جدول ۲- تجزیه واریانس اثرات بسترهای کشت و تیمارهای آبیاری بر روی صفات ختمی

Table 1- ANOVA for the effects of growth medium and irrigation treatments on the characteristics of Hollyhock

منابع تغییر S.O.V	درجه آزادی df	میانگین مربعات Mean squares: تغییرات نیتروژن خاک Soil nitrogen changes	تغییرات فسفر خاک Soil phosphore changes	تغییرات پتاسیم خاک Soil potassium changes	تغییراتpH pH changes	تغییرات EC EC changes
اکوتیپ Ecotype (E)	1	50^{ns}	1800**	64**	0.001^{ns}	815152**
خشکی Drought (D)	2	99**	54*	346**	0.0284**	298771**
بستر کشت Growth medium (GM)	2	613134**	226462**	530568**	0.231**	6115869**
اکوتیپ × خشکی E × D	2	64*	0.000001 ^{ns}	2 ^{ns}	0.002**	1636 ^{ns}
اکوتیپ × بستر کشت E × GM	2	50*	0.000001 ^{ns}	310**	0.033**	122568**
اکوتیپ × خشکی × بستر کشت GM × D	6	123**	26*	944**	0.350**	107519**
E × D × GM	6	1^{ns}	0.000001 ^{ns}	4 ^{ns}	0.034**	16034 ^{ns}
خطا Error	48	17	13	26	0.0003	16152

ns، ** و * به‌ترتیب عدم معنی‌داری، و معنی‌داری در سطح احتمال ۱ و ۵ درصد.

ns, ** and *: non-significant, and significant at $p\leq 0.01$ and $p\leq 0.05$, respectively



شکل ۱- اثرات متقابل اکوتیپ × تنش خشکی (a)، بستر کشت × تنش خشکی (b)، اکوتیپ × بستر کشت (c) بر تغییرات نیتروژن و اثر متقابل بستر کشت × تنش خشکی (d) بر میزان فسفر بسترها در گیاه ختمی

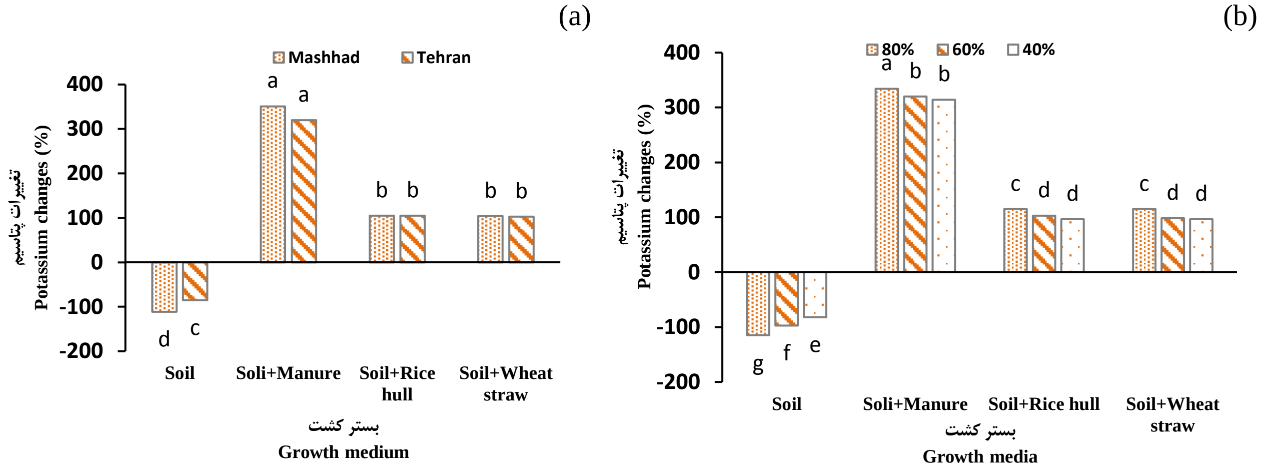
Figure 1- The interaction effects of ecotype ×drought stress (a), growth medium ×drought stress (b), ecotype ×growth medium (c) on nitrogen changes and the interaction effect of growth medium ×drought stress (d) on the phosphorus content of the growth medium in Hollyhock plant

تیمارهای آزمایش: تنش خشکی (۸۰، ۶۰ و ۴۰ درصد ظرفیت زراعی)، اکوتیپ (مشهد و تهران)، و بسترهای کشت (خاک مزرعه، خاک + کود حیوانی، خاک + شلتوک، و خاک + کاه و کلش گندم)

Experimental treatments: drought stress (80, 60, and 40% FC), ecotype (‘Mashhad’ and ‘Tehran’), and growth medium (soil, soil + manure, soil + rice hull, and soil + wheat straw) (LSD, $p \leq 0.05$)

میزان پتاسیم نیز تحت اثرات متقابل اکوتیپ با بستر کشت و تنش خشکی با بستر کشت قرار گرفت (جدول ۲). در هر دو اکوتیپ در تمامی بسترهای کشت به‌جز بستر خاکی میزان پتاسیم افزایش یافت و بیشترین میزان پتاسیم در هر دو اکوتیپ در بستر خاک + کود حیوانی مشاهده شد (شکل ۲ الف). میزان پتاسیم در تمامی بسترهای تحت تنش به‌جز بستر خاکی در پایان آزمایش افزایش یافت، امّا در همه بسترها با افزایش تنش خشکی از ۸۰ به ۴۰ درصد ظرفیت زراعی میزان پتاسیم خاک کاسته شد (شکل ۲ ب).

اثر اکوتیپ و بسترهای کشت بر شوری خاک معنی‌دار بود (جدول ۲). در هر دو اکوتیپ در همه بسترهای کشت میزان شوری خاک افزوده شد، بین دو اکوتیپ علاوه‌بر بستر خاکی در بستر خاک + کود حیوانی تفاوت معنی‌داری از نظر شوری خاک مشاهده نشد (شکل ۳).

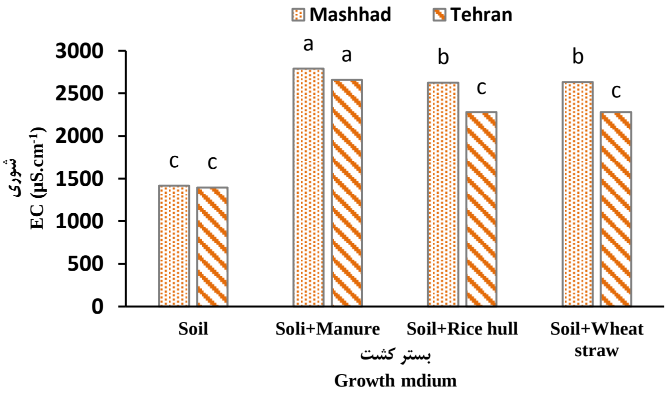


شکل ۲- اثر متقابل اکوتیپ × بستر کشت (a)، بستر کشت × تنش خشکی (b) بر تغییرات پتاسیم بسترها در گیاه ختمی

Figure 2- The interaction effect of ecotype ×growth medium (a), growth medium ×drought stress (b) on the potassium changes of growth medium in Hollyhock plant

تیمارهای آزمایش: تنش خشکی (۸۰، ۶۰ و ۴۰ درصد ظرفیت زراعی)، اکوتیپ (مشهد' و تهران')، و بسترهای کشت (خاک مزرعه، خاک + کود حیوانی، خاک + شلتوک، و خاک + کاه و کلش گندم)

Experimental treatments: drought stress (80, 60, and 40% FC), ecotype (‘Mashhad’ and ‘Tehran’), and growth medium (soil, soil + manure, soil + rice hull, and soil + Wheat straw) (LSD, $p\leq 0.05$)



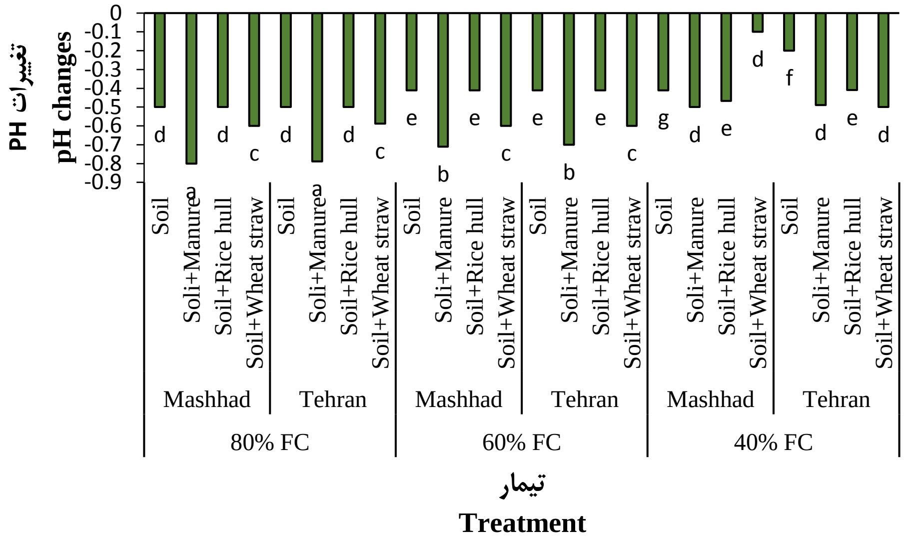
شکل ۳- اثر متقابل اکوتیپ × بستر کشت بر شوری بسترها

Figure 3- The interaction effect of ecotype ×growth medium on the salinity of substrates

تیمارهای آزمایش: اکوتیپ (مشهد' و تهران') و بسترهای کشت در گیاه ختمی (خاک مزرعه، خاک + کود حیوانی، خاک + شلتوک، و خاک + کاه و کلش گندم)

Experimental treatments: Ecotype (‘Mashhad’ and ‘Tehran’), and growth medium in Hollyhock plant (soil, soil + manure, soil + rice hull, and soil + Wheat straw) (LSD, $p\leq 0.05$)

اثر اکوتیپ، تنش خشکی و بسترهای کشت بر میزان تغییرات pH خاک معنی‌دار بود (جدول ۲)، در همه تیمارهای مورد آزمایش میزان اسیدیته خاک افزایش یافت. به‌نحوی‌که در هر دو اکوتیپ تحت تیمار ۸۰ درصد ظرفیت زراعی در بستر خاک + کود حیوانی بیشترین تغییرات pH مشاهده شد. در هر دو اکوتیپ تحت تنش‌های خشکی میزان تغییرات اسیدیته بسترهای خاک + کود حیوانی، خاک + شلتوک برنج نسبت به بستر خاکی بیشتر بود (شکل ۴).



شکل ٤- اثر تنش خشکی بر pH بسترهای کشت اکوتیپ‌های ختمی

Figure 4- The effect of drought stress on pH of growth medium in Hollyhocks

آزمایش: تنش خشکی (۸۰، ۶۰ و ۴۰ درصد ظرفیت زراعی)، اکوتیپ (مشهد و تهران)، و بسترهای کشت (خاک مزرعه، خاک + کود حیوانی، خاک + شلتوک، و خاک + کاه و کلش گندم)

Experimental treatments: drought stress (80, 60, and 40% FC), ecotype (‘Mashhad’ and ‘Tehran’), and growth medium (soil, soil + manure, soil + rice hull, and soil + Wheat straw) (LSD, $p\leq 0.05$)

در تحقیقی کاربرد اثرات کود آلی (کود گاوی، مرغی، خاک اره)، کود شیمیایی حاوی (اوره + سوپر فسفات و کلراید پتاسیم) بر درخت لاله (*Liriodendron tulipifera*) مورد بررسی قرار گرفت و نتایج نشان داد که در کاربرد کود آلی، میزان نیتروژن، فسفر و پتاسیم بستر کشت بیشتر از بسترهای حاوی کود شیمیایی بود، از طرفی میزان اسیدیته بستر کشت در پایان آزمایش قلیایی شد و شوری بستر کشت در مقایسه با شاهد افزایش یافت (Han *et al.*, 2016). در آزمایش حاضر نیز بیشترین تغییرات میزان عناصر ماکرو در بستر خاک + کود حیوانی مشاهده شد و همچنین، بر میزان شوری و اسیدیته بسترهای کشت افزوده شد. با کاربرد کود حیوانی و تجزیه آن در خاک، دی‌اکسیدکربن تولیدشده در اثر حل شدن این گاز در آب خاک، اسید کربنیک تولید می‌شود که باعث کاهش واکنش خاک می‌گردد، از طرفی مواد آلی حاوی اسیدهای آلی می‌باشد و افزودن این مواد به‌طور مستقیم باعث تغییراتی در واکنش خاک می‌شود (Ajoudan, 2005)، همچنین کاهش واکنش خاک در بسترهای آلی در مقایسه با خاک به‌دلیل ترشح یون‌های پروتون نیز می‌باشد (Marschner, 1995) که مطابق با آزمایش اخیر بود و نتایج نشان داد که در بسترهای حاوی خاک + کود حیوانی، میزان واکنش خاک در پایان آزمایش کاهش یافت. با تجزیه مواد آلی در خاک، یون‌های حاصل از تجزیه به محلول خاک وارد شده و در نتیجه، موجب افزایش شوری خاک گردید که مطابق با نظر خادم و همکاران (Khadem *et al.*, 2014) بود. در بررسی EC خاک، نتایج نشان داد که در بستر کود حیوانی با واکنش خاک کمتر در تنش خشکی، EC خاک افزایش یافته است. رابطه معکوس واکنش خاک و EC به دلیل افزایش میزان یون هیدروژن است (Najafi & Mardomi, 2013) و با توجه به اینکه یون هیدروژن بیشترین هدایت اکی‌والانی را در بین یون‌ها دارد، سبب افزایش EC خاک می‌گردد. از طرفی، کاهش واکنش خاک سبب حل شدن و آزادسازی یون‌های مختلف به محلول خاک می‌شود که نهایتاً افزایش EC حاصل می‌گردد (Najafi & Parsazadeh, 2011).

براساس نتایج تجزیه واریانس، شاخص کلروفیل گیاهان به‌طور معنی‌داری تحت اثرات متقابل تنش خشکی، اکوتیپ و بستر کشت قرار گرفت (جدول ۳). بیشترین شاخص کلروفیل در اکوتیپ مشهد تحت تیمار آبیاری ۸۰ درصد ظرفیت زراعی در بسترهای خاک + کود حیوانی (۶۹) و کمترین میزان این شاخص در اکوتیپ مشهد تحت تیمار ۴۰ درصد در بستر خاک مزرعه (۴۱) مشاهده شد. در تمامی تیمارهای آبیاری در هر دو اکوتیپ، کمترین میزان این شاخص در بستر حاوی خاک مزرعه مشاهده شد و با افزایش تنش خشکی روندی نزولی در این شاخص به ثبت رسید (شکل ۵).

جدول ۳- تجزیه واریانس اثرات بسترهای کشت و تیمارهای آبیاری بر صفات فیزیولوژیکی و مورفولوژیکی ختمی

Table 3- ANOVA for the effects of growth mediums and irrigation treatments on physiological and morrphologican traits of hollyhock

منابع تغییر S.O.V	درجه آزادی df	میانگین مربعات Mean squares					
		شاخص کلروفیل SPAD	نشت الکترولیت Electrolyte leakage	محتوای نسبی آب RWC	پرولین Proline	کربوهیدرات Carbohydrate	وزن خشک Dry weight
اکوتیپ Ecotype (E)	1	280**	144**	337**	0.521**	106.6**	33.2**
خشکی Drought (D)	2	672**	792**	148**	4.622**	12.2**	20.2**
بستر کشت Growth medium (GM)	2	551**	251**	33**	2.287**	90.50**	241**
اکوتیپ× خشکی E × D	2	23**	15**	0.161 ^{ns}	0.0040 **	26.1**	2.31**
اکوتیپ × بستر کشت E × GM	2	13**	32**	0.186 ^{ns}	0.0001 ^{ns}	0.140**	0.212 ^{ns}
اکوتیپ × خشکی × بستر کشت GM× D	6	3**	93**	3.514**	0.547**	2.28**	0.778**
E × D × GM	6	9**	32**	0.374*	0.0001 ^{ns}	0.159*	0.635**
خطا Error	48	0.172	0.1	0.161	0.0001	0.055	0.192

ns، ** و * به‌ترتیب عدم معنی‌داری، و معنی‌داری در سطح احتمال ۱ و ۵ درصد.

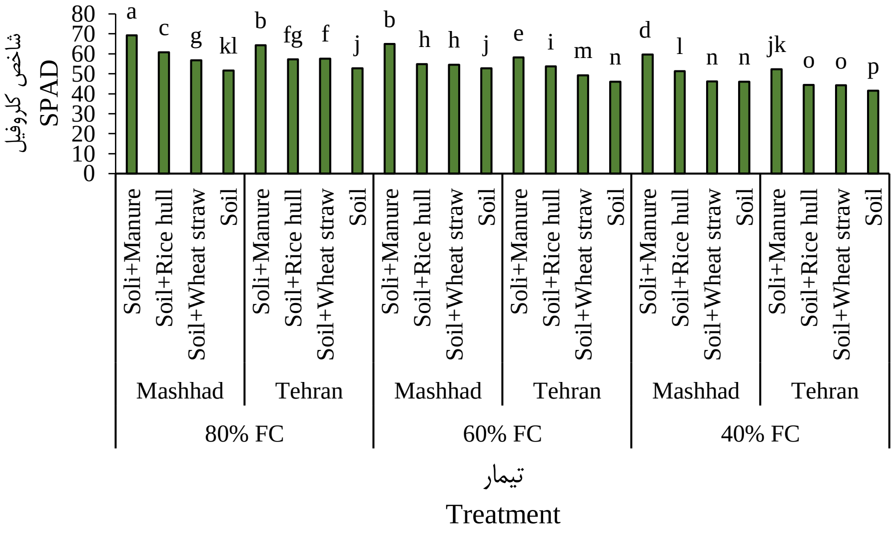
^{ns}, ** and *: non-significant, and significant at $p \leq 0.01$ and $p \leq 0.05$, respectively

در گیاهان تحت تنش بیشتر، کمبود عناصر غذایی و کاهش منبع انرژی جذب نور خورشید منجر به آسیب به سیستم فتوسنتز و کلروفیل می‌گردد، زیرا عناصر غذایی نقش مهمی در سیستم انتقال الکترون و متابولیسم کربن دارند (Luciano-Mateo *et al.*, 2017) که نتایج آزمایش فوق مطابق با این موضوع می‌باشد، زیرا کمترین میزان شاخص نسبی کلروفیل در تیمار خشکی ۴۰ درصد ظرفیت زراعی در بستر خاکی به ثبت رسید. کاربرد کودهای حاوی ۱۰ گرم نیتروژن و کودهای حاوی هشت گرم فسفر بر افزایش کلروفیل و کاروتنوئید گیاه افرای شیردار (*Acer mono*) مؤثر بودند (Razaq *et al.*, 2017)، زیرا افزایش نیتروژن بر تشکیل رنگدانه‌های فتوسنتزی از طریق پروتئین‌های تیلاکوئیدی و روزنه‌ای مؤثر هستند (Teixeira Filho *et al.*, 2011; Peng *et al.*, 2021). خصوصیات بیوشیمیایی و بیوسنتزی رنگدانه‌های فتوسنتزی علاوه‌بر نیتروژن به فسفر نیاز دارد. بنابراین، کاهش فسفر سبب کاهش میزان پروتئین و محتوای کلروفیل می‌شود (Mohamed *et al.*, 2021). در آزمایش حاضر، همبستگی مثبتی بین میزان نیتروژن و پتاسیم با میزان شاخص کلروفیل وجود دارد به‌نحوی‌که با کاربرد بستر خاکی همراه با کود حیوانی با افزایش میزان عناصر در خاک، در گیاهان تحت تیمار آبیاری ۸۰ درصد ظرفیت زراعی میزان جذب این عناصر افزایش یافته است و به تبع آن این عناصر در برگ گیاهان نیز در مقایسه با تیمارهای دیگر آبیاری بیشتر بوده است.

نشت الکترولیت، محتوای نسبی آب و کربوهیدرات به‌طور معنی‌داری تحت اثرات متقابل تنش خشکی، اکوتیپ و بستر کشت قرار گرفتند (جدول ۳). بیشترین نشت الکترولیت در اکوتیپ تهران تحت تیمار ۴۰ درصد ظرفیت زراعی و بستر کشت خاکی (۵۵ درصد) و کمترین آن در اکوتیپ مشهد تحت تیمار ۸۰ درصد ظرفیت زراعی و بسترهای کشت خاک + کود حیوانی و خاک + شلتوک برنج (۲۷ درصد) به ثبت رسید. با افزایش تنش خشکی در تمامی بسترها، نشت الکترولیت در دو اکوتیپ افزایش یافت، به‌نحوی‌که با افزایش تنش خشکی از ۸۰ به ۴۰ درصد ظرفیت زراعی در اکوتیپ مشهد و بستر خاک + کود، درصد نشت الکترولیت ۲۳ و در بستر خاک این شاخص ۵۸ درصد افزایش یافت (شکل ۶ الف).

مقایسه میانگین داده‌های محتوای نسبی آب گیاهان نشان داد که این شاخص در اکوتیپ مشهد نسبت به تهران تحت تیمارهای ۸۰ درصد ظرفیت زراعی در بستر خاک + کود حیوانی شش درصد افزایش یافت. بیشینه این شاخص در اکوتیپ مشهد تحت تیمار آبیاری ۸۰ درصد ظرفیت زراعی با بسترهای کشت: خاک + کود حیوانی (۷۳

درصد) و کمترین محتوای نسبی آب برگ در اکوتیپ تهران کشت شده در بستر خاکی تحت تیمار ۴۰ درصد ظرفیت زراعی (۶۰ درصد) به ثبت رسید. با کاهش آبیاری تا ۴۰ درصد ظرفیت زراعی محتوای نسبی آب برگ‌ها در اکوتیپ مشهد و تهران در بستر خاکی به‌ترتیب، ۵ و ۶ درصد کاهش یافت (شکل ۶ ب). محتوای نسبی آب برگ‌ها با افزایش تنش خشکی کاهش می‌یابد (Altaf *et al.*, 2021). حیدری و همکاران (Heidari *et al.*, 2014) تأثیر تنش خشکی را بر صفات آنیسون مورد بررسی قرار دادند و محتوای نسبی آب، شاخص محتوای کلروفیل، هدایت روزنه‌ای، سرعت فتوسنتز و در شرایط تنش خشکی به‌طور معنی‌داری کاهش یافت.



شکل ۵- اثر تنش خشکی بر شاخص کلروفیل اکوتیپ‌های ختمی تحت بسترهای مختلف

تیمارهای آزمایش: تنش خشکی (۸۰، ۶۰ و ۴۰ درصد ظرفیت زراعی)، اکوتیپ (مشهد و تهران) و بسترهای کشت (خاک مزرعه، خاک + کود حیوانی، خاک+شلتوک، و خاک + کاه و کلش گندم).

Figure 5- The effect of drought stress on the SPAD readings of Hollyhocks ecotypes under different growth media

Experimental treatments: drought stress (80, 60, and 40% FC), ecotype (‘Mashhad’ and ‘Tehran’), and growth medium (soil, soil + manure, soil + rice hull, and soil + Wheat straw) (LSD, $p \leq 0.05$)

دلیل اصلی افزایش تخفیف تنش خشکی در حضور نیتروژن و پتاسیم، تنظیمات اسمزی و حفظ محتوای نسبی آب می‌باشد (Fanaei *et al.*, 2009; Mehregan *et al.*, 2017). کاربرد ۱۰ میلی‌مولار پتاسیم نیترات بر نارنج (*Citrus aurantium*) نسبت به شاهد، محتوای نسبی آب را ۶۸ درصد افزایش داد (Rafie *et al.*, 2016). پاسخ‌های مشابهی از کودهای پتاسیمی در گیاه آلترناترا (Mehregan *et al.*, 2018) و چای ترش (Besharati *et al.*, 2021) تحت تنش خشکی گزارش‌شده است. در بررسی دو اکوتیپ نتایج نشان داد که محتوای نسبی آب برگ‌های اکوتیپ مشهد در مقایسه با اکوتیپ تهران در تیمارهای مختلف بیشتر بود، از طرفی در هر دو اکوتیپ با افزایش تنش خشکی از ۸۰ به ۴۰ درصد ظرفیت زراعی، از میزان محتوای نسبی آب گیاهان کاسته شد. محتوای نسبی آب برگ گیاهان با بسترهای کود حیوانی در مقایسه با دیگر بسترها، با افزایش جذب عناصری نظیر نیتروژن بیشتر بود و کمترین میزان محتوای نسبی آب برگ‌ها در گیاهان بستر خاکی به ثبت رسید.

بیشترین کربوهیدرات در اکوتیپ مشهد تحت تیمار ۴۰ درصد ظرفیت زراعی و بستر کشت خاک + کود حیوانی (۸۰ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک) و کمترین آن در اکوتیپ تهران و بسترهای کشت خاکی (۷۰ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک) به ثبت رسید. با افزایش تنش خشکی از ۸۰ به ۴۰ درصد ظرفیت زراعی در اکوتیپ تهران و بستر خاک + کود حیوانی، کربوهیدرات سه درصد و در بستر خاک + شلتوک برنج، تنها ۱/۵ درصد افزایش یافت (شکل ۶ ج).

گیاهان تحت تنش خشکی با افزایش میزان جذب آب و کاهش هدررفت آب (بستن روزنه‌ها و برگ‌های کوچک‌تر) از صدمات بیشتر جلوگیری می‌نمایند. هنگامی‌که میزان فتوسنتز برای گیاه پاسخگو نمی‌باشد، کربوهیدرات‌ها شروع به شکستن می‌نمایند که منجر به حفظ تنظیمات اسمزی در سلول می‌شوند (Jie *et al.*, 2010). عناصر غذایی

در تنش خشکی بر میزان کربوهیدرات‌ها به‌عنوان ماده تنظیم اسمزی نقش مهمی دارند و اثر تنش خشکی را تخفیف می‌دهند. تجمع پتاسیم در واکوئل همراه با ساکارز سبب حفظ فشار تورژسانس و اسمزی می‌شود و در جذب آب در گیاهان مؤثر می‌باشد (Ajoudan, 2005)، از طرفی در شرایط تنش خشکی با بالا نگه‌داشتن pH سلولی مانع آسیب به کلروپلاست می‌گردد. تحت تنش خشکی افزایش نیاز به پتاسیم برای تثبیت دی‌اکسیدکربن در فتوسنتز، حفاظت از کلروپلاست در برابر آسیب‌های اکسیداتیو، جلوگیری از اختلال و متابولیسم کربوهیدرات برای گیاه بیشتر می‌شود (Jie *et al*., 2007). تأثیر کمبود پتاسیم نه‌تنها به‌دلیل اختلال در هدایت روزنه‌ای است، بلکه به‌دلیل کاهش فعالیت مخزن‌ها و آسیمیلاسیون کربوهیدرات به‌دلیل کاهش رشد می‌باشد (Bahrami-Rad & Hajiboland, 2017). کمبود پتاسیم در صورت کاهش هدایت هیدرولیکی ریشه و آب کافی در طی رشد عملکرد گیاهان را کاهش می‌دهد (Wang *et al*., 2013). میزان قندهای محلول در ریشه و اندام هوایی گیاه نوروزک[1] در گیاهان تحت تنش همراه با کاربرد پتاسیم افزایش یافت، افزایش میزان قندها و پتاسیم در گیاهان تحت تنش نوعی مکانیسم دفاعی در این گیاه می‌باشد (Reddy *et al*., 2014).

در آزمایش اخیر، گیاهان در بسترهای خاک + کود حیوانی میزان کربوهیدرات برگ‌های اکوتیپ تهران را در آبیاری ۴۰ درصد ظرفیت زراعی نسبت به ۸۰ درصد ظرفیت زراعی با جذب عناصر غذایی بیشتر از خاک و به تبع آن عناصر بیشتر در برگ، ثابت نگه داشتند و همبستگی میزان کربوهیدرات و عنصر نیتروژن این نتایج را اثبات می‌نماید. از طرفی، گیاهان در تیمار ۴۰ درصد ظرفیت زراعی از افزایش کربوهیدرات به‌منظور تنظیمات اسمزی و همچنین، به‌عنوان سیستمی در جهت مقاومت در برابر تنش خشکی بهره گرفتند.

میزان پرولین به‌طور معنی‌داری تحت اثرات متقابل تنش خشکی و اکوتیپ، تنش خشکی و بستر کشت قرار گرفت (جدول ۳)، به‌نحوی‌که پرولین، با کاهش آبیاری از ۸۰ به ۴۰ درصد ظرفیت زراعی در هر دو اکوتیپ روندی صعودی داشت. بیشترین و کمترین میزان پرولین به‌ترتیب، در اکوتیپ مشهد تحت تیمار ۴۰ درصد ظرفیت زراعی و اکوتیپ تهران تحت تیمار ۸۰ درصد ظرفیت زراعی به ثبت رسید (شکل ۷ الف). در بررسی اثر بسترهای کشت بر این شاخص در هر چهار بستر با افزایش تنش خشکی، میزان پرولین برگ‌ها افزایش یافت و بیشترین این شاخص در بستر خاک + کود حیوانی در تیمار ۴۰ درصد ظرفیت زراعی (۲/۰۵۲ میکرومول بر گرم وزن تر) مشاهده شد (شکل ۷ ب).

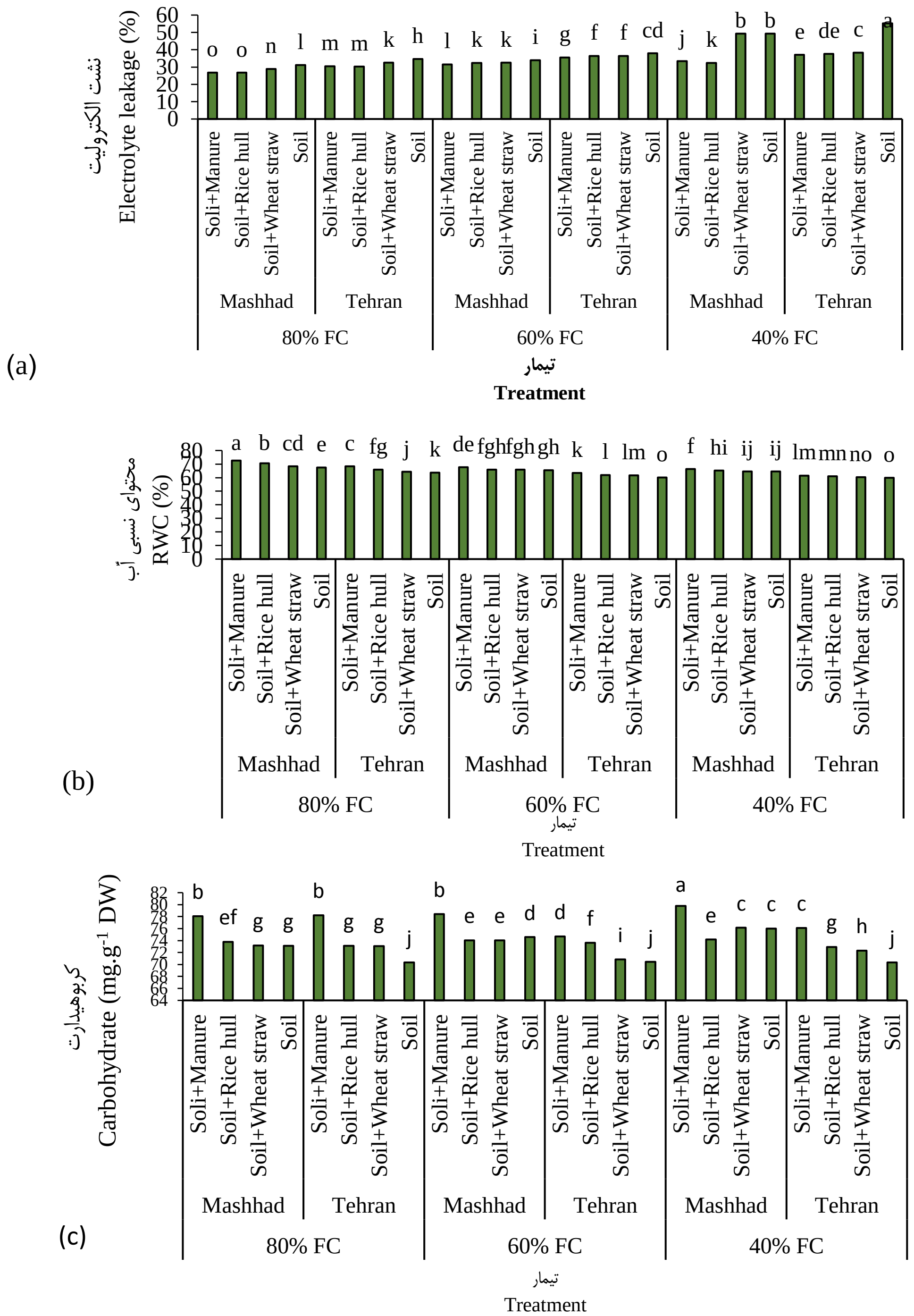
گیاهان به‌منظور کاهش اثرات تنش خشکی در اثر آسیمیلاسیون نیترات از تنظیمات اسمزی استفاده می‌نمایند که تجمع پرولین نقش مهمی در تنظیم اسمزی دارد (Cui *et al*., 2021). قبادی و همکاران (Ghobadi *et al*., 2013) در آزمایشی نشان دادند که رقم‌های مختلف آفتابگردان پاسخ‌های مختلفی به تنش خشکی می‌دهند و ارقام مقاوم‌تر در شرایط تنش با میزان پرولین و کاروتنوئید بیشتر به‌عنوان تنظیم‌کننده‌های اسمزی نسبت به ارقام حساس‌تر متمایز شدند. جعفری و همکاران (Jafari *et al*., 2019) در دو رقم شب بو[2] نشان دادند که تجمع ترکیبات اسمولیتی نظیر پرولین در رقم مقاوم‌تر بیشتر از رقم حساس‌تر تحت تنش خشکی بود. از طرفی، پتاسیم با کاهش پتانسیل آب برگ فشار تورژسانس را حفظ می‌نماید (Cakmak, 2005). کاربرد پتاسیم نیترات نسبت به شاهد، سبب محتوای نسبی آب و با حفظ تنظیمات اسمزی سبب تجمع پرولین می‌شود (Gong *et al*., 2011). حضور عناصر نیتروژن و پتاسیم با حفظ تنظیمات اسمزی باعث تجمع پرولین می‌شوند (Rafie Rad *et al*., 2016; Maijd *et al*., 2021). در آزمایش حاضر، میزان پرولین در اکوتیپ مشهد بیشتر بود و در هر دو اکوتیپ با افزایش تنش خشکی افزایش یافت، از طرفی در خاک گیاهان حاوی بستر کشت کود حیوانی مشخص شد که تغییرات میزان نیتروژن نسبت به بسترهای دیگر تحت تنش خشکی، بالاتر است که با افزایش جذب این عناصر، باعث افزایش تجمع پرولین و تعادل تنظیمات اسمزی می‌شود (Bahrami-Rad & Hajiboland, 2017)).

در تیمار ۸۰ درصد ظرفیت زراعی، بیشترین وزن خشک در اکوتیپ مشهد و بستر کشت خاک + کود حیوانی (۹۴/۵ گرم) به ثبت رسید، کاربرد خاک مزرعه به‌تنهایی در هر دو اکوتیپ، وزن خشک گیاهان را در همه تیمارهای آبیاری کاهش داد. در دو تیمار آبیاری دیگر نیز روندی مشابه مشاهده شد و کمترین وزن خشک گیاه در اکوتیپ تهران تحت تیمار ۴۰ درصد ظرفیت زراعی و بسترهای خاک + کاه و کلش و بستر خاک مزرعه (۸۳ گرم) به ثبت رسید (شکل ۸).

کاهش سطح برگ در شرایط تنش خشکی شدید در بستر خاکی سبب کاهش میزان فتوسنتز و کاهش آسیمیلاسیون کربن می‌گردد، در نتیجه منجر به کاهش وزن خشک گیاه می‌شود (Ors *et al*., 2021). نیتروژن اثر منفی تنش خشکی را بر وزن خشک گیاهان از طریق افزایش توانایی فتوسنتز با به دام انداختن کربن، افزایش فعالیت آنزیم روبیسکو و افزایش سنتز و انتقال ماده خشک کاهش می‌دهد (Xu *et al*., 2020). محققین نشان دادند که با کمبود نیتروژن و فسفر در بستر گل لزیانتوس، وزن خشک شاخه به ریشه کاهش یافت (Chen *et al*., 2018).

1- *Salvia leriifolia* Benth

2-*Matthiola incana* L.

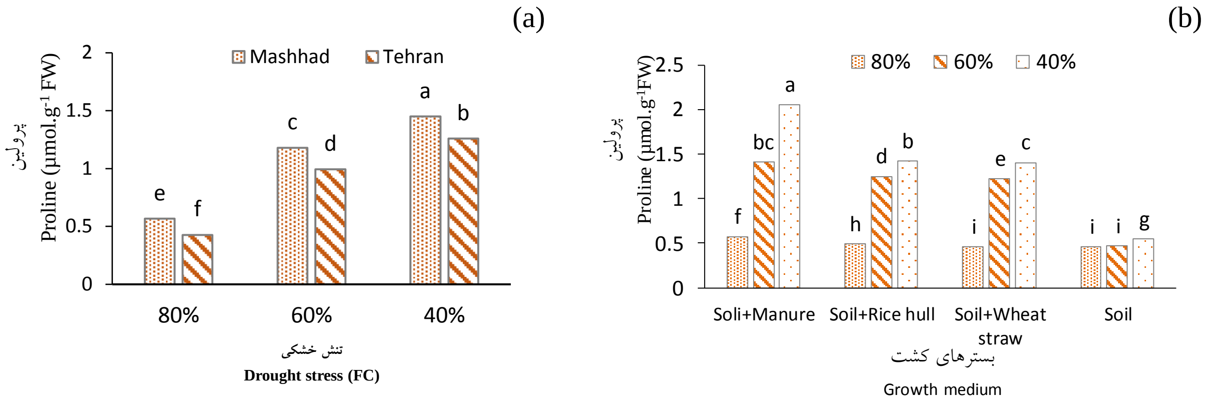


شکل ٦- اثرات تنش خشکی بر نشت الکترولیت (a)، محتوای نسبی آب (b) و کربوهیدرات (c) اکوتیپ‌های ختمی تحت بسترهای مختلف

تیمارهای آزمایش: تنش خشکی (۸۰، ۶۰ و ۴۰ درصد ظرفیت زراعی)، اکوتیپ (مشهد و تهران)، و بسترهای کشت (خاک مزرعه، خاک + کود حیوانی، خاک + شلتوک، خاک + کاه و کلش گندم).

Figure 6- The effects of drought stress on the electrolyte leakage (a), water relative content (b) and carbohydrate (c) of Hollyhock ecotypes under different substrates

Experimental treatments: drought stress (80, 60 and 40% FC), ecotype (‘Mashhad’ and ‘Tehran’), and growth medium (soil, soil + manure, soil + rice hull, soil + wheat straw) (LSD, $p \leq 0.05$).

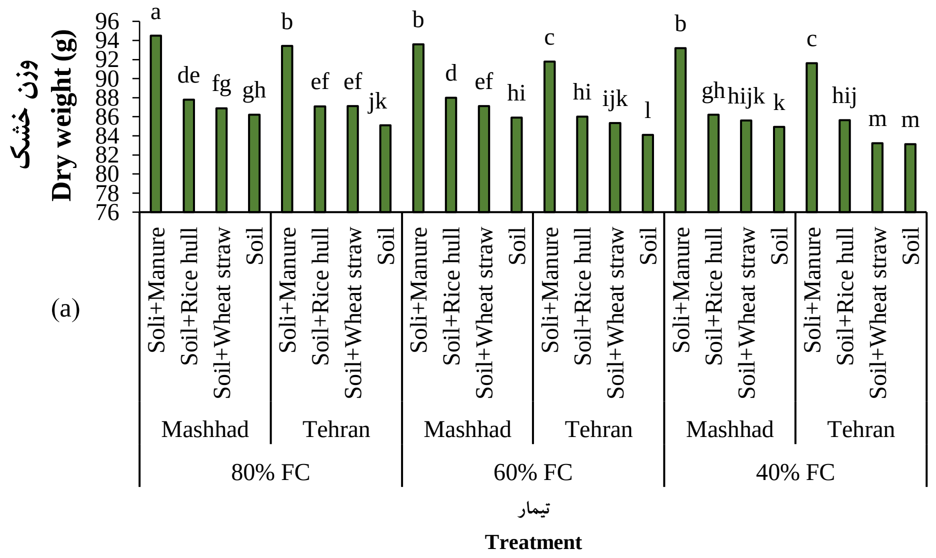


شکل ۷- اثر تنش خشکی اکوتیپ‌های ختمی (a) و اثر متقابل تنش خشکی × بستر کشت (b) بر محتوی پرولین برگی اکوتیپ‌های ختمی

Figure 7- The effect of drought stress (a) and interaction effect of drought stress ×growth medium onthe leaf proline content (b) of Hollyhock ecotypes

تیمارهای آزمایش: تنش خشکی (۸۰، ۶۰ و ۴۰ درصد ظرفیت زراعی)، اکوتیپ (مشهد' و 'تهران') و بسترهای کشت (خاک مزرعه، خاک + کود حیوانی، خاک + شلتوک، خاک + کاه و کلش گندم)

Experimental treatments: drought stress (80, 60 and 40%FC), ecotype (‘Mashhad’ and ‘Tehran’), and growth medium (soil, soil + manure, soil + rice hull, soil + straw and wheat straw) (LSD, $p \leq 0.05$)



شکل ۸- اثر تنش خشکی بر وزن خشک اکوتیپ‌های ختمی تحت بسترهای مختلف

Figure 8- The effect of drought stress on the dry weight of Hollyhock ecotypes under different substrates

تیمارهای آزمایش: تنش خشکی (۸۰، ۶۰ و ۴۰ درصد ظرفیت زراعی)، اکوتیپ (مشهد' و 'تهران') و بسترهای کشت (خاک مزرعه، خاک + کود حیوانی، خاک + شلتوک، خاک + کاه و کلش گندم)

Experimental treatments: drought stress (80, 60 and 40% FC), ecotype (‘Mashhad’ and ‘Tehran’), and growth medium (soil, soil + manure, soil + rice hull, soil + wheat straw) (LSD, $p \leq 0.05$).

برگ گیاهان ختمی در شرایط تنش خشکی شدید ریزش یافت، بدین منظور سطح برگ نسبت به شرایط رطوبت کافی کاهش یافت و این ممکن است تطابق مثبت در جهت سازگار شدن به شرایط کم‌آبی باشد (Kozlowski & Pallardy, 2002). داده‌های آزمایش حاضر نشان می‌دهد که نیتروژن، مقاومت گیاهان را به تنش خشکی افزایش داده است که محققان گزارش‌های زیادی را در رابطه با این موضوع منتشر نمودند (Hosseinzadeh *et al.*, 2021; Saud *et al.*, 2020). همبستگی منفی بین وزن خشک گیاه با نشت الکترولیت نشان‌دهنده این مطلب است که در تنش خشکی شدید و بستر خاک مزرعه با افزایش نشت الکترولیت از وزن خشک گیاهان کاسته شد که مطابق با

نظر اورعی و همکاران (Oraee & Tehranifar, 2020) بود، زیرا آن‌ها نشان دادند که میزان نشت الکترولیت گیاهان بنفشه تحت تنش خشکی شدید افزایش یافت و این امر سبب کاهش میزان ماده خشک این گیاهان شد.

نتیجه‌گیری

با توجه به نتایج حاصل از این تحقیق می‌توان بیان نمود که مواد آلی همراه با خاک بیشترین تأثیر را بر صفات فیزیولوژی و رشدی دو اکوتیپ ختمی در شرایط تنش خشکی داشته‌اند و تا حدی اثرات منفی تنش را تخفیف داده‌اند؛ بنابراین کاربرد اکوتیپ مشهد و مصرف کود آلی همچون کود دامی در مدیریت تغذیه ختمی در شرایط تنش خشکی در راستای اهداف کشاورزی پایدار قابل توصیه می‌باشد.

References

1. Ahmad, I., & Maathuis, F.J. (2014). Cellular and tissue distribution of potassium: physiological relevance, mechanisms and regulation. *Journal of Plant Physiology*, *171*(9), 708-714. https://doi.org/10.1016/j.jplph.2013.10.016
2. Ahmadian, A., Ghanbari, A., Siahsar, B., Haydari, M., Ramroodi, M., & Mousavinik, S.M. (2011). Study of chamomiles yield and its components under drought stress and organic and inorganic fertilizers usage and their residue. *Journal of Microbiology and Antimicrobials*, *3*(2), 23-28.
3. Ahmed, B., Roy, C.D., Subramaniam, S.A., Ganie, D., Kwatra, D., Dixon, D., Anant, A., Zarqar, M.A., & Umar, S. (2016). An ornamental plant targets epigenetic signaling to block cancer stem cell driven colon carcinogenesis. *Carcinogenesis*, *37*(4), 385-396. https://doi.org/10.1093/carcin/bgw009
4. Ajoudan, M. (2005). Effect of high quality organic matter and different amounts on soil physicochemical properties and potato yield. M.Sc. Thesis, Faculty of Agriculture, Zanjan University, Zanjan, Iran. 140 pp. (In Persian with English abstract)
5. Altaf, A., Gull, S., Zhu, X., Zhu, M., Rasool, G., Ibrahim, M.E.H., Aleem, M., Uddin, S., Saeed, A., Zaman Shah, A., Zada, A., Quan, M., Yonggang, D., Xu, D., & Chen, L. (2021). Study of the effect of peg-6000 imposed drought stress on wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars using relative water content (RWC) and proline content analysis. *Pakistan Journal of Agricultural Sciences*, *58*(1), 357-367. https://doi.org/10.21162/PAKJAS/21.953
6. Asghari, F. (2014). Evaluation of changes in vegetative and reproductive growth and the amount of Hollyhock mucilage(*Althaea rosea* L.) under salinity. M.Sc. Thesis.. Baharan Non-Governmental Institute of Higher Education, Faculty of Science, Gorgan. (In Persian with English abstract)
7. Bahrami-Rad, S., & Hajiboland, R. (2017). Effect of potassium application in drought-stressed tobacco (*Nicotiana rustica* L.) plants, Comparison of root with foliar application. *Annals of Agricultural Science*, *62*(2), 121-130. https://doi.org/10.1016/j.aoas.2017.08.001
8. Bates, L.S., Waldren, R.P., & Teare, I.D. (1973). Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant and Soil*, *39*(1), 205-207. https://doi.org/10.1007/BF00018060
9. Besharati, J., Sehirmardi, M., Meftahizadeh, H., Ardakani, M.D., & Ghorbanpour, M. (2021). Changes in growth and quality performance of roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) in response to soil amendments with hydrogel and compost under drought stress. *South African Journal of Botany*, *145*, 334-347. https://doi.org/10.1016/j.sajb.2021.03.018
10. Burt, S.A., & Reinders, R.D. (2003). Antibacterial activity of selected plant essential oils against *Escherichia coli* O157: H7. *Letters in Applied Microbiology*, *36*(3), 162-167. https://doi.org/10.1046/j.1472-765x.2003.01285.x
11. Cakmak, I. (2005). The role of potassium in alleviating detrimental effects of abiotic stresses in plants. *Journal of Plant Nutrition*, *168*(4), 521–530. https://doi.org/10.1002/jpln.200420485
12. Chen, C.T., Lee, C. L., & Yeh, D.M. (2018). Effects of nitrogen, phosphorus, potassium, calcium, or magnesium deficiency on growth and photosynthesis of Eustoma. *HortScience*, *53*(6), 795-798. https://doi.org/10.21273/HORTSCI12947-18
13. Cui, G., Xiao, X., Zhang, W., Lang, D., Li, Z., & Zhang, X. (2021). Exogenous silicon relieve drought stress and salt stress of *Glycyrrhiza uralensis* seedlings by regulating proline metabolism and nitrogen assimilation. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, *96*(6), 728-737. https://doi.org/10.1080/14620316.2021.1921624
14. Ebell, L.F. (1969). Variation in total soluble sugars of conifer tissues with method of analysis. *Phytochemistry*, *8*(1), 227-233. https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)85818-5
15. Fanaei, H.R., Galavi, M., Kafi, M., Ghanbari, A., & Bonjar, G. (2009). Amelioration of water stress by potassium fertilizer in two oilseed species. *International Journal of Plant Production*, *3*(2), 41-54. (In Persian with English abstract)
16. Ghobadi, M., Taherabadi, S., Ghobadi, M.E., Mohammadi, G.R., & Jalali-Honarmand, S. (2013). Antioxidant capacity, photosynthetic characteristics and water relations of sunflower (*Helianthus annuus* L.) cultivars in response to drought stress. *Industrial Crops and Products*, *50*, 29-38. https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2013.07.009

17. Gong, X., Chao, L., Zhou, M., Hong, M., Luo, L., Wang, L., Ying, W., Cai, J., Songjie, G., & Hong, F. (2011). Oxidative damages of maize seedlings caused by exposure to a combination of potassium deficiency and salt stress. *Plant Soil, 340*(1), 443–452. https://doi.org/10.1007/s11104-010-0616-7
18. Han, S.H., An, J.Y., Hwang, J., Kim, S.B., & Park, B.B. (2016). The effect of organic manure and chemical fertilizer on the growth and nutrient concentrations of yellow poplar (*Liriodendron tulipifera*) in a nursery system. *Forest Science and Technology, 12*(3), 1-7.
19. Heidari, N., Pouryousef, M., & Tavakoli, A. (2014). The effect of drought stress on photosynthesis, its related parameters, and relative water content of anise (*Pimpinella anisum* L.). *Journal of Plant Research, 7*(27), 829-839. (In Persian with English abstract)
20. Hosseinzadeh, M.H., Ghalavand, A., Boojar M.M.A., Modarres-Sanavy, S.A.M., & Mokhtassi-Bidgoli, A. (2021). Application of manure and biofertilizer to improve soil properties and increase grain yield, essential oil and ω3 of purslane (*Portulaca oleracea* L.) under drought stress. *Soil and Tillage Research, 205*, 104633. https://doi.org/10.1016/j.still.2020.104633
21. Hussain, L., Akash, M.S.H., Tahir, M., Rehman, K., & Ahmed, K.Z. (2014). Hepatoprotective effects of methanolic extract of *Alcea rosea* against acetaminophen-induced hepatotoxicity in mice. *Bangladesh Journal of Pharmacology, 9*(3), 322-327.
22. Jafari, S., Garmdareh, S.E.H., & Azadegan, B. (2019). Effects of drought stress on morphological, physiological, and biochemical characteristics of stock plant (*Matthiola incana* L.). *Scientia Horticulturae, 253*, 128-133.
23. Jie, Z., Yuncong, Y., Streeter, J.G., & Ferree, D.C. (2010). Influence of soil drought stress on photosynthesis, carbohydrates and the nitrogen and phophorus absorb in different section of leaves and stem of Fugi/M.9EML, a young apple seedling. *African Journal of Biotechnology, 9*(33), 5320-5325.
24. Kane, D.A., Bradford, M.A., Fuller, E., Oldfield, E.E., & Wood, S.A. (2021). Soil organic matter protects US maize yields and lowers crop insurance payouts under drought. *Environmental Research Letters, 16*(4), 044018
25. Kang, S.M., Latif Khan, A., Waqas, M., You, Y.H., Kim, J.H., Kim, J.G., Hamayun, M., & Lee, I.J. (2014). Plant growth-promoting rhizobacteria reduce adverse effects of salinity and osmotic stress by regulating phytohormones and antioxidants in *Cucumis sativus*. *Journal of Plant Interactions, 9*(1), 673-682. https://doi.org/10.1080/17429145.2014.894587
26. Kazemalilou, S., Lajayer, B.A., & Ghorbanpour, M. (2021). *Increasing the tolerance of water-deficit stress in plants with integrated application of organic and inorganic fertilizers*. In Agri-Based Bioeconomy (pp. 299-312). CRC Press. 1st Edition.
27. Khadem, A., Golchin, A., Shafiee, S., Zare, A. (2014). The effect of animal manure and sulfur on nutrient uptake by maize (*Zea mays* L.). *Applied Field Crop Research,. 27*(103), 1-11. (In Persian with English abstract)
28. Kirchmann, H. (2021). Revisiting the original reasons for excluding inorganic fertilizers in organic farming—Why the ban is not consistent with our current scientific understanding. *Outlook on Agriculture, 50*, 107-115. https://doi.org/10.1177/00307270211020025
29. Kozlowski, T.T., & Pallardy, S.G. (2002). Acclimation and adaptive responses of woody plants to environmental stresses. *The Botanical Review, 68*(2), 270-334. https://doi.org/10.1663/0006-8101(2002)068[0270:AAAROW]2.0.CO;2
30. Luciano-Mateo, F., Hernández-Aguilera, A., Cabre, N., Camps, J., Fernández-Arroyo, S., Lopez-Miranda, J., Menendez, A.J., & Joven, J. (2017). Nutrients in energy and one-carbon metabolism: Learning from metformin users. *Nutrients, 9*(2), 121.
31. Mahajan, A., & Gupta R.D. (2009). *Bio-fertilizer, their kinds and requirements in India.* In: Mahajan A, Gupta RD (Ed) Integrated Nutrient Management (INM) in a sustainable rice-wheat cropping system. Springer Netherland.
32. Majid, A., Rather, B., Masood, A., & Khan, N. (2021). Abscisic acid and nitrogen showed coordinated action on antioxidant system and osmotic adjustment to alleviate salinity inhibited photosynthetic potential in *Brassica juncea* L. *Preprints*, 2021060147. https://doi.org/10.20944/preprints202106.0147.v1
33. Marschner, H. (1995). *Mineral nutrition of higher plants.* 2th Ed. Academic Press, London. Sandiego, Ca pp, 379-396.
34. Massoud, H.Y., Sharef, El-Deen, M.N., Yousef, R.M.M., & Megahed, M.S. (2014). Effect of water requirement and organic fertilization on growth and yeild of marigold (*Calendula officinalis* L.) plants under sandy soil conditions. *Journal of Plant Production, 5*(11), 1849-1865.
35. McCready, R.M., Guggolz, J., Silviera, V., & Owens, H.S. (1950). Determination of starch and amylose in vegetables. *Analytical Chemistry, 22*(9), 1156-1158. https://doi.org/10.1021/ac60045a016
36. Mehregan, B., Mousavi Fard, S., & Rezai Nezhad, A. (2018). The effect of foliar application of potassium silicate on some morphological, physiological and biochemical characteristics of *Alternanthera repens* L. under drought stress. *Journal of Crops Improvement, 20*(1), 314-299.

37. Mohamed, H.I., El-Sayed, A.A., Rady, M.M., Caruso, G., Sekara, A., & Abdelhamid, M.T. (2021). Coupling effects of phosphorus fertilization source and rate on growth and ion accumulation of common bean under salinity stress. *Plant Biology*, *4*(9), e11463. https://doi.org/10.7717/peerj.11463
38. Najafi, N., & Mardomi, S. (2013). Effect of sunflower, livestock manure and sewage sludge on the availability of elements, pH and EC of an alkaline soil. *Applied Soil Research, 1*(1), 1-16. (In Persian with English abstract)
39. Najafi, N., & Parsazadeh, M. (2011). The effect of nitrogen forms and pH of nutrient solutions on EC and pH changes in spinach rhizosphere in hydroponic cultivation. *Journal of Science and Technology of Greenhouse Crops, 2*(59), 29-44. (In Persian with English abstract)
40. Oraee, A., & Tehranifar, A. (2020). Evaluating the potential drought tolerance of pansy through its physiological and biochemical responses to drought and recovery periods. *Scientia Horticulturae, 265*, 109225. https://doi.org/10.1016/j.scienta.2020.109225
41. Ors, S., Ekinci, M., Yildirim, E., Sahin, U., Turan, M., & Dursun, A. (2021). Interactive effects of salinity and drought stress on photosynthetic characteristics and physiology of tomato (*Lycopersicon esculentum* L.) seedlings. *South African Journal of Botany*, *137*, 335-339. https://doi.org/10.1016/j.sajb.2020.10.031
42. Pakravan, M., & Ghahreman, A. (2003). Some new combinations and synonyms in *Alcea* (Malvaceae) from Iran. *Annalen des Naturhistorischen Museums in Wien*, *104*(B), 713-716.
43. Peng, J., Feng, Y., Wang, X., Li, J., Xu, G., Phonenasy, S., Luo, Q., Han, Z., & Lu, W. (2021). Effects of nitrogen application rate on the photosynthetic pigment, leaf fluorescence characteristics, and yield of indica hybrid rice and their interrelations. *Science Report*, *11*, 7485. https://doi.org/10.1038/s41598-021-86858-z
44. Rafie Rad, Z., Dordipour, E., & Tajvar, Y. (2016). Evaluation of low temperature tolerance indices in seedlings of Citrus aurantium under potassium nitrate nutrition. *Journal of Plant Physiology*, *7*(2), 2007-2015.
45. Razaq, M., Zhang, P., Shen, H.L., & Salahuddinn. (2017). Influence of nitrogen and phosphorous on the growth and root morophology *Acer* mono. *Plos One*, *12*(2), 1-13.
46. Reddy, A.R., Chaitanya, K.V., & Vive kanandan, M. (2004). Drought-induced responses of photosynthesis and antioxidant metabolism in higher plants. *Journal of Plant Physiology*, *161*(11), 1189-1202. https://doi.org/10.1016/j.jplph.2004.01.013
47. Saud, S., Fahad, S., Cui, G., Yajun, C., & Anwar, S. (2020). Determining nitrogen isotopes discrimination under drought stress on enzymatic activities, nitrogen isotope abundance and water contents of Kentucky bluegrass. *Scientific Reports*, *10*(1), 1-16.
48. Shajim, H., Chandranm, V., & Mathew, L. (2021). Organic fertilizers as a route to controlled release of nutrients. Controlled Release Fertilizers for Sustainable Agriculture. *Academic Press*, 231–245. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-819555-0.00013-3
49. Tarahomi, G., Lahoty, E., & Abasi, F. (2010). Investigation of the effects of drought stress on changes in soluble sugars, rate chlorophyll and potassium in *Salvia leriifolia* Benth. *Journal of Animal Physiology and Development*, *3*(3), 1-7.
50. Teixeira Filho, M.C.M., Buzetti, S., Andeotti, M., Arf, O., & DeSa, M.E. (2011). Application times, sources and doses of nitrogen on wheat cultivars under no till in the Cerrado region. *Ciência Rural*, *41*(8), 1375-1382.
51. Turner, N.C. (2018). Turgor maintenance by osmotic adjustment – 40 years of progress. *Journal of Experimental Boany 69*(13), 3223-3233. https://doi.org/10.1093/jxb/ery181
52. Wang M., Zheng Q., Shen Q., & Guo S. (2013_. The critical role of potassium in plant stress response. *International Journal of Molecular Sciences*, *14*(4), 7370-7390.
53. Wang, W., Vinocur, B., & Altman, A. (2003). Plant responses to drough, salinity and extreme temperature: Toward genetic engineering for stress tolerance. *Planta*, *218*, 1-14. https://doi.org/10.1007/s00425-003-1105-5
54. Xu, X., Du, X., Wang, F., Sha, J., Chen, Q., Tian, G., Zhu, Z., Ge, S., & Jiang, Y. (2020). Effects of potassium levels on plant growth, accumulation and distribution of carbon, and nitrate metabolism in apple dwarf rootstock seedlings. *Frontiersz in Plant Science*, *11*, 904. https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00904

Journal of Horticultural Science
https://jhs.um.ac.ir

Research Article
Vol. 38, No. 2, Summer 2024, p. 281-301

Effect of Nano-Iron Chelate and Cycocel on Growth Parameters of Poinsettia

B. Kaviani[1]*, N. Negahdar[2]

1- Professor, Department of Horticultural Science, Rasht Branch, Islamic Azad University, Rasht, Iran
(*- Corresponding Author Email: b.kaviani@yahoo.com)
2- Ph.D., Hyrcan Agricultural Science and Biotechnology Research Institute, Amol, Iran

Received: 27-08-2021		**How to cite this article:**
Revised: 26-10-2021		Kaviani, B., & Negahdar, N. (2024). Effect of nano-iron chelate and cycocel on growth parameters of poinsettia. *Journal of Horticultural Science, 38*(2), 281-301. (In Persian with English abstract). https://doi.org/10.22067/jhs.2021.72172.1086
Accepted: 20-11-2021		
Available Online: 20-11-2021		

Introduction

Poinsettia (*Euphorbia pulcherrima*) from the family Euphorbiaceae is used as potted and cut flower and has great importance in floriculture industry. Appropriate application of nutrients and plant growth regulators has an important role in increasing the quantity and quality of crops. The successful application of various nanoplatforms in medicine under *in vitro* conditions has generated some interest in agro-nanotechnology. This technology holds the promise of controlled release of agrochemicals and site-specific targeted delivery to improve efficient nutrient utilization and enhanced plant growth. Nanoencapsulation shows the benefit of more efficient use and safer handling of pesticides with less exposure to the environment. Thus, nanofertilizers can be substituted for conventional fertilizers. The role of iron in the activity of some enzymes such as catalase, peroxidase and cytochrome oxidase has been demonstrated. Iron is present as a cofactor in the structure of many enzymes. The results of some studies showed that in the absence of micro-nutrients elements, the activity of some antioxidant enzymes decreased, which resulted in increased sensitivity of plants to environmental stresses. The use of nano-iron fertilizer is an appropriate solution to remove this problem. Some growth retardants such as cycocel, paclobutrazol, bayleton and daminozide reduced the plant growth. Growth reduction in some ornamental plants enhances their overall quality and marketing. Cycocel is one of the most important growth retardants which inhibits gibberellin biosynthesis and activity in plant. Today, a range of artificially made growth-reducing compounds are used in the floriculture industry. The effect of plant growth retardants, depends on the time and method of application, concentration, species and varieties type, type of target organ and environmental and physiological conditions. Plant growth retardants reduce the division and elongation of stem cells. These compounds also reduce stem length and growth by having a negative effect on gibberellin structure. Therefore, the present study investigated the effect of different levels of nano-iron fertilizer and different concentrations of cycocel on growth and development of poinsettia (*Euphorbia pulcherrima* Willd.).

Materials and Methods

These experiments were carried out based on a randomized completely block design in three replications to evaluate the effect of various levels of nano iron chelated fertilizer and cycocel on growth parameters of *Euphorbia pulcherrima*. Cuttings with a height of 15 to 20 cm, each with 3 nodes, were prepared from the mother plant of poinsettia. Cuttings were placed in water within 24 hours for exudation of latex. Then, cuttings were planted in perlite for rooting. After rooting (60-65 days), cuttings were transferred into substrates including cocopeat, municipal compost and soil in ratio of 1:1:1. Poinsettia cuttings were grown in pots. Treatments include nano-iron fertilizer (0, 0.9, 1.8, 3.6 and 4.5 g.l^{-1}) and cycocel (0, 500, 1000, 1500 and 3000 mg.l^{-1}). Application of EDTA-based nano-iron chelate as foliar spray was performed on plants at the beginning of the experiment and 30 days later, as well as the use of cycocel 30 days after the start of the experiment as foliar spray. Stem height, internode length, node number,

©2021 The author(s). This is an open access article distributed under Creative Commons Attribution 4.0 International License (CC BY 4.0).

https://doi.org/10.22067/jhs.2021.72172.1086

root length, root number, root volume, leaf number, leaf surface, leaf total chlorophyll content, iron content in leaf and the number and longevity of bracts were evaluated.

Results and Discussion

Results showed that the lowest plant height and the highest leaf number, root length, root volume, the number and longevity of bracts were obtained in treatments of 1.8 g.l^{-1} nano-iron chelate without or with the concentration of 1000 mg.l^{-1} cycocel. In some traits such as root volume and chlorophyll content, the minimum amount was calculated in the maximum of nano-iron chelate and cycocel concentrations. Suitable root characters were severely reduced through the use of 3000 mg.l^{-1} cycocel. Overall, the most suitable treatment, especially for reduction of stem height and enhancing some vegetative traits (such as leaf number) and flowering (such as bract longevity) was 1.8 g.l^{-1} nano-iron chelate along with 1000 mg.l^{-1} cycocel. Research has demonstrated that cycocel application reduces plant height in various species, including ornamental plants, as confirmed by this study. Furthermore, this study reveals a novel effect of cycocel: it alters the weight of both aerial and underground plant parts, alongside influencing leaf iron and chlorophyll content. Notably, plant growth retardants like cycocel are known to increase cytokinin content, which in turn can lead to elevated leaf chlorophyll levels.

Keywords: Fertilization, Flowering, Foliar spray, Plant growth regulators, Soilless culture

نشریه علوم باغبانی
https://jhs.um.ac.ir

مقاله پژوهشی
جلد ۳۸، شماره ۲، تابستان ۱۴۰۳، ص. ۳۰۱-۲۸۱

اثر نانو کلات آهن و سایکوسل بر شاخص‌های رشدی بنت قنسول

بهزاد کاویانی[1]* - ناصر نگهدار[2]

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۶/۰۵
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۸/۲۹

چکیده

استفاده مناسب از مواد مغذی و تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی، نقش مهمی در افزایش کمیت و کیفیت گیاهان زراعی و باغی دارد. کودهای نانو می توانند جایگزین مناسبی برای کودهای شیمیایی مرسوم باشند. کاهش رشد در برخی گیاهان زینتی توسط کاهنده‌های رشد مانند سایکوسل کیفیت کلی آن‌ها را افزایش می‌دهد. در این پژوهش، به‌منظور ارزیابی اثر مقادیر مختلف نانو کلات آهن و سایکوسل بر شاخص‌های رشدی گیاه زینتی بنت قنسول (*Euphorbia pulcherrima* Willd.)، آزمایشی به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح بلوک‌های کاملاً تصادفی در سه تکرار انجام شد. تیمارها شامل نانو کلات آهن در پنج غلظت (صفر، ۰/۹، ۱/۸، ۳/۶ و ۴/۵ گرم در لیتر) و سایکوسل نیز در پنج غلظت (صفر، ۵۰۰، ۱۰۰۰، ۱۵۰۰ و ۳۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر) بودند. در پژوهش حاضر، صفات ارتفاع ساقه، طول میان‌گره، تعداد گره، طول، تعداد و حجم ریشه، تعداد برگ، سطح برگ، میزان کلروفیل کل، میزان آهن برگ و تعداد و طول عمر براکته‌های رنگی اندازه‌گیری شدند. نتایج نشان داد که کمترین ارتفاع ساقه و بیشترین تعداد برگ، سطح برگ، طول ریشه، حجم ریشه، تعداد و ماندگاری براکته‌های رنگی، در تیمار ۱/۸ گرم در لیتر نانو کلات آهن بدون یا با غلظت ۱۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر سایکوسل به‌دست آمد. کمترین حجم ریشه و کمترین مقدار کلروفیل کل، در تیمار حاوی ۴/۵ گرم در لیتر نانو کلات آهن همراه با ۳۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر سایکوسل (بالاترین غلظت نانو کلات آهن و سایکوسل استفاده‌شده) مشاهده شد. رشد ریشه در غلظت ۳۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر سایکوسل کاهش یافت. در مجموع، مناسب‌ترین تیمار به‌ویژه برای کاهش ارتفاع ساقه و افزایش برخی صفات رویشی (مانند تعداد برگ) و گل‌دهی (مانند ماندگاری براکته)، تیمار ۱/۸ گرم در لیتر نانو کلات آهن همراه با ۱۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر سایکوسل بود.

واژه‌های کلیدی: اسپری برگی، تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی، کشت بدون خاک، کوددهی، گل‌دهی

مقدمه

گیاه زینتی بنت قنسول (*Euphorbia pulcherrima* Willd.) در سراسر جهان به‌عنوان گل کریسمس شناخته می‌شود. بنت قنسول از خانواده فرفیون (Euphorbiaceae)، اهمیت زیادی در صنعت گیاهان زینتی به‌عنوان گیاه گلدانی و شاخه‌بریده دارد (Pobudkiewicz, 2014). گیاهان خانواده فرفیون دارای گل‌آذین ویژه‌ای به‌نام سیاتیوم (Cyathium) هستند. یکی از عوامل مؤثر بر کیفیت گل‌های شاخه-بریده و گلدانی، مدیریت تغذیه گیاه می‌باشد. دستیابی به منابع کودی داخلی در دسترس، ارزان و با کارآیی بیشتر، با استفاده از فناوری‌های جدید که بتوانند ضمن اقتصادی‌ترنمودن تولید، منجر به کاهش تلفات کودی و کاهش آلودگی محیط زیست شوند، می‌تواند از اهمیت خاصی برخوردار باشد (Peyvandi *et al.*, 2011).

بعد از تعریف واژه نانوتکنولوژی توسط Richard Feynman، رویکردهای گسترده‌ای در زمینه گیاهان باغی و بیوتکنولوژی توسعه یافته است (Feregrino-Perez *et al.*, 2018). استفاده از نانوتکنولوژی با مزایا و معایبی همراه است. یکی از مزایای عمده این تکنولوژی، کاربرد آن در طراحی کودهای نانو می‌باشد که جوانه‌زنی و رشد گیاهان را تحت تأثیر قرار می‌دهد (Feregrino-Perez *et al.*, 2018). ذرات نانو به‌عنوان موادی که حداقل در یک بعد کمتر از ۱۰۰ نانومتر قطر دارند، طبقه‌بندی می‌شوند (Auffan *et al.*, 2009).

۱- استاد، گروه باغبانی، واحد رشت، دانشگاه آزاد اسلامی، رشت، ایران
(*- نویسندهٔ مسئول: (Email: b.kaviani@yahoo.com
۲- دکترای تخصصی، مؤسسه تحقیقاتی علوم کشاورزی و بیوتکنولوژی هیرکان، آمل، ایران

https://doi.org/10.22067/jhs.2021.72172.1086

طراحی و مهندسی اصولی ذرات نانو با کاربردهای متنوع که آن‌ها را از مواد مشابه در حالت طبیعی متمایز می‌کند طی دهه‌های اخیر آغاز شده است. ذرات نانو ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی متفاوتی از جمله شکل، اندازه، ثبات، خلوص، خواص سطحی، و خواص الکتریکی، حرارتی و نوری نسبت به ترکیبات مشابه طبیعی دارند (Rastogi *et al*., 2017). در دهه‌های اخیر ذرات نانو در محصولات مختلف صنعتی و خانگی استفاده شده‌اند. فناوری نانو، فرصت‌های جدیدی را به‌منظور افزایش راندمان مصرف عناصر غذایی و به حداقل رساندن هزینه‌های حفاظت از محیط زیست به‌وجود آورده است. به کمک این فناوری، امکان تولید محصولات با ارزش افزوده بالاتر و حذف مسمومیت محیطی وجود دارد (Garda-Torredey *et al*., 2002). از مزایای کودهای نانو و برتری آن‌ها بر کودهای شیمیایی مرسوم می‌توان به موارد زیر اشاره کرد: ۱) افزایش جذب عناصر غذایی با قابلیت رهاسازی آرام عناصر؛ ۲) کاهش هزینه؛ ۳) جلوگیری از تجمع نمک‌های محلول در اطراف ریشه و جلوگیری از صدمات وارده به گیاه؛ ۴) کاهش تبدیل شکل قابل استفاده به‌شکل نامطلوب یا غیر قابل استفاده عناصر در اثر واکنش‌های معمول در خاک؛ ۵) کاهش تلفات ناشی از شستشوی عناصر غذایی در اطراف ریشه و متعاقباً کاهش آلودگی محیط زیست.

استفاده از ذرات نانوی آهن، جذب مواد معدنی و ویژگی‌های رشدی میخک (*Dianthus caryophyllus*) از جمله ارتفاع گیاه و طول ریشه را تحت تأثیر قرار داد (Ngan *et al*., 2020). مطالعه پیوندی و همکاران (Peyvandi *et al*., 2011) در مقایسه بین تأثیر نانو کلات آهن با کلات آهن معمولی بر پارامترهای رشد ریحان (*Ocimum basilicum*) نشان داد که نانو کلات آهن برخی پارامترهای رشدی مانند وزن تر و خشک ریشه و اندام‌های هوایی، طول ریشه، میزان کلروفیل و پروتئین‌های برگ را تغییر داد. نقش آهن به‌عنوان کوفاکتور در فعالیت برخی آنزیم‌ها نظیر کاتالاز، پراکسیداز و سیتوکروم اکسیداز نشان داده شده است (Bozorgi, 2012). نتایج مطالعات حاکی از آن است که در شرایط کمبود عناصر ریزمغذی، فعالیت آنزیم آنتی‌اکسیدان کاهش یافته و بنابراین، حساسیت گیاهان به تنش‌های محیطی افزایش می‌یابد. افزودن آهن در شکل‌های غیرکلات به برخی خاک‌ها تأثیر زیادی در فراهم آوردن آهن برای گیاه ندارد، زیرا آهن آزاد به سرعت هیدراته شده و به‌صورت هیدروکسیدهای آهن رسوب می‌کند و قابل استفاده نیست (Kamali Jamkani *et al*., 2011; Kamali Sarvestani *et al*., 2013). استفاده از ترکیبات کلات آهن، بهترین راه‌حل برای رفع این مشکل است. با وجود فراوان بودن مطالعات در ارتباط با اثر کود آهن روی گیاهان، پژوهش در حوزه اثر کود نانوی آهن روی گیاهان بسیار اندک است.

گروهی از تنظیم‌کننده‌ها، مانند سایکوسل (۲- کلرواتیل، تری متیل- آمونیوم کلراید)، پاکلوبوترازول، فلورپریمیدول، بایلتون، یونی‌کونازول و دامینوزاید، کندکننده رشد هستند (Gholampour *et al*., 2012;Pobudkiewicz, 2014). کاهش ارتفاع و افزایش تعداد شاخه‌های جانبی یا ممانعت از رشد طولی ساقه به‌منظور توسعه بیشتر گل و در نتیجه، تعداد بیشتر گل‌آذین اهمیت ویژه‌ای در صنعت گلکاری دارد (Karlović *et al*., 2004). کنترل ارتفاع گیاهان نقش مهمی در کاهش فضای نگهداری، انتقال آن‌ها و هزینه دارد و گیاهان را از نظر بازارپسندی مطلوب‌تر می‌کند (Karlović *et al*., 2004). کاهش رشد طولی شاخه برخی از گیاهان زینتی با استفاده از کاهنده‌های رشد گیاهی به‌منظور افزایش تمایل مصرف‌کنندگان اتفاق افتاده است (Warner & Erwin, 2003; Lodeta *et al*., 2010). محلول‌پاشی برگی و کاربرد خاکی این کاهنده‌ها، عمومی‌ترین و مؤثرترین روش‌های استفاده در گیاهان زینتی هستند (Pobudkiewicz & Treder, 2006). امروزه، انواع مختلفی از این ترکیبات در کشاورزی (به‌ویژه در باغبانی و در صنعت گیاهان زینتی) مورد استفاده قرار می‌گیرند. برخی گیاهان زینتی، در صورتی‌که ارتفاع کمتری داشته باشند، جذاب‌تر به نظر می رسند و حمل‌ونقل آن‌ها آسان‌تر است. تأثیر کاهنده‌های رشد گیاهی، بستگی به زمان و روش کاربرد، غلظت، نوع گونه و رقم، نوع اندام هدف و شرایط محیطی و فیزیولوژیکی دارد (Latimer *et al*., 2001). کاهنده‌های رشد گیاهی، تقسیم سلولی و طویل‌شدن بخش‌های هوایی گیاه را به تأخیر می‌اندازند و همچنین، با محدود کردن ساخت جیبرلین ها، طول میان‌گره‌ها و رشد رویشی را کاهش می‌دهند (Magnitskiy *et al*., 2006; Megersa *et al*., 2018). عمومی‌ترین و قابل استفاده ترین گروه از کاهنده‌های رشد، ترکیبات آمونیومی مانند سایکوسل، کلرید کلرومکوات، کلرید جیوه، آمو ۱۶۱۸، فسفون D و برومابد پای پریدیم هستند که از بیوسنتز جیبرلین ممانعت می‌کنند. این فرآیند توسط ممانعت از فعالیت سیتوکروم اکسیژنازها که میان‌کنش‌ها بین انت-کائورن و انت- کائونوئیک اسید را کاتالیز می‌کنند و باعث ممانعت از طویل‌شدن سلول‌های گیاهی می‌شود، انجام می‌شود (Pobudkiewicz and Nowak, 1992). کاهنده‌های رشد گیاهی به ویژه سایکوسل به‌منظور کاهش ارتفاع تعدادی از گیاهان زینتی و افزایش ویژگی‌های کمّی و کیفی آن‌ها توسط برخی محققان مورد استفاده قرار گرفته‌اند (Garner, 2004; Karlović *et al*., 2004; Rossini Pinto *et al*., 2005; Leclerc *et al*., 2006; Hashemabadi & Zarchini, 2010; Gholampour *et al*., 2012; Megersa *et al*., 2018). سایر کاهنده‌ها نیز برای کنترل ارتفاع و گل‌دهی برخی گیاهان زینتی مورد استفاده قرار گرفته‌اند (Hayashi *et al*., 2001; Karlović *et al*., 2004; Pobudkiewicz, 2014). از برخی از کاهنده‌های رشد از جمله

فلورپریمیدول، دامینوزاید، پاکلوبوترازول، یونی‌کونازول و کلرید کلرومکوات برای فشرده‌تر و کوتاه‌تر کردن بنت قنسول استفاده شده است (Bailey & Miller, 1991; Currey & Lopez, 2011; Pobudkiewicz, 2014). شاخه‌های بنت قنسول تیمار شده با فلورپریمیدول، حدود ۴۰ درصد کوتاه‌تر از گیاهان شاهد بودند. همچنین، سطح برگ، طول دمبرگ و وزن تر و خشک کاهش، امّا میزان کلروفیل و دوام برگ افزایش یافت (Pobudkiewicz, 2014). این محقق معتقد است، عمومی‌ترین، سریع‌ترین و ارزان‌ترین روش کنترل ارتفاع بنت قنسول و فشرده‌تر کردن آن، کاربرد کاهنده‌های رشد است.

با توجه به جدید بودن فناوری نانو و روند رو به رشد مطالعات در این فناوری، گزارش‌های زیادی درباره اثر این کود روی شاخص‌های رشدونمو گیاهان وجود ندارد. آگاهی از مصرف بهینه عناصر ضروری (پرمصرف و کم‌مصرف) نقش مؤثری بر افزایش ویژگی‌های کمّی و کیفی گیاهان، به‌ویژه گیاهان زینتی دارد. گیاه بنت قنسول از جمله گیاهان زینتی است که مطالعه‌ای روی اثر کودهای نانو روی آن انجام نشده است. مطالعه روی اثر کاهنده‌های رشد بر ویژگی‌های مورفولوژیک و فیزیولوژیک بنت قنسول اندک است. کنترل ارتفاع این گیاه برای تولیدکنندگان سخت است و بدون استفاده از برخی روش‌های کنترل، رشد آن در گلخانه زیاد است. بنابراین، هدف از پژوهش حاضر، تغییر مثبت کمیت و کیفیت گیاه زینتی بنت قنسول با استفاده از نانو کلات آهن و سایکوسل است. در صورت مناسب‌بودن این عوامل می توان آن‌ها را جایگزین کودهای شیمیایی مرسوم نمود و از آلودگی خاک، آب و محیط‌زیست کاست.

مواد و روش‌ها

از گیاه مادری بنت قنسول، قلمه‌هایی به ارتفاع ۱۵ تا ۲۰ سانتی‌متر، هر یک دارای سه گره تهیه شد. قلمه‌ها به‌علت داشتن شیرابه (لاتکس) به‌مدت ۲۴ ساعت داخل آب قرار داده شدند. بعد از این مدت، قلمه‌ها برای ریشه‌دهی در پرلیت کشت گردیدند (شکل ۱). پس از ریشه‌دار شدن (۶۰-۶۵ روز)، قلمه‌ها به بسترهای کشت منتقل شدند. به این منظور، تعدادی گلدان تهیه شد و داخل آن‌ها به نسبت مساوی از کوکوپیت، کمپوست زباله شهری و خاک زراعی ریخته شد. ابعاد گلدان ها ۱۰ × ۱۲ × ۱۲ سانتی‌متر و حجم بستر کاشت، دو کیلوگرم بود. قلمه‌های بنت قنسول به‌عنوان نمونه‌های گیاهی درون گلدان‌ها کاشته شدند (شکل ۲).

نسبت‌های متفاوتی از کود نانو کلات آهن به‌عنوان اولین فاکتور آزمایش و غلظت‌های مختلف سایکوسل نیز به‌عنوان فاکتور دوم تهیه شدند. مصرف نانو کلات آهن با بنیان EDTA به‌صورت محلول‌پاشی روی بوته‌ها در شروع آزمایش و ۳۰ روز بعد، همچنین استفاده از سایکوسل نیز ۳۰ روز پس از شروع آزمایش به‌صورت محلول‌پاشی انجام گرفت. سطوح فاکتورهای آزمایش عبارت بودند از: غلظت‌های صفر، ۵۰۰، ۱۰۰۰، ۱۵۰۰ و ۳۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر از سایکوسل و غلظت‌های صفر، ۰/۹، ۱/۸، ۳/۶ و ۴/۵ گرم در لیتر از کود نانو کلات آهن (جدول ۱).

بررسی‌ها در قالب آزمایش فاکتوریل با طرح پایه‌ی کاملاً تصادفی (CBD) در ۳ تکرار انجام شدند. آزمایش دارای ۷۵ بلوک بود و در هر بلوک از ۳ گلدان استفاده شد که در مجموع ۲۲۵ گلدان مورد استفاده قرار گرفت. کرت‌ها، گلدان‌های حاوی کودهای نانو کلات آهن و سایکوسل بودند. گیاهان در گلخانه با دمای ۲۴-۲۲ درجه‌ی سانتی‌گراد، رطوبت ۸۵ درصد و نور طبیعی رشد داده شدند. طول کل دوره‌ی آزمایشی از ابتدا تا انتها حدود ۱۵۰ روز بود.

صفات اندازه‌گیری‌شده شامل ارتفاع ساقه، طول میان‌گره، تعداد گره، طول ریشه، تعداد ریشه، حجم ریشه، تعداد برگ، سطح برگ، میزان کلروفیل کل برگ، میزان آهن برگ، تعداد گل (براکته‌های رنگی) و طول عمر (ماندگاری) براکته‌ها بودند.

اندازه‌گیری صفات طولی اندام‌ها با یک خط‌کش انجام شد. تعداد اندام‌ها با شمارش آن‌ها و با چشم غیرمسلح صورت گرفت. برای اندازه گیری طول میان‌گره‌ها، در هر نمونه، طول سومین میان‌گره از پایین، محاسبه شد.

برای اندازه‌گیری حجم ریشه، ابتدا ریشه‌ها از خاک خارج شدند و کاملاً در زیر جریان آب لوله‌کشی شسته شدند. در یک استوانه مدرج مقداری آب تا یک حجم خاص ریخته شد و ریشه گیاه تا محل یقه در داخل ظرف قرار داده شد. اختلاف حجم اندازه‌گیری‌شده آب، حجم ریشه را نشان داد.

برای اندازه‌گیری سطح برگ از کاغذ شطرنجی استفاده شد (شکل ۳). هر برگ روی سطح کاغذ گذاشته شد و دور آن با قلم مشخص گردید. مساحت یک مربع در کاغذ اندازه‌گیری شد و در تعداد مربع‌های اشغال‌شده توسط برگ ضرب گردید. عدد حاصل مساحت برگ است. مساحت سطح برگ هر تکرار از میانگین مساحت ۱۰ برگ به‌دست آمد.

برای اندازه‌گیری میزان کلروفیل کل، ۰/۵ گرم برگ داخل هاون قرار گرفت و بعد از افزودن ۲۰ میلی‌لیتر استون ۸۰ درصد به آن، کاملاً کوبیده شد. عصاره سبز رنگ به‌دست آمده، با قیف و کاغذ صافی، داخل استوانه مدرج ۵۰ میلی‌لیتری صاف گردید. تفاله‌های باقی‌مانده روی قیف به هاون برگردانده شد و ۱۵ میلی‌لیتر استون ۸۰ درصد به آن اضافه و کوبیده شد. مجدداً عصاره به‌دست آمده صاف شد و تفاله‌های باقی‌مانده دوبار به‌ترتیب با ۱۰ و ۵ میلی‌لیتر استون ۸۰ درصد کوبیده و صاف شدند. در انتها، عصاره با استون ۸۰ درصد به حجم ۵۰ میلی‌لیتر رسانده شد. محلول‌های به‌دست آمده توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر در

طول‌موج (A) ۶۶۰ و ۶۴۲/۵ نانومتر قرائت شدند. غلظت رنگدانه بر حسب میلی‌گرم بر گرم وزن تر با استفاده از معادله‌های زیر محاسبه گردید (Mazumdar & Majumder, 2003).

$$\text{کلروفیل کل}\ (mg/g\ F.W.) = 7.12\ (A660) - 16.80\ (A642.5)$$

برای اندازه‌گیری مقدار آهن، ۰/۳ گرم گیاه خشک‌شده در دمای ۷۵ درجه سانتی‌گراد آون به‌مدت ۲۴ ساعت، در سه میلی‌لیتر از مخلوط اسیدها (۱۰۰ میلی‌لیتر اسید سولفوریک + شش گرم اسید سالیسیلیک + ۱۸ میلی‌لیتر آب مقطر) ریخته شد و عمل هضم روی هیتر انجام گردید. پس از بی‌رنگ شدن نمونه‌ها، نمونه به‌دست آمده با استفاده از کاغذ صافی، صاف شد و با آب مقطر به حجم ۵۰ میلی‌لیتر رسانده شد. مقدار آهن نمونه‌ها با استفاده از دستگاه جذب اتمی به‌دست آمد.

اندازه‌گیری‌ها، ۱۲۰ روز بعد از اعمال تیمارها انجام شد. تجزیه و تحلیل داده‌ها با نرم‌افزار MSTAT–C و رسم نمودارها با نرم‌افزار EXCEL انجام شد. مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون LSD در سطح احتمال پنج درصد صورت گرفت.

نتایج

اثر غلظت‌های مختلف نانو کلات آهن و سایکوسل روی ارتفاع ساقه

سایکوسل اثر معنی‌داری در سطح احتمال یک درصد روی ارتفاع ساقه داشت. اثر نانو کلات آهن و اثر متقابل نانو کلات آهن و سایکوسل روی ارتفاع معنی‌دار نبود (جدول ۲). ارتفاع ساقه در بنت قنسول، تحت تأثیر تیمارهای مختلف نانو کلات آهن و سایکوسل متغیر بود (جداول ۳، ۴ و ۵). کمترین ارتفاع ساقه (۲۹/۸۳ سانتی‌متر) در گیاهان تیمار شده با غلظت ۱/۸ گرم در لیتر نانو کلات آهن همراه با ۱۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر سایکوسل، همچنین ۳/۶ گرم در لیتر نانو کلات آهن همراه با ۱۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر سایکوسل ثبت شد. بیشترین ارتفاع ساقه (۴۹/۴۶ سانتی‌متر) در گیاهان تیمار شده با غلظت ۴/۵ گرم در لیتر نانو کلات آهن بدون سایکوسل به‌دست آمد (جدول ۵، شکل ۴). سایکوسل در غلظت ۱۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر، کمترین ارتفاع (۳۱/۰۴ سانتی‌متر) و در غلظت صفر، بیشترین ارتفاع (۴۶/۴۳ سانتی‌متر) را سبب شد (جدول ۳). ارتفاع ساقه در گیاهان تیمار شده با ۱۵۰۰ و ۳۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر سایکوسل تفاوت چندانی نداشت. غلظت ۳/۶ گرم در لیتر نانو کلات آهن، کمترین ارتفاع (۴۲/۶۰ سانتی‌متر) و ۴/۵ گرم در لیتر بیشترین ارتفاع (۴۹/۴۶ سانتی‌متر) ساقه را تحریک کردند (جدول ۴).

اثر غلظت‌های مختلف نانو کلات آهن و سایکوسل روی طول میان‌گره

کمترین طول میان‌گره (۲/۶۰ سانتی‌متر) در گیاهان تیمار شده با غلظت ۳/۶ گرم در لیتر نانو کلات آهن همراه با ۱۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر سایکوسل ثبت شد. بیشترین طول میان‌گره (۴/۳۳ سانتی‌متر) در گیاهان تیمار شده با غلظت ۴/۵ گرم در لیتر نانو کلات آهن بدون سایکوسل به‌دست آمد (جدول ۵). ارتباطی بین افزایش غلظت نانو کلات آهن و تغییر طول میان‌گره گیاهان مشاهده نشد. نانو کلات آهن اثر معنی‌داری در سطح احتمال یک درصد روی طول میان‌گره گیاه داشت. اثر سایکوسل و اثر متقابل نانو کلات آهن و سایکوسل روی طول میان‌گره معنی‌دار نبود (جدول ۲).

اثر غلظت‌های مختلف نانو کلات آهن و سایکوسل روی تعداد گره

اثر متقابل نانو کلات آهن و سایکوسل روی تعداد گره گیاه بنت قنسول در سطح احتمال پنج درصد معنی‌دار بود (جدول ۲). بیشترین تعداد گره (۲۴/۸۳ و ۲۴/۳۰) به‌ترتیب در گیاهان کشت شده در بستر حاوی ۴/۵ گرم در لیتر نانو کلات آهن همراه با ۱۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر سایکوسل و گیاهان کشت شده در بستر حاوی ۴/۵ گرم در لیتر نانو کلات آهن همراه با ۳۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر سایکوسل به‌دست آمد (جدول ۵). نتایج حاصل نشان می‌دهد که نقش نانو کلات آهن روی افزایش تعداد گره در ساقه بسیار مهم‌تر از نقش سایکوسل است. جدول تجزیه واریانس (جدول ۲) نیز گویای این مطلب است. از طرف دیگر، کمترین تعداد گره (۱۸/۳۰ و ۱۸/۳۷) به‌ترتیب در گیاهان کشت شده در بستر حاوی ۱/۸ گرم در لیتر نانو کلات آهن همراه با ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر سایکوسل و گیاهان کشت شده در بستر حاوی ۱/۸ گرم در لیتر نانو کلات آهن همراه با ۱۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر سایکوسل به‌دست آمد (جدول ۵). این نتیجه بیانگر این موضوع است که برای افزایش تعداد گره در این گیاه باید از غلظت بالای نانو کلات آهن استفاده شود. استفاده از غلظت ۱۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر سایکوسل به همراه غلظت بالای نانو کلات آهن برای تحریک تشکیل گره مناسب است.

اثر غلظت‌های مختلف نانو کلات آهن و سایکوسل روی تعداد برگ

از بین غلظت‌های مختلف کود نانو کلات آهن، غلظت ۱/۸ گرم در لیتر، بیشترین تعداد برگ (۳۸/۴۰) را القا کرد. همچنین از بین غلظت های مختلف سایکوسل، بیشترین تعداد برگ (۴۳/۸۵) در بستر بدون سایکوسل به‌دست آمد (جداول ۳ و ۴). در مجموع، بیشترین و کمترین تعداد برگ (به‌ترتیب ۴۹/۲۳ و ۲۴/۳۳) در گیاهان تیمار شده با غلظت ۱/۸ گرم در لیتر نانو کلات آهن همراه با ۱۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر سایکوسل و ۱۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر سایکوسل بدون نانو کلات آهن مشاهده شدند (جدول ۵، شکل ۵). نتایج حاصل نشان داد که می‌توان

از نانو کلات آهن به‌تنهایی برای افزایش تعداد برگ استفاده کرد، زیرا تعداد ۴۶/۰۳ و ۴۵/۱۳ برگ در هر گیاه تیمار شده با ۱/۸ و ۳/۶ گرم در لیتر کود نانو کلات آهن تولید شد (جدول ۴). نانو کلات آهن و سایکوسل به‌تنهایی اثر معنی‌داری در سطح احتمال یک درصد روی تعداد برگ گیاه بنت قنسول داشتند. اثر متقابل نانو کلات آهن و سایکوسل روی تعداد برگ معنی‌دار نبود (جدول ۲).

اثر غلظت‌های مختلف نانو کلات آهن و سایکوسل روی سطح برگ

گیاهان تیمار شده با غلظت‌های مختلف سایکوسل، سطح برگ کوچک‌تری در مقایسه با شاهد داشتند (جدول ۳). بر اساس نتایج مقایسه میانگین تیمارهای سایکوسل، بستر کاشت حاوی بالاترین غلظت سایکوسل (۳۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر) با میانگین سطح برگ ۱۰/۴۹ سانتی‌متر مربع، کاهش قابل توجهی نسبت به شاهد با میانگین سطح برگ ۱۷/۸۸ داشت (جدول ۳). با افزایش غلظت سایکوسل، سطح برگ نیز کاهش یافت. مقایسه میانگین تیمارهای نانو کلات آهن نشان داد که بستر کاشت حاوی ۱/۸ گرم در لیتر از این کود، بیشترین سطح برگ با میانگین ۱۵/۳۲ سانتی‌متر مربع را القا کرد (جدول ۴). جدول مقایسه میانگین اثر غلظت‌های مختلف نانو کلات آهن و سایکوسل (جدول ۵) نشان داد که بیشترین سطح برگ (۱۹/۵۵ سانتی متر مربع) در تیمار ۱/۸ گرم در لیتر نانو کلات آهن فاقد سایکوسل مشاهده شد. تیمار ۴/۵ گرم در لیتر نانو کلات آهن همراه با ۱۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر سایکوسل با میانگین ۹/۷۹ سانتی‌متر مربع، دارای کمترین میزان سطح برگ بود (جدول ۵). نتایج نشان داد که در اغلب تیمارهای حاوی غلظت‌های بالای نانو کلات آهن و سایکوسل، کاهش سطح برگ مشاهده شد. جدول تجزیه واریانس (جدول ۲) آشکار کرد که اثر متقابل نانو کلات آهن و سایکوسل روی سطح برگ معنی‌دار نبود، درحالی‌که اثر نانو کلات آهن در سطح پنج درصد و اثر سایکوسل در سطح یک درصد معنی‌دار بودند.

اثر غلظت‌های مختلف نانو کلات آهن و سایکوسل روی تعداد ریشه

از بین غلظت‌های مختلف نانو کلات آهن، غلظت ۳/۶ گرم در لیتر بهترین اثر را روی افزایش تعداد ریشه (۸/۶۷) داشت (جدول ۴). در تیمار ۴/۵ گرم در لیتر نانو کلات آهن و شاهد، کمترین تعداد ریشه (به ترتیب با ۷/۵۸ و ۷/۸۴ ریشه) مشاهده شد. از بین غلظت‌های مختلف سایکوسل، ۱۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر، بیشترین اثر را روی افزایش تعداد ریشه (۸/۵۲) داشت (جدول ۳). در تیمار ۳۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر سایکوسل، کمترین تعداد ریشه (۷/۷۲) مشاهده شد. از بین تمام تیمارهای مورد بررسی، تیمار ۳/۶ گرم در لیتر نانو کلات آهن بدون سایکوسل با القای ۹/۴۶ ریشه در گیاه، و تیمار ۰/۹ گرم نانو کلات آهن همراه با ۳۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر سایکوسل با القای ۶/۶۳ ریشه در گیاه، به‌ترتیب بیشترین و کمترین تعداد ریشه را داشتند (جدول ۵). اثر غلظت‌های مختلف نانو کلات آهن و سایکوسل روی تعداد ریشه در سطح یک درصد معنی‌دار بود، امّا اثر متقابل این دو معنی‌دار نبود (جدول ۲).

اثر غلظت‌های مختلف نانو کلات آهن و سایکوسل روی طول ریشه

اثر متقابل نانو کلات آهن و سایکوسل روی صفت طول ریشه در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود (جدول ۲). جدول ۵ نشان می‌دهد که تیمار ۱/۸ گرم در لیتر نانو کلات آهن همراه با ۱۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر سایکوسل با القای ۲۳/۵۷ سانتی‌متر ریشه در گیاه، مناسب‌ترین تیمار برای تحریک بیشترین طول ریشه بود. از طرف دیگر، کمترین طول ریشه (۱۴/۶۶ سانتی‌متر) در گیاهان کشت شده در بستر حاوی ۴/۵ گرم در لیتر نانو کلات آهن همراه با ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر سایکوسل به‌دست آمد. نتایج حاصل نشان می‌دهد که هر دوی نانو کلات آهن و سایکوسل نقش مؤثری روی افزایش طول ریشه دارند. جدول تجزیه واریانس (جدول ۲) نیز بیانگر این مطلب است.

اثر غلظت‌های مختلف نانو کلات آهن و سایکوسل روی حجم ریشه

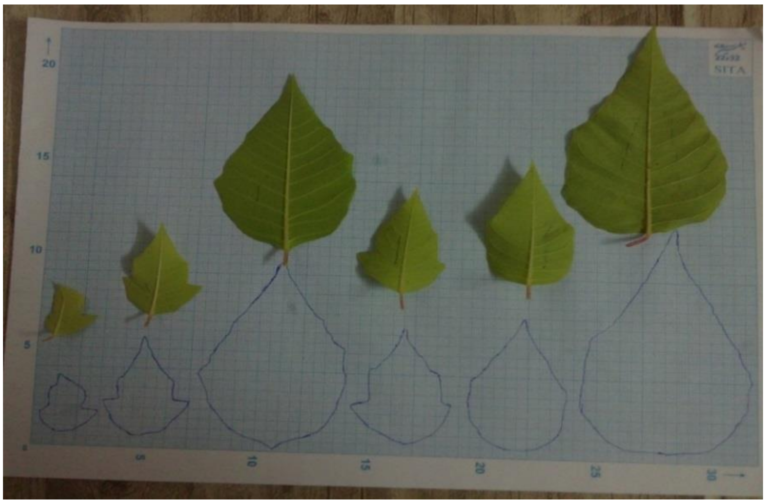
اثر ساده و متقابل غلظت‌های مختلف نانو کلات آهن و سایکوسل روی حجم ریشه معنی‌دار نبود (جدول ۲). کمترین حجم ریشه (۱/۲۶ میلی‌لیتر)، در تیمار ۴/۵ گرم در لیتر نانو کلات آهن همراه با ۳۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر سایکوسل و بیشترین حجم آن (۲/۲۳ میلی‌لیتر) در تیمار ۱/۸ گرم در لیتر نانو کلات آهن بدون مشارکت سایکوسل به دست آمد (جداول ۴ و ۵). جداول ۳ و ۴ نشان می‌دهند که محیط‌های فاقد نانو کلات آهن و سایکوسل و محیط‌های با بالاترین غلظت این دو ترکیب، اثر مناسبی روی افزایش حجم ریشه نداشتند.

شکل ۱- قلمه‌های ساقه بنت قنسول کشت شده در بسترهای کاشت حاوی پرلیت (شکل سمت چپ) برای ریشه‌زایی و تصویر قلمه ریشه‌دار شده (شکل سمت راست)

Figure 1- Poinsettia stem cuttings cultured in planting beds containing perlite (left) for rooting and a rooted cutting (right)

شکل ۲- کشت قلمه‌های ریشه‌دار شده بنت قنسول در بستر کاشت حاوی نسبت مساوی از کوکوپیت، کمپوست زباله شهری و خاک زراعی برای رشدونمو. بعد از سه ماه (شکل سمت چپ) و بعد از شش ماه (شکل سمت راست)

Figure 2- Cultivation of poinsettia rooted cuttings in planting bed containing equal amount of cocopeat, municipal compost, and field soil for growth and development. After three months (left) and after six months (right)



شکل ۳- روش اندازه‌گیری سطح برگ با استفاده از کاغذ میلی‌متری

Figure 3- Measurement method of leaf area using milimeter paper

جدول ۱- انواع تیمارها و نماد آن‌ها. از نماد تیمارها در طراحی جداول بعدی استفاده شده است. تیمارها شامل غلظت‌های مختلف سایکوسل، نانو کلات آهن و سایکوسل به‌همراه نانو کلات آهن هستند. در مجموع، ۲۵ تیمار مورد استفاده قرار گرفت.

Table 1- Type of treatments and their symbol. Treatments symbol has been used to design the next tables. Treatments include different concentrations of cycocel, nano-iron chelate, and cycocel together with nano-iron chelate. Totally, 25 treatments have been used.

نوع تیمار Treatment type	نماد تیمار (N: نانو کلات آهن، S: سایکوسل) Treatment symbol (N: nano-iron chelate, S: cycocel)
شاهد (بدون نانو کلات آهن و سایکوسل در بستر ماسه) Control (without iron Nano-chelate and cycocel in sand bed)	N_1S_1
فاقد نانو کلات آهن و ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر سایکوسل Without iron Nano-chelate and 500 mg l^{-1} cycocel	N_1S_2
فاقد نانو کلات آهن و ۱۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر سایکوسل Without iron Nano-chelate and 1000 mg l^{-1} cycocel	N_1S_3
فاقد نانو کلات آهن و ۱۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر سایکوسل Without iron Nano-chelate and 1500 mg l^{-1} cycocel	N_1S_4
فاقد نانو کلات آهن و ۳۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر سایکوسل Without iron Nano-chelate and 3000 mg l^{-1} cycocel	N_1S_5
۰/۹ گرم در لیتر نانو کلات آهن بدون سایکوسل 0.9 g l^{-1} iron Nano-chelate without cycocel	N_2S_1
۰/۹ گرم در لیتر نانو کلات آهن و ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر سایکوسل 0.9 g l^{-1} iron Nano-chelate and 500 mg l^{-1} cycocel	N_2S_2
۰/۹ گرم در لیتر نانو کلات آهن و ۱۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر سایکوسل 0.9 g l^{-1} iron Nano-chelate and 1000 mg l^{-1} cycocel	N_2S_3
۰/۹ گرم در لیتر نانو کلات آهن و ۱۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر سایکوسل 0.9 g l^{-1} iron Nano-chelate and 1500 mg l^{-1} cycocel	N_2S_4
۰/۹ گرم در لیتر نانو کلات آهن و ۳۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر سایکوسل 0.9 g l^{-1} iron Nano-chelate and 3000 mg l^{-1} cycocel	N_2S_5
۱/۸ گرم در لیتر نانو کلات آهن بدون سایکوسل 1.8 g l^{-1} iron Nano-chelate without cycocel	N_3S_1
۱/۸ گرم در لیتر نانو کلات آهن و ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر سایکوسل 1.8 g l^{-1} iron Nano-chelate and 500 mg l^{-1} cycocel	N_3S_2
۱/۸ گرم در لیتر نانو کلات آهن و ۱۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر سایکوسل 1.8 g l^{-1} iron Nano-chelate and 1000 mg l^{-1} cycocel	N_3S_3
۱/۸ گرم در لیتر نانو کلات آهن و ۱۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر سایکوسل 1.8 g l^{-1} iron Nano-chelate and 1500 mg l^{-1} cycocel	N_3S_4
۱/۸ گرم در لیتر نانو کلات آهن و ۳۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر سایکوسل 1.8 g l^{-1} iron Nano-chelate and 3000 mg l^{-1} cycocel	N_3S_5
۳/۶ گرم در لیتر نانو کلات آهن بدون سایکوسل 3.6 g l^{-1} iron Nano-chelate without cycocel	N_4S_1
۳/۶ گرم در لیتر نانو کلات آهن و ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر سایکوسل 3.6 g l^{-1} iron Nano-chelate and 500 mg l^{-1} cycocel	N_4S_2
۳/۶ گرم در لیتر نانو کلات آهن و ۱۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر سایکوسل 3.6 g l^{-1} iron Nano-chelate and 1000 mg l^{-1} cycocel	N_4S_3
۳/۶ گرم در لیتر نانو کلات آهن و ۱۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر سایکوسل 3.6 g l^{-1} iron Nano-chelate and 1500 mg l^{-1} cycocel	N_4S_4
۳/۶ گرم در لیتر نانو کلات آهن و ۳۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر سایکوسل 3.6 g l^{-1} iron Nano-chelate and 3000 mg l^{-1} cycocel	N_4S_5
۴/۵ گرم در لیتر نانو کلات آهن بدون سایکوسل 4.5 g l^{-1} iron Nano-chelate without cycocel	N_5S_1
۴/۵ گرم در لیتر نانو کلات آهن و ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر سایکوسل 4.5 g l^{-1} iron Nano-chelate and 500 mg l^{-1} cycocel	N_5S_2
۴/۵ گرم در لیتر نانو کلات آهن و ۱۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر سایکوسل 4.5 g l^{-1} iron Nano-chelate and 1000 mg l^{-1} cycocel	N_5S_3
۴/۵ گرم در لیتر نانو کلات آهن و ۱۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر سایکوسل 4.5 g l^{-1} iron Nano-chelate and 1500 mg l^{-1} cycocel	N_5S_4
۴/۵ گرم در لیتر نانو کلات آهن و ۳۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر سایکوسل 4.5 g l^{-1} iron Nano-chelate and 3000 mg l^{-1} cycocel	N_5S_5

جدول ۲- تجزیه واریانس اثر مقادیر مختلف کود نانو کلات آهن و غلظت‌های مختلف سایکوسل روی صفات ارتفاع ساقه، طول میان‌گره، تعداد گره، تعداد برگ، سطح برگ و تعداد ریشه گیاه بنت قنسول (*Euphorbia pulcherrima*)

Table 2- ANOVA for the effect of different levels of nano-iron chelate fertilizer and cycocel on the stem height, internode length, node number, leaf number, leaf surface and root number of poinsettia (*Euphorbia pulcherrima* Willd.)

منابع تغییرات S.O.V	درجه آزادی df	میانگین مربعات Mean squares					
		تعداد ریشه Root number	سطح برگ Leaf surface	تعداد برگ Leaf number	تعداد گره Node number	طول میان‌گره Internode length	ارتفاع ساقه Stem height
کود نانو (N) Nano fertilizer (N)	4	2.07**	27.90*	221/92**	65.85**	1.62**	67.90ns
سایکوسل (S) Cycocel (S)	4	2.77**	120.13**	714/89**	3.83ns	0.55ns	428.00**
N × S	16	0.67ns	7.48ns	70.92ns	15.62*	0.29ns	53.40ns
خطای آزمایش Error	48	0.41	8.38	54.58	7.62	0.37	35.10
ضریب تغییرات C.V. (%)	–	7.88	21.36	22.29	12.40	17.14	15.19

** و *: به‌ترتیب معن‌دار در سطح احتمال یک و ۵ درصد، ns: عدم معنی‌داری.

** and *: significant at the 1 and 5% of probability levels, and ns: Non- significant, respectively.

ادامه جدول ۲- تجزیه واریانس اثر مقادیر مختلف کود نانو کلات آهن و غلظت‌های مختلف سایکوسل روی صفات طول ریشه، حجم ریشه، مقدار آهن و کلروفیل کل برگ و تعداد و ماندگاری براکته‌های بنت قنسول (*Euphorbia pulcherrima*)

Table 2- Continued. ANOVA for the effect of different levels of nano-iron chelate fertilizer and cycocel on the root length, root volume, content of leaf iron and chlorophyll and number and permanent of bracts in poinsettia (*Euphorbia pulcherrima* Willd.)

منابع تغییرات S. O.V	درجه آزادی df	میانگین مربعات Mean squares					
		ماندگاری براکته‌ها Bracts longevity	تعداد براکته‌های رنگی Coloured bracts number	مقدار کلروفیل کل Total chl. content	مقدار آهن برگ Leaf iron content	حجم ریشه Root volume	طول ریشه Root length
کود نانو (N) Nano fertilizer (N)	4	41.55ns	10.02**	9.26**	40.87**	3413.33ns	58.42**
سایکوسل (S) Cycocel (S)	4	37.48ns	25.84**	2.44**	328.10**	810.00ns	10.48*
N × S	16	49.69ns	2.22ns	4.31**	537.60**	2248.33ns	7.16*
خطای آزمایش Error	48	52.27	1.91	0.15	4.48	1783.11	3.83
ضریب تغییرات C.V. (%)	–	12.99	23.43	9.91	3.09	26.17	12.02

** و *: به‌ترتیب معنی‌دار در سطح احتمال یک و ۵ درصد، ns: عدم معنی‌داری.

** and *: significant at the 1 and 5% of probability levels, and ns: Non- significant, respectively.

جدول ۳- اثر غلظت‌های مختلف سایکوسل بر ارتفاع ساقه، طول میان‌گره، تعداد گره، تعداد برگ، سطح برگ و تعداد ریشه گیاه بنت قنسول (*Euphorbia pulcherrima*)†

Table 3- The effect of different concentrations of cycocel on the stem height, internode length, node number, leaf number, leaf surface and root number in poinsettia (*Euphorbia pulcherrima* Willd.)

تیمارها Treatments	ارتفاع ساقه Stem height (cm)	طول میان‌گره Internode length (cm)	تعداد گره Node number	تعداد برگ Leaf number	سطح برگ Leaf area (cm^2)	تعداد ریشه Root number
N_1S_1	46.43a	3.93a	30.30a	30.30a	17.88a	8.71a
N_1S_2	40.41b	4.10a	25.56a	25.56a	13.98b	7.92b
N_1S_3	31.04c	3.63a	24.46a	24.46a	13.77b	8.52a
N_1S_4	38.91b	3.33a	22.86a	21.93a	11.64c	7.93b
N_1S_5	38.35b	3.06a	21.93a	22.86a	10.49c	7.72b

†حروف مشترک در هر ستون، عدم وجود اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد توسط آزمون LSD را نشان می‌دهد.

Means followed by the same letter within each column shows no significant differences at 5% of probability level by LSD test.

ادامه جدول ۳- اثر غلظت‌های مختلف سایکوسل بر طول ریشه، حجم ریشه، مقدار آهن و کلروفیل کل برگ و تعداد و ماندگاری براکته‌های رنگی بنت قنسول (*Euphorbia pulcherrima*)†

Table 3- Continued. The effect of different concentrations of cycocel on the root length, root volume, content of leaf iron and chlorophyll and number and permanent of bracts in poinsettia (*Euphorbia pulcherrima* Willd.)

تیمارها Treatments	طول ریشه Root length (cm)	حجم ریشه Root volume (ml)	مقدار آهن برگ Leaf iron content (mg l^{-1})	مقدار کلروفیل کل Total chl. content (mg.g^{-1} F.W.)	تعداد براکته‌های رنگی Coloured bracts number	ماندگاری براکته‌ها Bracts longevity (day)
N_1S_1	15.92abc	1.43a	65.43d	4.23a	8.71a	50.00a
N_1S_2	15.53c	1.36a	69.96b	4.21a	7.92b	49.66a
N_1S_3	17.33a	1.56a	75.48a	3.76b	8.52a	58.00a
N_1S_4	17.04a	1.66a	68.25c	4.23a	7.93b	56.33a
N_1S_5	15.62bc	1.40a	63.29e	3.33c	7.72b	55.33a

†حروف مشترک در هر ستون، عدم وجود اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد توسط آزمون LSD را نشان می‌دهد.

Means followed by the same letter within each column shows no significant differences at 5% of probability 0.05 level by LSD test.

جدول ٤- اثر مقادیر مختلف کود نانو کلات آهن بر ارتفاع ساقه، طول میان‌گره، تعداد گره، تعداد برگ، سطح برگ و تعداد ریشه گیاه بنت قنسول (*Euphorbia pulcherrima*)†

Table 4- The effect of different levels of nano-iron chelate fertilizer on stem height, internode length, node number, leaf number, leaf surface and root number in poinsettia (*Euphorbia pulcherrima* Willd.)

تیمارها Treatments	ارتفاع ساقه Stem height (cm)	طول میان‌گره Internode length (cm)	تعداد گره Node number	تعداد برگ Leaf number	سطح برگ Leaf area (cm^2)	تعداد ریشه Root number
N_1S_1	46.10a	4.01a	25.03a	31.72bc	13.53abc	7.84c
N_2S_1	47.80a	3.96bc	20.84cd	30.47bc	12.84bc	8.01bc
N_3S_1	46.16a	3.92c	19.73d	38.40a	15.32a	8.43ab
N_4S_1	42.60a	3.60bc	22.23bc	35.86ab	14.31ab	8.67a
N_5S_1	49.46a	4.33ab	23.47ab	29.27c	11.75c	7.85c

†حروف مشترک در هر ستون، عدم وجود اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد توسط آزمون LSD را نشان می‌دهد.

Means followed by the same letter within each column shows no significant differences at 5% of probability level by LSD test.

ادامه جدول ٤- اثر مقادیر مختلف کود نانو کلات آهن بر طول ریشه، حجم ریشه، مقدار آهن و کلروفیل کل برگ و تعداد و ماندگاری براکته‌های رنگی بنت قنسول (*Euphorbia pulcherrima*)†

Table 4- Continued. The effect of different levels of nano-iron chelate fertilizer on root length, root volume, content of leaf iron and chlorophyll and number and longevity of bracts in poinsettia (*Euphorbia pulcherrima* Willd.)

تیمارها Treatments	طول ریشه Root length (cm)	حجم ریشه Root volume (ml)	مقدار آهن برگ Leaf iron content (mg.l^{-1})	مقدار کلروفیل کل Total chl. content (mg.g^{-1} F.W.)	تعداد براکته‌های رنگی Coloured bracts number	ماندگاری براکته‌ها Bracts longevity (day)
N_1S_1	14.16c	1.43a	90.86a	3.29c	5.33bc	50.00a
N_2S_1	15.63b	1.56a	56.97d	3.63b	6.10ab	55.66a
N_3S_1	19.39a	2.23a	50.75e	4.72a	6.96a	61.33a
N_4S_1	16.83b	1.90a	64.23c	4.87a	6.26ab	61.00a
N_5S_1	15.43c	1.30a	79.61b	3.25c	4.87c	56.66a

†حروف مشترک در هر ستون، عدم وجود اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد توسط آزمون LSD را نشان می‌دهد.

Means followed by the same letter within each column shows no significant differences at 5% of probability level by LSD test.

جدول ۵- اثر متقابل سطوح مختلف کود نانو کلات آهن × سایکوسل بر ارتفاع ساقه، طول میان‌گره، تعداد گره، تعداد برگ، سطح برگ و تعداد ریشه گیاه بنت قنسول (*Euphorbia pulcherrima*)†

Table 5- The interaction effect of different levels of nano-iron chelate fertilizer ×cycocel on the stem height, internode length, node number, leaf number, leaf surface and root number in poinsettia (*Euphorbia pulcherrima* Willd.)

تیمارها Treatments	ارتفاع ساقه Stem height (cm)	طول میان‌گره Internode length (cm)	تعداد گره Node number	تعداد برگ Leaf number	سطح برگ Leaf area (cm^2)	تعداد ریشه Root number
N_1S_1	46.10a	3.93a	30.30a	45.76a	18.34a	8.20a
N_1S_2	40.16a	4.10a	25.57b	33.43a	14.84a	7.33a
N_1S_3	30.83a	3.63a	24.46bcd	27.00a	12.62a	8.56a
N_1S_4	33.96a	3.33a	21.93b-h	24.33a	10.11a	7.46a
N_1S_5	34.06a	3.06a	22.87b-g	28.06a	11.74a	7.66a
N_2S_1	47.80a	3.96a	24.30bcd	41.06a	16.89a	8.76a
N_2S_2	38.43a	3.30a	19.63e-h	32.49a	13.89a	8.53a
N_2S_3	29.83a	3.03a	20.30d-h	24.66a	10.52a	7.76a
N_2S_4	37.10a	3.00a	21.17b-h	27.13a	11.12a	8.36a
N_2S_5	42.36a	3.03a	18.80fgh	27.00a	11.76a	6.63a
N_3S_1	46.16a	3.96a	18.37gh	46.03a	19.55a	8.86a
N_3S_2	40.20a	3.16a	18.30h	40.70a	16.67a	8.10a
N_3S_3	29.80a	2.65a	18.37gh	49.23a	16.22a	8.70a
N_3S_4	40.16a	2.95a	20.83c-h	26.30a	10.35a	8.10a
N_3S_5	37.60a	3.33a	22.77b-h	29.73a	12.80a	8.40a
N_4S_1	42.60a	3.60a	20.30d-h	45.13a	18.91a	9.46a
N_4S_2	43.56a	3.30a	23.33b-e	35.06a	13.73a	8.50a
N_4S_3	29.80a	2.60a	22.60b-h	43.63a	16.82a	9.23a
N_4S_4	40.70a	3.60a	21.67b-h	27.83a	11.04a	7.83a
N_4S_5	40.20a	3.30a	23.27b-f	27.62a	11.02a	8.33a
N_5S_1	49.46a	4.33a	21.97b-h	41.23a	16.74a	8.26a
N_5S_2	39.66a	3.93a	23.37b-e	25.03a	10.73a	7.16a
N_5S_3	34.93a	3.73a	24.83bc	26.96a	10.65a	8.36a
N_5S_4	42.63a	3.53a	22.90b-f	24.97a	9.79a	7.90a
N_5S_5	37.50a	3.02a	24.30bcd	28.13a	10.86a	7.56a

†حروف مشترک در هر ستون، عدم وجود اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد توسط آزمون LSD را نشان می‌دهد.

Means followed by the same letter within each column shows no significant differences at 5% of probability level by LSD test.

ادامه جدول ۵- اثر متقابل سطوح مختلف کود نانو کلات آهن × سایکوسل روی طول ریشه، حجم ریشه، مقدار آهن و کلروفیل کل برگ و تعداد و ماندگاری براکته‌های رنگی بنت قنسول (*Euphorbia pulcherrima*)†

Table 5- Continued. the interaction effect of different levels of nano-iron chelate fertilizer ×cycocel on root length, root volume, content of leaf iron and chlorophyll and number and longevity of bracts in poinsettia (*Euphorbia pulcherrima* Willd.)

تیمارها **Treatments**	طول ریشه **Root length (cm)**	حجم ریشه **Root volume (ml)**	مقدار آهن برگ **Leaf iron content (mg.l^{-1})**	مقدار کلروفیل کل **Total chl. content (mg.g^{-1} F.W.)**	تعداد براکته‌های رنگی **Coloured bracts number**	ماندگاری براکته‌ها **Bracts longevity (day)**
N_1S_1	14.46fgh	1.43a	61.86gh	3.09i-l	7.55a	50.00a
N_1S_2	13.80h	1.36a	112.40a	3.46hij	5.55a	49.66a
N_1S_3	14.83e-h	1.56a	94.42bc	2.65lmn	4.45a	58.00a
N_1S_4	13.86gh	1.66a	88.50d	2.95i-m	4.15a	56.33a
N_1S_5	13.83h	1.40a	97.17b	4.28ef	5.07a	55.33a
N_2S_1	15.00e-h	1.56a	52.39k	4.85de	8.21a	55.66a
N_2S_2	15.13e-h	1.60a	45.76lm	2.35mn	6.50a	56.00
N_2S_3	15.03e-h	1.33a	79.93e	4.45ef	4.95a	61.00a
N_2S_4	15.93d-h	1.70a	65.26g	4.03fgh	5.43a	56..66a
N_2S_5	17.06c-g	1.53a	41.50n	2.51lmn	5.40a	54.33a
N_3S_1	20.33b	2.23a	48.00l	3.59ghi	9.15a	61.33a
N_3S_2	17.16b-f	1.53a	51.76k	5.35cd	8.14a	62.33a
N_3S_3	23.57a	2.13a	52.98ik	5.56c	8.20a	62.33a
N_3S_4	19.93bc	1.40a	42.45mn	4.25ef	4.38a	51.00a
N_3S_5	15.93d-h	1.63a	58.55hi	4.84de	4.95a	52.66a
N_4S_1	15.36d-h	1.90a	72.58f	6.39ab	8.02a	61.00a
N_4S_2	16.90c-h	1.76a	69.83f	6.61a	6.37a	56.00a
N_4S_3	18.00b-e	2.00a	63.57g	2.77k-n	7.26a	50.00a
N_4S_4	18.50bcd	1.53a	58.77hi	5.77bc	5.05a	51.66a
N_4S_5	15.36d-h	1.63a	56.40ij	2.82j-n	4.60a	57.00a
N_5S_1	14.43fgh	1.30a	92.33c	3.02i-l	6.89a	56.66a
N_5S_2	14.66fgh	1.76a	70.12f	3.52ghi	4.16a	54.33a
N_5S_3	15.20e-h	1.53a	86.50d	.37ijk	4.49a	54.33a
N_5S_4	16.96c-h	1.83a	86.28d	4.15fg	4.15a	50.33a
N_5S_5	15.90d-h	1.26a	62.83g	2.19n	4.68a	57.00a

†حروف مشترک در هر ستون، عدم وجود اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد توسط آزمون LSD را نشان می‌دهد.

Means followed by the same letter within each column shows no significant differences at 5% of probability level by LSD test.

شکل ٤- اثر تیمارهای مختلف بر ارتفاع گیاه. از چپ به راست: گیاه شاهد، گیاه تیمار شده با ۰/۹ گرم در لیتر نانو کلات آهن و ۱۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر سایکوسل، گیاه تیمار شده با ۱/۸ گرم در لیتر نانو کلات آهن بدون سایکوسل، و گیاه تیمار شده با ۳/٦ گرم در لیتر نانو کلات آهن بدون سایکوسل

Figure 4- The effect of different treatments on the plant height. Left to right: the control plant, plant treated with 0.9 g.l^{-1} nano-iron chelate and 1000 mg.l^{-1} cycocel, plant treated with 1.8 mg.l^{-1} nano-iron chelate without cycocel, and plant treated with 3.6 mg.l^{-1} nano-iron chelate without cycocel

شکل ۵- اثر تیمارهای مختلف بر تعداد برگ. گیاه شاهد (چپ) و گیاه تیمار شده با ۱/۸ گرم در لیتر نانو کلات آهن بدون سایکوسل

Figure 5- The effect of different treatments on leaf number. Control plant (left) and plant treated with 1.8 g.l^{-1} nano-iron chelate without cycocel

شکل ٦- اثر تیمارهای مختلف روی تعداد براکته. از راست به چپ: گیاه شاهد، گیاه تیمار شده با ۰/۹ گرم در لیتر نانو کلات آهن و ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر سایکوسل، و گیاه تیمار شده با ۱/۸ گرم در لیتر نانو کلات آهن بدون سایکوسل

Figure 6- The effect of different treatments on bract number. Right to left: control plant, plant treated with 0.9 mg.l^{-1} nano-iron chelate and 500 mg.l^{-1} cycocel, and plant treated with 1.8 g.l^{-1} nano-iron chelate without cycocel

اثر غلظت‌های مختلف نانو کلات آهن و سایکوسل روی تعداد براکته‌های رنگی

تأثیر سطوح مختلف نانو کلات آهن و سایکوسل روی تعداد براکته های رنگی در سطح آماری یک درصد معنی‌دار بود، امّا اثر متقابل آن‌ها روی این صفت معنی‌دار نبود (جدول ۲). در بین سطوح مختلف نانو کلات آهن، بیشترین تعداد براکته‌های رنگی (۶/۹۶) در تیمار ۱/۸ گرم در لیتر به‌دست آمد (جدول ۴). در بین سطوح مختلف سایکوسل، بیشترین تعداد براکته‌های رنگی (۸/۷۱) در شاهد به‌دست آمد (جدول

۳). از مجموع تمام تیمارها، بیشترین تعداد براکته‌های رنگی (۹/۱۵) در تیمار حاوی ۱/۸ گرم در لیتر نانو کلات آهن بدون مشارکت سایکوسل مشاهده شد (جدول ۵، شکل ۶). کمترین تعداد براکته‌های رنگی (۴/۱۵) در تیمارهای ۱۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر سایکوسل بدون مشارکت نانو کلات آهن و تیمار ۴/۵ گرم در لیتر نانو کلات آهن همراه با ۱۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر سایکوسل مشاهده شد (جدول ۵). بیشترین غلظت نانو کلات آهن (۴/۵ گرم در لیتر) همراه با تمام غلظت‌های سایکوسل، همچنین تیمارهای فاقد نانو کلات آهن، حداکثر تأثیر را روی کاهش تعداد براکته‌های رنگی داشتند (جدول ۵).

اثر غلظت‌های مختلف نانو کلات آهن و سایکوسل روی ماندگاری براکته‌های رنگی

تأثیر سطوح مختلف نانو کلات آهن، سایکوسل و اثر متقابل آن‌ها روی ماندگاری براکته‌های رنگی معنی‌دار نبود (جدول ۲). در بین سطوح مختلف نانو کلات آهن، بیشترین ماندگاری براکته‌های رنگی (۶۱/۳۳ روز) در تیمار ۱/۸ گرم در لیتر به‌دست آمد (جدول ۴). در بین سطوح مختلف سایکوسل، بیشترین ماندگاری براکته‌های رنگی (۵۸/۰۰ روز) در تیمار ۱۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر مشاهده شد (جدول ۳). از مجموع تمام تیمارها، بیشترین ماندگاری براکته‌های رنگی (۶۲/۳۳ روز) در تیمار حاوی ۱/۸ گرم در لیتر نانو کلات آهن همراه با هر دو غلظت ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر سایکوسل ثبت شد (جدول ۵). همچنین، کمترین ماندگاری براکته‌ها در تیمارهای فاقد نانو کلات آهن و ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر سایکوسل (۴۹/۶۶ روز)، شاهد (۵۰/۰۰ روز)، تیمار ۳/۶ گرم در لیتر نانو کلات آهن همراه با ۱۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر سایکوسل (۵۰/۰۰ روز) و تیمار ۴/۵ گرم در لیتر نانو کلات آهن همراه با ۱۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر سایکوسل (۵۰/۳۳ روز) مشاهده شد (جدول ۵).

اثر غلظت‌های مختلف نانو کلات آهن و سایکوسل روی مقدار آهن برگ

مقدار آهن برگ، ۱۶ هفته بعد از اعمال تیمارها اندازه‌گیری شد. نتایج حاصل در جداول ۳، ۴ و ۵ نشان داده شده است. مقایسه مقدار آهن در برگ نشان داد که کمترین مقدار آهن (۴۱/۵۰ میلی‌گرم در ۱۰۰۰ میلی‌لیتر) در گیاهان تیمار شده با ۰/۹ گرم در لیتر نانو کلات آهن به همراه ۳۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر سایکوسل به‌دست آمد. با نگاهی به نتایج حاصل، مشخص می‌شود که بیشتر گیاهانی که با غلظت‌های ۰/۹ و ۱/۸ گرم در لیتر نانو کلات آهن همراه با تمام غلظت‌های سایکوسل تیمار شدند، کمترین مقدار آهن را در برگ‌هایشان داشتند. بیشترین مقدار آهن (۸۶/۵۰ و ۸۶/۲۸ میلی‌گرم در ۱۰۰۰ میلی‌لیتر) در گیاهان تیمار شده با ۴/۵ گرم در لیتر نانو کلات آهن به‌همراه ۱۰۰۰ و ۱۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر سایکوسل به‌دست آمد. تأثیر سطوح مختلف نانو کلات آهن، سایکوسل و اثر متقابل آن‌ها روی مقدار آهن برگ در سطح یک درصد معنی‌دار بود (جدول ۲).

اثر غلظت‌های مختلف نانو کلات آهن و سایکوسل روی کلروفیل کل برگ

جدول تجزیه واریانس (جدول ۲) نشان داد که اثر نانو کلات آهن، سایکوسل و اثر متقابل نانو کلات آهن و سایکوسل روی کلروفیل کل برگ، در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود. در ارتباط با بررسی اثر متقابل نانو کلات آهن و سایکوسل روی مقدار کلروفیل کل، در میان تیمارهای آزمایشی، تیمار ۳/۶ گرم در لیتر نانو کلات آهن به همراه ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر سایکوسل، مؤثرترین تیمار برای افزایش مقدار کلروفیل کل (۶/۶۱ میلی‌گرم بر گرم وزن تر) در برگ‌ها بود (جدول ۵). کمترین مقدار کلروفیل کل (۲/۱۹ میلی‌گرم بر گرم وزن تر) در بالاترین غلظت کود نانو کلات آهن و سایکوسل (۴/۵ گرم و ۳۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر) مشاهده شد (جدول ۵). غلظت بهینه نانو کلات آهن برای تحریک ساخت کلروفیل کل، ۳/۶ گرم در لیتر و غلظت بهینه سایکوسل برای تحریک ساخت کلروفیل کل، ۱۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر بود (جداول ۳ و ۴).

بحث

نتایج حاصل از پژوهش حاضر، بیانگر نقش نانو کلات آهن و سایکوسل در تغییر برخی شاخص‌های رشد رویشی، گل‌دهی و فیزیولوژیکی بنت قنسول است، به‌طوری‌که این تغییرات در شاخص های ارتفاع ساقه، طول میان‌گره، تعداد و سطح برگ، تعداد و طول ریشه، تعداد براکته و مقدار آهن و کلروفیل برگ، معنی‌دار بود. مطالعه کمالی جمکانی و همکاران (Kamali Jamkani *et al.*, 2011) روی اثر نانو کود کلات آهن در گیاه مرزه (*Satureja hortensis*) نشان داد که تغییرات مورفولوژیکی بارزی بین گیاهان تیمار شده و شاهد وجود ندارد. اندازه‌گیری طول اندام هوایی و ریشه، افزایش معنی‌داری را در ارتفاع اندام هوایی در شاهد نسبت به تیمار نانو کود آهن نشان داد. در مطالعه حاضر، بیشترین ارتفاع ساقه بنت قنسول در گیاهان تیمار شده با غلظت ۴/۵ گرم در لیتر نانو کلات آهن بدون سایکوسل به‌دست آمد. نتیجه مشابهی توسط نگان و همکاران (Ngan *et al.*, 2020) روی میخک (*Dianthus caryophyllus* “Express golem”) گزارش شد، به‌طوری‌که گیاهان تیمار شده با ذرات نانوی آهن، دارای ارتفاع بلندتر، طول و تعداد ریشه بیشتر و وزن تر و خشک بیشتری نسبت به گیاهان شاهد بودند. در مطالعه رجابیگی و همکاران (Rajabbeigi *et al.*, 2008) روی ریحان (*Ocimum basilicum*) نیز تغییرات

مورفولوژیکی بارزی مشاهده نشد، امّا اندازه‌گیری طول ساقه نشان داد که در تمامی گروه‌های تیمار شده، رشد گیاهان نسبت به گروه شاهد، ۱/۵ درصد کاهش یافت. مطالعه بزرگی (Bozorgi, 2012) روی اثر نانو کود کلات آهن به‌صورت محلول‌پاشی در بادنجان (.*Solanum* L *melongena*) نشان داد که این کود به‌صورت معنی‌داری تمام صفات را تغییر داد. این محقق نشان داد که بالاترین ارتفاع گیاه (۱۱۲/۳ سانتی‌متر) و تعداد شاخه در گیاه (۳/۰۵) با کاربرد دو گرم در لیتر نانو کلات آهن به‌صورت اسپری به‌دست آمد. کوتاه‌ترین ارتفاع (۸۷/۲۱ سانتی‌متر) و کمترین تعداد شاخه (۲/۶۵) در شاهد (بدون اسپری برگی کود نانو کلات آهن) مشاهده شد. نتایج مشابهی در برخی گیاهان از جمله سویا به‌دست آمد (Garner, 2004; Sheykhbaglou *et al.*, 2010). مطالعه پیوندی و همکاران (Peyvandi *et al.*, 2011) در ارتباط با مقایسه اثر نانو کود کلات آهن روی گیاه ریحان (*Ocimum basilicum*) نشان داد که جای‌گزینی کود آهن تهیه‌شده با فناوری نانو در مقایسه با کودهای رایج آهن در غلظت مناسب یا کمتر، سبب افزایش رشد کمّی و کیفی ریحان شد. بیشترین طول ریشه در پژوهش حاضر در غلظت ۱/۸ گرم در لیتر به‌دست آمد، که نتیجه به‌دست آمده مشابه نتایج حاصل از تحقیق انجام شده توسط پیوندی و همکاران (Peyvandi *et al.*, 2011) می‌باشد.

با افزایش غلظت نانو کود کلات آهن، محتوای کلروفیل نسبت به شاهد افزایش یافت. بیشترین مقدار کلروفیل برگ‌ها در مطالعه حاضر در غلظت ۳/۶ گرم در لیتر به‌دست آمد. اگرچه، افزایش در مقدار کلروفیل برگ ریحان در تیمارهای مختلف کود آهن و نانو کود آهن در مقایسه با شاهد معنی‌دار نبود (Peyvandi *et al.*, 2011). این مطالعه آشکار کرد که کمترین مقدار کلروفیل برگ‌ها در گیاهان تیمار شده با بالاترین غلظت نانو کلات آهن تشکیل شد. افزایش آهن ممکن است با کاهش محتوای کلروفیل و فتوسنتز همراه شود و به کاهش رشد منتهی گردد (Chatterjee *et al.*, 2006). آهن زیاد باعث تولید رادیکال آزاد در گیاه می‌شود. آهن همچنین منجر به تولید رادیکال‌های فعال اکسیژن می‌گردد که تجزیه و کاهش رنگدانه‌ها به‌ویژه کلروفیل‌ها را به دنبال دارد. از طرف دیگر، گونه‌های فعال اکسیژن تولید شده، پراکسیداسیون لیپیدهای غشا را تحریک می‌کنند و باعث افزایش پراکندگی تیلاکوییدها می‌شوند. کاهش میزان کلروفیل می‌تواند به عنوان یک رویکرد دفاعی در جهت کاهش الکترون‌های برانگیخته ناشی از کلروفیل و در نتیجه، کاهش تولید رادیکال‌های حاصل از آن می‌باشد (Kamali Sarvestani *et al.*, 2013).

سجادی و اردکانی (Sajedi & Ardakani, 2009) نشان دادند که کودهای عناصر کم‌مصرف بیشتر در فعالیت‌های تاریکی تأثیرگذار هستند و به‌طور غیرمستقیم با افزایش سرعت رشد گیاه، سطح جذب، دوام برگ و فتوسنتز، باعث افزایش وزن خشک گیاه شد و روی سایر شاخص‌های فیزیولوژیک رشد، تأثیر کمی داشته است. مطالعه مظاهری نیا و همکاران (Mazaherinia *et al.*, 2010) روی گندم نشان داد که با افزایش آهن در خاک، میزان این عنصر در گیاه افزایش یافت. این نتیجه کاملاً با نتیجه به‌دست آمده از این پژوهش مغایرت دارد، به‌طوری‌که در مطالعه حاضر، بیشترین مقدار آهن در برگ گیاهان شاهد مشاهده شد. البته در گیاهان تیمار شده با بالاترین غلظت نانو کلات آهن در بستر کشت (۴/۵ گرم در لیتر)، مقدار آهن هر چند از گیاهان شاهد کمتر بود، ولی از سایر تیمارهای نانو کلات آهن به‌طور قابل توجهی بیشتر بود.

در برخی از گیاهان زینتی، کنترل اندازه رشد رویشی و کاهش اندازه‌ی گیاه به‌منظور افزایش قابلیت فروش، ضروری است. این کار باید بدون اعمال اثرات جانبی مضر به‌ویژه روی کیفیت کلی باشد. اندازه مناسب برای بیشتر گیاهان گلدانی، ۳۰-۲۰ سانتی‌متر است، امّا این ارتفاع با توجه به اندازه ظرف، مقبولیت بازار و گونه گیاهی متغیر است (Fathi *et al.*, 2012). سایکوسل یک کندکننده‌ی رشد گیاهی مهم است. در حال حاضر، سایکوسل یکی از کنترل‌کننده‌های رشد گیاهی در فرفیون‌ها (مانند بنت قنسول) و داودی است (Fathi *et al.*, 2012). مطالعه غلامپور و همکاران (Gholampour *et al.*, 2012) روی کلم زینتی (*Brassica oleracea*) نشان داد که با افزایش غلظت سایکوسل، ارتفاع گیاه کاهش یافت. همه تیمارهای سایکوسل رشد گیاهان تیمار شده را نسبت به گیاهان شاهد کاهش دادند. این محققان نشان دادند که تیمار ۱۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر سایکوسل، کوتاه‌ترین گیاهان (۱۰/۷۹ سانتی‌متر) را تولید کردند، که نسبت به گیاهان شاهد (۱۵/۲۰ سانتی‌متر) کوتاه‌تر بودند. با افزایش غلظت سایکوسل، طول ساقه نیز کاهش یافت. تیمار ۱۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر سایکوسل، کوتاه‌ترین ارتفاع ساقه (۲/۰۳ سانتی‌متر) را القا کردند، که نسبت به گیاهان شاهد (۲/۸۵ سانتی‌متر) کوتاه‌تر بودند. نتایج مشابهی در تحقیق حاضر مشاهده شد، به‌طوری‌که بالاترین ارتفاع ساقه در گیاهان شاهد دیده شد و با افزایش سایکوسل تا ۱۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر، طول ساقه کاهش یافت. یکی از مهم‌ترین کاربردهای کاهنده‌های رشد گیاهی، افزایش کیفیت گیاهان به‌ویژه در گیاهان زینتی از طریق کاهش رشد رویشی است. میزان تأثیرگذاری کاهنده‌های رشد گیاهی به عواملی از جمله نوع گونه و رقم، نوع کاهنده، زمان کاربرد، تعداد دفعات کاربرد، روش استفاده و غلظت آن‌ها دارد (Pobudkiewicz, 2014). برخی محققان معتقدند که استفاده خاکی (آغشته کردن یا خیساندن خاک) کاهنده‌های رشد گیاهی نسبت به کاربرد محلول‌پاشی باعث رشد یکنواخت‌تر گیاهان می‌شود (Currey & Lopez, 2011; Lodeta *et al.*, 2010). نتایج تحقیقات برخی محققان دیگر اشاره به مناسب‌تر

بودن محلول‌پاشی برگی نسبت به کاربرد خاکی دارد (Pobudkiewicz *et al.*, 2000; Pobudkiewicz & Tereder, 2006; Pobudkiewicz, 2014). علت اصلی این تفاوت را می‌توان در تفاوت گونه‌ای جستجو کرد. ارتفاع و قطر ساقه، سطح و وزن خشک برگ و غلظت رنگدانه‌ها در برگ و براکته بنت قنسول، بعد از دومین کاربرد خاکی کلرید کلرومکوات و دامینوزاید تغییر یافتند (Lodeta *et al.*, 2010). کاراتر بودن این کاهنده‌ها بعد از تکرار استفاده به تعداد دو یا سه بار، در همیشه بهار نیز گزارش شد (Jerzy & Schroeter, 2004). اگرچه، برخی مطالعات کارایی این کاهنده‌ها را بعد از اولین کاربرد گزارش کردند (Larsen & Lieth, 1993). ارتفاع ساقه و سطح براکته در بنت قنسول بعد از کاربرد کاهنده‌های رشد کاهش یافت، امّا غلظت رنگدانه‌های کلروفیل و کاروتنوئید در برگ و براکته افزایش یافت (Niu *et al.*, 2002; Gopi *et al.*, 2007; Lodeta *et al.*, 2010). برخی محققان معتقدند که افزایش میزان کلروفیل در برگ‌های تیمار شده با کاهنده‌های رشد به‌دلیل وجود سلول‌های کوچک‌تر و بنابراین، کلروفیل غلیظ‌تر درون این سلول‌ها است (Thakur *et al.*, 2006). کاهش در سطوح برگ و براکته می‌تواند پیامد ممانعت از هر دوی تقسیم و طویل‌شدن سلول بعد از کاربرد کاهنده‌های رشد باشد (Lodeta *et al.*, 2010). غلظت مناسب کاهنده‌های رشد گیاهی در بیشتر مطالعات بین ۱۰۰۰ و ۴۰۰۰ میلی‌گرم بر لیتر گزارش شده است (Gibson & Whipker, 2003; Lewis *et al.*, 2004; Lodeta *et al.*, 2010). در پژوهش حاضر، مؤثرترین و مناسب‌ترین غلظت سایکوسل برای ارتقای ویژگی‌های کمّی و کیفی بنت کنسول، ۱۰۰۰ میلی‌گرم بر لیتر بود. کاهش ارتفاع گیاه توسط کاربرد سایکوسل در بسیاری از گونه‌های گیاهی از جمله داوودی، رز و برگ‌بیدی مشاهده شده است (Garner, 2004; Karlović *et al.*, 2004; Rossini Pinto *et al.*, 2005; Hashemabadi & Zarchini, 2010). Karlović و همکاران (2004) کاهش ارتفاع را در داوودی (*Chrysanthemum* cv. 'Revert') بعد از کاربرد هر چهار غلظت ۱۰۰۰، ۲۰۰۰، ۳۰۰۰ و ۴۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر سایکوسل و دامینوزاید روی آن‌ها نسبت به شاهد گزارش کردند. در پژوهش حاضر، کاهش ارتفاع بنت قنسول در همه غلظت‌های استفاده‌شده‌ی سایکوسل مشاهده نشد. هاشم آبادی و زرچینی (Hashemabadi & Zarchini, 2010) نشان دادند که حداقل ارتفاع گیاه (۲۹/۹۳ سانتی‌متر) در رز با استفاده از ۱۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر سایکوسل به‌دست آمد. طول ساقه در گیاهان شاهد، ۳۵/۷۰ سانتی‌متر بود. این محققان، کاهش قابل‌توجه در طول ساقه را بعد از استفاده از سایکوسل نشان دادند. صفری و همکاران (Saffari *et al.*, 2004) با اسپری سایکوسل روی گیاه رز (*Rosa damascena*) نشان دادند که ۳۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر سایکوسل، طول ساقه را حدود پنج سانتی‌متر نسبت به شاهد بیشتر کاهش داد. مطالعه طاهرپزیر و هاشم آبادی (Taherpazir & Hashemabadi, 2016) روی برگ بیدی (*Zinnia elegans*) و مطالعه شعاع کاظمی و همکاران (Shoa Kazemi *et al.*, 2014) روی همیشه بهار (*Calendula officinalis*) نشان داد که ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر سایکوسل، باعث کاهش ارتفاع گیاهان تیمارشده، نسبت به گیاهان شاهد شد. در مطالعه دیگر نیز سایکوسل (۱۰۰۰ و ۲۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر) ارتفاع گیاه برگ بیدی را کاهش داد (Hojjati *et al.*, 2009). مطالعات روی چند گیاه زینتی نشان داد که غلظت بیشینه و بهینه سایکوسل برای کاهش ارتفاع گیاهان، ۱۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر است (Schwartz *et al.*, 1985; Hedayat, 2001; Joyce *et al.*, 2004; Gholampour *et al.*, 2012). سایکوسل همچنین ارتفاع گیاهان را در فرفیون (*Euphorbia*) و گل‌کاغذی (*Bougeinvillia*) (Shekari *et al.*, 2004)، رز (*Rosa*) (Saffari *et al.*, 2004) و شمعدانی (*Pelargonium*) کاهش داد.

پژوهش حاضر نشان داد که سایکوسل نقش مؤثری روی تغییر مقدار آهن و کلروفیل برگ داشت. کاهنده‌های رشد گیاهی علاوه‌بر تأثیر روی ارتفاع گیاهان، روی صفات دیگری از جمله خصوصیات مورفولوژیک اجزای گل و براکته و برخی صفات فیزیولوژیک نیز اثر دارند (Currey & Lopez, 2011; Pobudkiewicz, 2014). مطالعه غلامپور و همکاران (Gholampour *et al.*, 2012) روی کلم زینتی (*Brassica oleracea*) نشان داد که بیشترین شاخص کلروفیل با غلظت ۱۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر سایکوسل بعد از ۶۰ روز (۱۸/۵۰) و با غلظت ۱۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر بعد از ۹۰ روز (۲۰/۱۴) به‌دست آمد. کاهنده‌های رشد گیاهی، مقدار سیتوکینین را افزایش می‌دهند که خود، افزایش میزان کلروفیل برگ را به‌دنبال دارد (Rossini Pinto *et al.*, 2005). مطالعه حاضر آشکار کرد که بیشترین و کمترین میزان کلروفیل در برگ‌های تیمار شده با سایکوسل، به‌ترتیب در گیاهان تیمار شده با غلظت ۱۵۰۰ و ۳۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر ساخته شد. مطالعات نشان داده‌اند که کاهنده‌های رشد گیاهی به‌ویژه ترکیبات آمونیومی مانند سایکوسل می‌توانند فتوسنتز خالص را تغییر دهند (Fathi *et al.*, 2012). برخی گزارش‌ها نشان دادند که کاهنده‌های رشد گیاهی می‌توانند روی میزان تعرق برگی نیز اثرگذار باشند (Schuch, 1994; Abdul Jaleel *et al.*, 2007). این اثرگذاری از تأثیر این ترکیبات روی بیوسنتز و میزان اسید آبسیزیک ناشی می‌شود (Setha & Kondo, 2009; Ulger *et al.*, 2010).

مطالعه‌ای روی اثر متقابل سایکوسل و نانو کلات‌ها روی گیاهان انجام نشده است. ذرات نانو به چند طریق مانند فراهم‌کردن ریزمغذی ها، تنظیم بیان ژن‌ها و دخالت در مراحل مختلف فرآیندهای اکسیداتیو و فرآیندهای انتقال الکترون میتوکندریایی و کلروپلاستی در متابولیسم گیاه مداخله می‌کنند (Rastogi *et al.*, 2017). برخی مطالعات، اثر

کودهای نانو روی مورفولوژی گیاه را نشان داده است (Rastogi *et al*., 2017). ذرات نانو مانند نانو ذرات آهن، نقره، مس و روی می‌توانند اثرات منفی و مثبت روی گیاهان داشته باشند. چند مطالعه نشان داده است که اثر منفی ذرات نانو روی گیاهان به‌صورت کاهش رشد و کاهش تولید است (Landa *et al*., 2016; Tripathi *et al*., 2017). غلظت بالای آهن می‌تواند سرعت تقسیم سلولی را کاهش دهد. سایکوسل نیز یک کندکننده رشد است که روی تقسیم و طویل شدن سلول نقش دارد. بنابراین، اثر متقابل سایکوسل و نانو کلات آهن می‌تواند به‌صورت کاهش رشد در بنت قنسول نمایان گردد. از طرف دیگر، مهم‌ترین اثر مثبت ذرات نانو در گیاهان این است که آن‌ها به‌عنوان محرک‌های رشد عمل می‌کنند (Fraceto *et al*., 2016). سایکوسل در غلظت بالا می‌تواند اثر معکوس داشته باشد، بنابراین، افزایش تعداد گره و طول ریشه می‌تواند نمایانگر این اثرات متقابل باشد. البته تناقض‌های زیادی هم در ارتباط با نقش‌های آن‌ها در گیاهان وجود دارد. مهم‌ترین عوامل ایجادکننده این تناقضات، میزان مصرف و نوع گیاه هستند. یکی از اثرات شناخته‌شده ذرات نانو، اثر روی ساخت رنگدانه‌های گیاهی است. فراهم‌کردن میزان مناسب آهن طی کاربرد ذرات نانوی آهن می‌تواند باعث ساخت کلروفیل بیشتر در برگ گردد. آهن در مقادیر زیاد منجر به تولید رادیکال‌های فعال آزاد می‌گردد که کاهش رنگدانه‌ها به‌ویژه کلروفیل‌ها را به دنبال دارد. آهن در غلظت بهینه، تبدیل منیزیم- پروتوپورفیرین به پروتوکلروفیلید و ساخت کلروفیل را تسریع می‌کند. چگونگی اثر متقابل ذرات نانوی آهن و سایکوسل روی میزان کلروفیل به‌طور کامل مشخص نیست.

نتیجه‌گیری

نانوبیوتکنولوژی به‌عنوان یک فن جدید، نقش مؤثری در ارتقای کمّی و کیفی گیاهان زراعی و باغی داشته است. جای‌گزینی کودهای نانو با کودهای شیمیایی باعث آسیب کمتر به محیط زیست شده است. کیفیت کلی برخی گیاهان زینتی توسط کاهنده‌های رشد مانند سایکوسل افزایش یافته است. مطالعه حاضر نشان داد که ارتقای کمّی و کیفی بسیاری از ویژگی‌های گیاه زینتی بنت قنسول با استفاده از تیمارهای ۱/۸ گرم در لیتر نانو کلات آهن بدون یا با غلظت ۱۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر سایکوسل اتفاق افتاد. از نظر اقتصادی، استفاده از ۱/۸ گرم در لیتر نانو کلات آهن برای تولید گیاهان بنت قنسول فشرده‌تر دارای برگ‌ها و براکته‌های بیشتر با بازارپسندی بهتر توصیه می‌شود. استفاده از سایکوسل و سایر کاهنده‌های رشد گیاهی در غلظت‌ها و روش‌های کاربرد مختلف (محلول‌پاشی و خاکی) برای افزایش بازارپسندی گیاهان زینتی پیشنهاد می‌گردد. فشرده‌تر کردن گیاهان نیاز آبی آن‌ها را کاهش می‌دهد که از نظر کشاورزی حائز اهمیت است. در آینده فناوری نانو کمک بیشتری به انسان در ارتباط با تولید بیشتر و با کیفیت‌تر گیاهان زراعی- باغی همراه با مصرف کمتر مواد اولیه خواهد کرد.

References

1- Abbas, G., Khan, M.Q., Khan, M.J., Hussain, F., & Hussain, I. (2009). Effect of iron on the growth and yield contributing parameters of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Journal of Animal and Plant Science*, *19*(3), 135–139.

2- Abdul Jaleel, C., Manivannan, P., Sankar, B., Kishorekumar, A., Sankari, S., & Panneersel-Vam, R. (2007). Paclobutrazol enhances photosynthesis and ajmalicine production in *Catharanthus roseus*. *Process Biochemistry*, *42*(11), 1566–1570. https://doi.org/10.1016/j.procbio.2007.08.006

3- Auffan, M., Rose, J., Bottero, J.Y., Lowry, G.V., Jolivet, J.P., & Wiesner, M.R. (2009). Towards a definition of inorganic nanoparticles from an environmental, health and safety perspective. *Nature Nanotechnology*, *4*, 634–641. https://doi.org/10.1038/nnano.2009.242

4- Bailey, D.A., & Miller, W.B. (1991). Poinsettia developmental and postproduction responses to growth retardants and irradiance. *HortScience*, *26*(12), 1501–1503. https://doi.org/10.2478/abmj-2021-0011

5- Blakrishman, K. (2000). Peroxidase activity as an indacator of the iron deficiency banana. *Indian Journal of Plant Physiology*, *5*, 389–391.

6- Bozorgi, H.R. (2012). Study effects of nitrogen fertilizer management under nano iron chelate foliar spraying on yield and yield components of eggplant (*Solanium melongena* L.). *ARPN Journal of Agricultural and Biological Science*, *7*(4), 233–237.

7- Chatterjee, C., Gopal, R., & Dube, B.K. (2006). Impact of iron stress on biomass, yield, metabolism and quality of potato (*Solanum tuberosum* L.). *Scientia Horticulture*, *108*, 1–6. https://doi.org/10.1016/j.scienta.2006.01.004

8- Currey, C.J., & Lopez, R.G. (2011). Early flurprimidol drench applications suppress final height of four poinsettia cultivars. *HortTechnology 21*(1), 35–40.

9- Fathi, G., Esmaeilpour, B., & Jalilvand, P. (2012). Plant growth regulators, principle and application. Jahad-e-Daneshghahi of Mashhad Press, Iran. 279 p. (In Persian)

10- Feregrino-Perez, A.A., Magana-López, E., Guzmán, C., & Esquivel, K. (2018). A general overview of the benefits and possible negative effects of the nnanotechnology in horticulture. *Scientia Horticulturae*, *238*(19), 126–137. https://doi.org/10.1016/j.scienta.2018.03.060

11- Fraceto, L.F., Grillo, R., de Medeiros, G.A., Scognamiglio, V., Rea, G., & Bartolucci, C. (2016). Nanotechnology in agriculture: Which innovation potential does it have? *Frontiers in Environmental Science 4*(20), 1–5. https://doi.org/10.3389/fenvs.2016.00020
12- Garda-Torredey, J.L., Parsons, J.G., Gomez, E., Peralta-Videa, J., Troiani, H.E., Santiago, P., & Jose Yacaman, M. (2002). Formation and growth of Au nanoparticles inside live alfalfa plants. *Nano Letter, 2*(4): 397–401. https://doi.org/10.1021/nl015673
13- Garner, W. (2004). PGR General Uses and Overview. *Technical Service, 800*, 4556–4647. https://www.sid.ir/paper/662070/en
14- Gholampour, A., Hashemabadi, D., Sedaghathoor, S., & Kaviani, B. (2012). Controlling ornamental cabbage and kale (*Brasicca oleracea*) growth via cycocel. *Journal of Ornamental and Horticultural Plants, 2*(2), 103–112.
15- Gibson, J.L., & Whipker, B.E. (2003). Efficacy of plant growth regulators on growth of vigorous *Osteospermum* cultivars. *HortTechnology, 13*, 132–135. https://doi.org/10.21273/HORTTECH.13.1.0132
16- Gopi, R., Jaleel, C.A., Sairam, R., Lakshmanan, G.M.A., Gomathinayagam, M., & Panneerselvam, R. (2007). Differential effects of hexaconazole and paclobutrazol on biomass, electrolyte leakage, lipid peroxidation and antioxidant potential of *Daucus carota* L. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 60*, 180–186. https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2007.06.003
17- Hashemabadi, D., & Zarchini, M. (2010). Effect of some plant growth regulators on growth and flowering of *Rosa hybrida* "Poison". *Plant Omics Journal, 3*(6), 167–171.
18- Hayashi, T., Heins, R.D., Cameron, A.C., & Carlson, W.H. (2001). Ethephon influences flowering, height, and branching of several herbaceous perennials. *Scientia Horticulturae, 91*(3-4), 305–324. https://doi.org/10.1016/S0304-4238(01)00225-4
19- Hedayat, M. (2001). Application of growth retardants in greenhouse. *First National Scientific and Practical Symposium on Flowers and Ornamental Plants of Iran. Jahad-e-Keshavarzi, Iran*. (In Persian)
20- Hojjati, M., Etemadi, N., & Baninasab, B. (2009). Effect of paclobutrazol and cycocel on vegetative growth and flowering of *Zinnia elegans*. *Agricultural Science and Technology of Natural Research, 47*, 649–656 (In Persian)
21- Jerzy, M., & Schroeter, A. (2004). The dynamics of growth and flowering of marigold cultivated from trans-plants treated with different retardants used to leaves and directly to peat-substrate. *Acta Scientiarum Polonorum-Horturom Cultus, 3*, 11–23. https://doi.org/10.24326/asphc.2003.1.5
22- Joyce, G., Latimer, H., Scoggins, L., & Thomas, J. (2004). Using plant growth regulators on containerized herbaceous perennials. *Virginia State University*.
23- Kamali Jamkani, Z., Peyvandi, M., & Mirza, M. (2011). Comparison of the effect of iron nano-chelate and iron-chelate fertilizer on antioxidant activities of *Satureja hortensis. First International Congress on Agricultural Modern Issues*, 1–5. (In Persian)
24- Kamali Sarvestani, M., Shariati, M., & Madadkar Haghjoo, M. (2013). Effect of iron on cellular division, intra-cellular ß-carotene and chlorophyll synthesis in *Dunaliella*, a unicellular green algai. *Cell and Tissue Journal, 5*(2), 207–215. (In Persian)
25- Karlović, K., Vršek, I., Šindrak, Z., & Židovec, V. (2004). Influence of growth regulators on the height and number of inflorescence shoots in the *Chrysanthemum* cultivar Revert. *Agricultural Conspectus Science, 69*, 63–66.
26- Landa, P., Cyrusova, T., Jerabkova, J., Drabek, O., Vanek, T., & Podlipna, R. (2016). Effect of metal oxides on plant germination: Phytotoxicity of nanoparticles, bulk materials, and metal ions. *Water, Air, and Soil Pollution, 227*, 448. https://doi.org/10.1007/s11270-016-3156-9
27- Larsen, R.U., & Lieth, J.H. (1993). Modeling shoot elongation retardation due to daminozide in *Chrysanthemum*. (http://lieth.ucdavis.edu/Research/MumRet/B9MOD1.htm).
28- Latimer, J.G., Scoggins, H.L., & Banko, T.J. (2001). Using plant growth regulators on containerized herbaceous perennials. *Virginia Technology Publication*, No. 430-103, Blacksburg, VA.
29- Leclerc, M., Caldwell, C.D., & Lade, R.R. (2006). Effect of plant growth regulators on propagule formation in *Hemerocallis* spp. and *Hosta* spp. *HortScience, 47*, 651–653. https://doi.org/10.21273/HORTSCI.41.3.651
30- Lewis, K.P., Faust, J.E., Sparkman, J.D., & Grimes, L.W. (2004). The effect of daminozide and chlormequat on the growth and flowering of poinsettia and pansy. *HortScience, 39*, 1315–1318. https://doi.org/10.21273/HORTSCI.39.6.1315
31- Lodeta, K.B., Ban, S.G., Perica, S., Dumičić, G., & Bućan, L. (2010). Response of poinsettia to drench application of growth regulators. *Journal of Food Agriculture and Environment, 8*(1), 297–301.
32- Magnitskiy, S.V., Pasian, C.C., Bennett, M.A., & Metzger, J.D. (2006). Controlling plug height of verbena, celosia, and pansy by treating seeds with paclobutrazol. *HortScience, 47*, 158–167. https://doi.org/10.21273/HORTSCI.41.1.158
33- Mazaherinia, S., Astaraei, A.R., Fotovat, A., & Monshi, A. (2010). Nano iron oxide particles efficiency on Fe, Mn, Zn and Cu concentrations in wheat plant. *World Applied Science Journal, 7*(1), 36–40.

34- Mazumdar, B.C., & Majumder, K. (2003). Methods on physcochemical analysis of fruits. *University College of Agriculture, Calcutta University*, 136–150.
35- Megersa, H.G., Lemma, D.T., & Banjawu, D.T. (2018). Effects of plant growth retardants and pot sizes on the height of potting ornamental plants: A short review. *Journal of Horticulture, 5*(1), 1–6. https://doi.org/10.4172/2376-0354.1000220
36- Ngan, H.T.M., Tung, H.T., Le, B.V., & Nhut, D.T. (2020). Evaluation of root growth, antioxidant enzyme activity and mineral absorbability of carnation (*Dianthus caryophyllus* “Express golem” cultured in two culture systems supplemented with iron nanoparticles. *Scientia Horticulturae, 272*(15), 109612. https://doi.org/10.1016/j.scienta.2020.109612
37- Niu, G., Heins, R., & Carlson, W. (2002). Using paclobutrazol to control height of poinsettia ‘Freedom’. *HortTechnology, 12*, 232–236. https://doi.org/10.21273/HORTTECH.12.2.232
38- Peyvandi, M., Parande, H., & Mirza, M. (2011). Comparison of nano Fe chelate with Fe chelate effect on growth parameters and antioxidant enzymes activity of *Ocimum basilicum*. *New Cellular and Molecular Biotechnology*, *1*(4), 89–99.
39- Pobudkiewicz, A. (2014). Influence of growth retardant on growth and development of *Euphorbia pulcherrima* Willd. ex Klotzsch. *Acta Agrobotanica, 67*(3), 65–74. https://doi.org/10.5586/aa.2014.030
40- Pobudkiewicz, A., & Nowak, J. (1992). Effect of flurprimidol and silver thiosulfate (STS) on the growth and flowering of “Prima” lilies grown as pot plants. *Acta Horticulturae, 325*, 193–198.
41- Pobudkiewicz, A., Nowak, J., Podwyszyńska, M., & Przybyła, A. (2000). The effect of growth retardants on growth and flowering of dwarf alstroemeria. *Acta Agrobotany, 53*(2), 77–83. https://doi.org/10.5586/aa.2000.017
42- Pobudkiewicz, A., & Treder, J. (2006). Effects of flurprimidol and daminozide on growth and flowering of oriental lily “Mona Lisa”. *Scientia Horticulturae, 110*(4), 328–333. https://doi.org/10.1016/j.scienta.2006.07.019
43- Rajabbeigi, A., Ghanati, F., Sefidkon, F., & Abdolmaleki, P. (2008). Evaluation of the effect of iron on the content of *Ocimum basilicum*. *Science Journal, 4*, 49-53 (In Persian)
44- Rastogi, A., Zivcak, M., Sytar, O., Kalaji, H.M., He, X., Mbarki, S., & Brestic, M. (2017). Impact of metal and metal oxide Nanoparticles on plant: A critical review. *Frontiers in Chemistry*, *5*(78), 1–16. https://doi.org/10.3389/fchem.2017.00078
45- Rossini Pinto, A.C., Rodrigues, Td.J.D, Leits, C.I., & Barbosa, J.C. (2005). Growth retardants on development and ornamental quality of potted. ‘*Liliput*’ *Zinnia elegans* JACQ. *Scientia Agriculture, 62*, 337–345. https://doi.org/10.1590/S0103-90162005000400006
46- Sajedi, N.A., & Ardakani, M.R. (2009). Effect of different concentrations of nitrogen, zinc and iron on physiologic parameters of fodder in Markazi province. *Iranian Journal of Agronomy Researches, 6*(1), 99–109 (In Persian)
47- Saffari, V.R., Khalighi, A., Lesani, H., Babalar, M., & Obermaier, J.F. (2004). Effect of different plant growth regulators and time of pruning on yield components of *Rosa damascena* Hill. *International Journal of Agriculture and Biology, 6*(6), 1040–1042. 1560–8530/2004/06–6–1040–1042
48- Schuch, U.K. (1994). Response of chrysanthemum to uniconazole and daminozide applied as dip to cuttings or as foliar spray. *Journal of Plant Growth Regulation*, *13*(3), 115–121. https://doi.org/10.1007/BF00196374
49- Schwartz, M.A., Payne, R.N., & Sites, G. (1985). Residual effect of chlormequat on garden performance in sun and shade of seed and cutting-propagated cultivars of geraniums. *HortScience, 20*, 368–370. https://doi.org/10.21273/HORTSCI.20.3.368
50- Setha, S., & Kondo, S. (2009). Abscisic acid levels and antioxidant activity are affected by an inhibitor of cytochrome P450 in apple seedlings. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, *84*, 340–344. https://doi.org/10.1080/14620316.2009.11512528
51- Shekari, F., Ebrahimzadeh, A., & Esmaeilpour, B. (2004). Plant Growth Regulators in Agriculture and Horticulture. *Zanjan University Press, Zanjan, Iran*. (In Persian)
52- Sheykhbaglou, R., Sedghi, M., Tajbakhsh Shishevan, M., & Seyed Sharifi, R. (2010). Effects of nano-iron oxide particles on agronomic traits of soybean. *Notrition Science and Biology*, *2*(2), 112–113. https://doi.org/10.15835/nsb224667
53- Shoa Kazemi, Sh., Hashemabadi, D., Mohammadi Torkashvand, A., & Kaviani, B. (2014). Effect of cycocel and daminozide on vegetative growth, flowering and the content of essence of pot marigold (*Calendula officinalis*). *Journal of Ornamental Plants, 4*(2), 107–114.
54- Taherpazir, S., & Hashemabadi, D. (2016). The effect of cycocel and pot size on vegetative growth and flowering of zinnia (*Zinnia elegans*). *Journal of Ornamental Plants, 6*(2), 107–114.
55- Thakur, R., Sood, A., Nagar, P.K., Pandey, S., Soboti, R.C., & Ahuja, P.S. (2006). Regulation of growth of lilium plantlets in liquid medium by application of paclobutrazol or ancymidol, for its amenability in a bioreactor system: Growth parameters. *Plant Cell Reports, 25*, 382–391. https://doi.org/10.1007/s00299-005-0094-1

56- Tripathi, D.K., Singh, S., Singh, S., Srivastava, P.K., Singh, V.P., Singh, S., Prasad, S.M., Singh, P.K., Dubey, N.K., Pandey, A.C., & Chauhan, D.K. (2017). Nitric oxide alleviates silver nanoparticles (AgNps)-induced phytotoxicity in *Pisum sativum* seedlings. *Plant Physiology and Biochemistry*, *110*, 167–177. https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2016.06.015

57- Ulger, S., Akdesir, O., Demiral, S., & Atmaca, A. (2010). Investigation of the effects of external daminozide application on endogenous hormone levels in “Memecik” olive trees. *Acta Horticulturae*, *884*, 153–156. https://doi.org/10.5586/aa.2014.030

58- Warner, R.M., & Erwin, J.E. (2003). Effect of plant growth retardants on stem elongation of hibiscus species. *HortTechnology*, *13*, 293–296. https://doi.org/10.21273/HORTTECH.13.2.0293

Journal of Horticultural Science
https://jhs.um.ac.ir

Research Article
Vol. 38, No. 2, Summer 2024, p. 303-319

The Effect of Phosphate-Solubilizing Bacteria in Availability of Phosphorus from Rock Phosphate and Improving Pistachio (*Pistacia vera* L.) Seedlings Growth at Different Levels of Irrigation Water Salinity

F. Azarmi-Atajan[1*], M.H. Sayyari-Zahan[2*], A. Mirzaei[3]

1 and 2- Assistant Professor and Associate Professor, Department of Soil Science and Engineering, Faculty of Agriculture, University of Birjand, Birjand, Iran, respectively.
(*- Corresponding Author Email: farhadazarmi@birjand.ac.ir)
3- Graduated M.Sc. Student, Department of Plant Production and Genetic Engineering, Faculty of Agriculture, University of Birjand, Birjand, Iran

Received:	22-09-2022	**How to cite this article:**
Revised:	23-05-2023	Azarmi-Atajan, F., Sayyari-Zahan, M.H., & Mirzaei, A. (2024). The effect of phosphate-solubilizing bacteria in availability of phosphorus from rock phosphate and improving pistachio (*Pistacia vera* L.) seedlings growth at different levels of irrigation water salinity. *Journal of Horticultural Science, 38*(2), 303-319. (In Persian with English abstract). https://doi.org/10.22067/jhs.2023.78915.1194
Accepted:	22-10-2023	
Available Online:	23-10-2023	

Introduction

Phosphorus (P) is one of the most important nutritional elements of plants and it is necessary for the development of plant roots. Due to the high cost of chemical fertilizers, it is important to use cheap sources such as rock phosphate (RP) to supply P needed by plants. The efficiency of RP is low and its use alone cannot supply the P required by the plant. One of the ways to increase the efficiency of RP is to use phosphate solubilizing bacteria (PSB). Considering the salinity of soil and irrigation water in many pistachio-growing areas of Iran, the use of salt-resistant PSB can increase their resistance to salt stress in addition to supplying the P required by pistachios.

Materials and Methods

In order to investigate the role of PSB in supplying the required P of pistachio seedlings under saline conditions, a factorial experiment was conducted in the form of a completely randomized design with 3 replications in greenhouse conditions. The factors included PSB at three levels [control (PSB_0), *Pseudomonas* sp. *1* (PSB_1) and *Pseudomonas* sp. *2* (PSB_2)], RP at two levels (0 and 30 mg P from rock RP) and irrigation water salinity at three levels (0, 5 and 10 dS/m). The bacteria used in this study were able to produce ACC-deaminase, indole acetic acid and dissolve tricalcium phosphate in vitro. For inoculation, inoculum containing each bacterium with a population of 10^8 cells/ml was prepared in the nutrient broth medium and each pistachio seed (*P. vera* L. cv. Badami) was inoculated with 500 µL of bacterial inoculum. The plants were irrigated with non-saline water for four weeks and then with saline water until harvesting based on experimental treatments. During the growth period, the soil moisture of the pots was kept at about 80% of the field capacity by weight method. Finally, shoot and root sampling was performed and various characteristics such as shoot and root dry weight, chlorophyll, carotenoids, proline, soluble sugars, RWC, MSI and phosphorus as well as sodium concentrations were measured. Analysis of variance of traits was performed using SAS software and the means were compared using the LSD method with a probability level of $P \leq 0.05$.

Results and Discussion

The results showed that water salinity decreased the dry weight of shoot and root, chlorophyll a, chlorophyll b, carotenoids, relative water content (RWC) and membrane stability index (MSI) of leaf and p concentration of shoot

©2023 The author(s). This is an open access article distributed under Creative Commons Attribution 4.0 International License (CC BY 4.0).

https://doi.org/10.22067/jhs.2023.78915.1194

and root of pistachio seedlings. Auxin produced by bacteria can directly increase cell division and growth or indirectly increase ACC-deaminase production. On the other hand, proline, soluble sugars and sodium were accumulated in the leaves of seedlings with increasing water salinity. According to the results, although the use of RP alone did not show significant effect on the studied indicators, its simultaneous use with PSB had the greatest role in improving the growth of pistachio seedlings, especially in saline conditions. The highest amount of dry weight of shoot (1.89 g.plant) and root (1.59 g.plant), chlorophyll b (1.30 mg/g fresh weight), carotenoids (1.35 mg/g fresh weight), soluble sugars (59.1 mg/g fresh weight), proline (36.7 $mg.g^{-1}$ fresh weight), leaf RWC (91 %), leaf MSI (84%) and the P concentration of shoot (0.39 %) and root (0.35 %) was obtained from the simultaneous application of RP and PSB (especially PSB_2) in non-saline conditions. The PSB increase soil P availability by reducing of soil pH by release of protons and organic acids and mineralization by production of acid phosphatases. Bacteria, in addition to increasing soil P availability, improve phosphorus uptake and chlorophyll content in plants by affecting root morphology and its development in soil. On the other hand, inoculation with PSB (both separately and together with rock phosphate) reduced sodium accumulation in the aerial parts and roots of pistachio seedlings.

Conclusion

Unlike pistachio trees, the tolerance of pistachio seedlings to salt stress is low. According to the results, the salinity symptoms were visible in the pistachio seedling leaves at the water salinity level of 10 dS/m, which caused the drying of the lower leaves and the burning of the edges of the young leaves. On the other hand, although the application of RP alone did not have significant effect on increasing the tolerance of plants to salt stress, the simultaneous use of RP with PSB increased growth, the accumulation of proline and soluble sugars, the concentration of chlorophyll and carotenoids, the amount of RWC and MSI and P concentration of pistachio seedlings, especially in saline conditions. Therefore, the use of PSB can help the growth and establishment of pistachio seedlings under salinity stress conditions and increase the efficiency of RP and supply P needed by the seedlings.

Keywords: PGPR, Phosphorus resources, Salinity stress, Water absorption

نشریه علوم باغبانی
https://jhs.um.ac.ir

مقاله پژوهشی
جلد ۳۸، شماره ۲، تابستان ۱۴۰۳، ص. ۳۱۹-۳۰۳

تأثیر باکتری‌های حل‌کننده فسفات در تأمین فسفر از سنگ فسفات و بهبود رشد دانهال‌های پسته (*Pistacia vera* L.) در سطوح مختلف شوری آب آبیاری

فرهاد آذرمی آتاجان[1*] - محمدحسن سیاری زهان[2] - عبدالله میرزایی[3]

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۶/۳۱
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۷/۳۰

چکیده

استفاده از باکتری‌های حل‌کننده فسفات (PSB) متحمل به شوری از روش‌های مؤثر در افزایش کارایی سنگ فسفات، تأمین فسفر مورد نیاز گیاه و بهبود رشد آن در محیط‌های شور می‌باشد. به‌منظور بررسی نقش PSB در تأمین فسفر مورد نیاز دانهال‌های پسته در شرایط شور، آزمایشی به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کامل تصادفی با سه تکرار در شرایط گلخانه‌ای انجام شد. فاکتورهای آزمایشی شامل PSB در سه سطح [شاهد (PSB_0)، باکتری *Pseudomonas sp.* 1 (PSB_1) و باکتری *Pseudomonas sp.* 2 (PSB_2)]، سنگ فسفات در دو سطح (صفر و ۳۰ میلی‌گرم فسفر از منبع سنگ فسفات) و شوری آب آبیاری در سه سطح (صفر، ۵ و ۱۰ دسی زیمنس بر متر) بود. نتایج نشان داد که شوری آب موجب کاهش وزن خشک اندام هوایی و ریشه، کلروفیل، کاروتنوئیدها، مقدار نسبی آب و شاخص پایداری غشای برگ و غلظت فسفر اندام هوایی و ریشه دانهال‌های پسته گردید. در مقابل، پرولین، قندهای محلول و سدیم با افزایش شوری آب در برگ دانهال‌ها انباشته شد. با توجه به نتایج، اگرچه کاربرد سنگ فسفات به‌تنهایی تأثیر چندانی بر شاخص‌های مورد مطالعه نشان نداد، امّا کاربرد هم‌زمان آن با باکتری‌ها بیشترین نقش را در بهبود رشد دانهال‌های پسته به‌ویژه در شرایط شور داشت. بیشترین مقدار وزن خشک اندام هوایی (۱/۸۹ گرم بر دانهال) و ریشه (۱/۵۹ گرم بر دانهال)، کلروفیل b (۱/۳۰ میلی‌گرم بر گرم وزن تر)، کاروتنوئیدها (۱/۳۵ میلی‌گرم بر گرم وزن تر)، قندهای محلول (۵۹/۱ میلی‌گرم بر گرم وزن تر)، پرولین (۳۶/۷ میلی‌گرم بر گرم وزن تر)، مقدار نسبی آب برگ (۹۱/۰ درصد)، شاخص پایداری غشا (۸۴/۰ درصد)، غلظت فسفر اندام هوایی (۰/۳۹ درصد) و غلظت فسفر ریشه (۰/۳۵ درصد) از کاربرد هم‌زمان سنگ فسفات و باکتری‌ها (به‌ویژه سویه PSB_2) در شرایط غیرشور به‌دست آمد. از طرفی، تلقیح با PSB (هم به‌صورت مجزا و هم همراه با سنگ فسفات) موجب کاهش تجمع سدیم در اندام هوایی و ریشه دانهال‌های پسته شد. ازاین‌رو، استفاده از باکتری‌های حل‌کننده فسفات با کارایی بالا و خصوصیات محرک رشدی مناسب، می‌تواند علاوه‌بر افزایش کارایی سنگ فسفات و تأمین فسفر مورد نیاز دانهال‌ها موجب بهبود رشد و افزایش مقاومت آن‌ها به تنش شوری گردد.

واژه‌های کلیدی: باکتری‌های محرک رشد گیاه، تنش شوری، جذب آب، منابع فسفر

مقدمه

پسته (*Pistacia vera* L.) یکی از مهم‌ترین محصولات صادراتی باغبانی ایران بوده و ایران پس از ایالات متحده آمریکا و ترکیه سومین تولیدکننده پسته در جهان است (FAOSTAT, 2020). براساس آمارنامه محصولات باغی وزارت جهاد کشاورزی در سال ۱۳۹۹، سطح زیر کشت پسته در ایران حدود ۵۳۴ هزار هکتار بوده و میزان تولید آن حدود ۳۸۶ هزار تن در سال می‌باشد. با وجود افزایش سطح زیر کشت پسته در ایران، عملکرد این محصول همچنان پایین است. عملکرد پسته در ایران به‌دلیل pH و محتوای کلسیم کربنات بالای خاک، مواد آلی

۱ و ۲- به‌ترتیب استادیار و دانشیار، گروه علوم و مهندسی خاک، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بیرجند، بیرجند، ایران
(*- نویسندهٔ مسئول: Email: farhadazarmi@birjand.ac.ir)
۳- دانش آموخته کارشناسی ارشد، گروه مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بیرجند، بیرجند، ایران
https://doi.org/10.22067/jhs.2023.78915.1194

کم در خاک، شوری خاک و آب آبیاری، حاصلخیزی ضعیف خاک و مدیریت ضعیف تغذیه‌ای بسیار پایین است (Azarmi *et al.*, 2016).

اگرچه پسته از گیاهان مقاوم به شوری محسوب می‌شود، امّا افزایش شوری به‌دلیل کیفیت پایین آب آبیاری، مدیریت ضعیف و هم چنین ماهیت و ساختار طبیعی خاک استقرار، رشد و عملکرد درختان پسته را در مناطق مختلف ایران کاهش داده است (Tavalali *et al.*, 2009). شوری خاک یکی از گسترده‌ترین تنش‌های محیطی است که رشد و عملکرد گیاهان زراعی و باغی را به‌ویژه در مناطق خشک و نیمه خشک محدود کرده است (Meloni *et al.*, 2001). عمده‌ترین دلیل افزایش شوری در اراضی کشاورزی مربوط به آبیاری با آب‌های زیرزمینی حاوی غلظت بالای نمک‌های محلول، مدیریت ضعیف اراضی و هم‌چنین ساختار و ماهیت طبیعی خاک است. تحت تنش شوری، به‌دلیل تغییرات در فراهمی عناصر غذایی، توزیع و انتقال آن‌ها در بخش‌های مختلف گیاه و یا تخریب فیزیولوژیکی برخی از اندام‌های دخیل گیاه در جذب عناصر غذایی، تعادل تغذیه‌ای گیاه از بین می‌رود (Grattan & Grieve, 1999). از طرفی، غلظت بالای سدیم در این شرایط، جذب سایر عناصر مانند پتاسیم، منیزیم و کلسیم را کاهش داده و کمبود آن‌ها در گیاه مشاهده می‌شود (Iqbal & Ashraf, 2013). علاوه‌بر اثرات مستقیم شوری بر گیاه، در خاک‌های شور، عدم تعادل تغذیه‌ای، از مهم‌ترین دلایل کاهش رشد و عملکرد گیاه می‌باشد. در خاک‌های شور، فعالیت عناصر غذایی نظیر فسفر به‌دلیل افزایش قدرت یونی محیط کاهش می‌یابد (Grattan & Grieve, 1999).

فسفر (P) یکی از عناصر غذایی ضروری مورد نیاز گیاهان برای رشد و عملکرد می‌باشد. این عنصر نقشی اساسی در فرآیندهای مهم سلولی مانند حفظ ساختار غشا، تقسیم سلولی، تولید مولکول‌های زیستی و در نتیجه، متابولیسم کربوهیدرات‌ها و فعال کردن آنزیم‌ها دارد (Razaq *et al.*, 2017). غلظت فسفر در گیاهان بین ۰/۰۵ تا ۰/۵ درصد وزن خشک گیاه می‌باشد (Malhorta *et al.*, 2018). حد بحرانی فسفر در خاک برای گیاهان مختلف ۱۰ تا ۲۰ میلی‌گرم در کیلوگرم است. براساس مطالعات انجام شده، مقدار فسفر حدود ۷۱ درصد خاک‌های کشاورزی ایران کمتر از حد بحرانی است (Shahbazi & Besharati, 2013). متداول‌ترین روش برای جبران کمبود فسفر خاک، استفاده از کودهای فسفاته می‌باشد. بخش اعظمی از کودهای فسفاته اضافه شده به خاک، طی واکنش‌های رسوبی با یون‌های آهن و آلومینیوم در خاک‌های اسیدی و با یون کلسیم در خاک‌های قلیایی و آهکی وارد فاز جامد می‌شود (Ayeni *et al.*, 2012) که نتیجه آن، مصرف بیش از پیش این کودها می‌باشد. استفاده بیش از حد کودهای شیمیایی علاوه‌بر مشکلات زیست‌محیطی و افزایش شوری خاک، از نظر اقتصادی نیز مقرون‌به‌صرفه نیست (Kang *et al.*, 2011). ازاین رو، استفاده از منابع ارزان قیمت نظیر سنگ فسفات برای تأمین فسفر مورد نیاز گیاهان رو به افزایش است. مشکل اصلی سنگ فسفات حلالیت و کارایی کم آن به‌ویژه در خاک‌های آهکی است (Naeem *et al.*, 2013).

گزارش شده است که از روش‌های افزایش کارایی سنگ فسفات و همچنین، فراهمی فسفر خاک استفاده از باکتری‌های حل‌کننده فسفات (PSB) می‌باشد. سازوکار اصلی باکتری‌های حل‌کننده فسفات در افزایش فراهمی فسفر، کاهش pH از طریق تولید پروتون، اسیدهای آلی، اسیدهای معدنی و آنزیم فسفاتاز می‌باشد (Alori *et al.*, 2017). براساس برخی مطالعات انجام شده، خصوصیات محرک رشدی باکتری‌ها نظیر توان حل‌کنندگی فسفات‌های کم محلول، در شرایط تنش‌های محیطی نظیر شوری و خشکی انجام می‌گیرد. از طرفی، باکتری‌های حل‌کننده فسفات برای فعالیت و تولید ترکیبات محرک رشدی در خاک‌های شور، می‌بایست متحمل به شوری نیز باشند. این باکتری‌ها می‌توانند تحمل گیاه به تنش شوری و کارایی کودهای فسفاته را افزایش دهند (Khan *et al.*, 2014). این باکتری‌ها توانایی تولید ترکیبات ثانویه متعدد و آنزیم‌های مختلف مانند ACC– دآمیناز را دارا هستند. آنزیم ACC– دآمیناز نقش مهمی در افزایش مقاومت گیاهان به تنش شوری و کاهش اثرات این تنش بر گیاه با تنظیم و تعدیل سطح اتیلن دارد (Glick, 2004). کاربرد باکتری‌های حل‌کننده فسفات می‌تواند مصرف کودهای فسفاته را تا ۵۰ درصد بدون تأثیر معنی‌دار بر عملکرد گیاه کاهش دهد (Jilani *et al.*, 2007). تلقیح با باکتری *سودوموناس پوتیدا* توانست با کاهش سطح اسید آبسیزیک و افزایش غلظت ایندول استیک اسید در برگ، مقاومت مرکبات به تنش شوری را افزایش دهد (Vives-Peris *et al.*, 2018). زینلی بافقی و همکاران (Zeinali Bafghi *et al.*, 2020) بیان کردند استفاده از باکتری‌های محرک رشد گیاه باعث افزایش شاخص‌های رشد گیاه، شامل وزن تر و خشک اندام‌های هوایی و ریشه، سطح برگ و تعداد برگ گیاه پسته در خاک شور شد. همچنین سرچشمه‌پور و همکاران (Sarcheshmehpour *et al.*, 2015) گزارش کردند که استفاده از ریزجانداران بومی باغات پسته توانست کارایی خاک فسفات و رشد نهال‌های پسته را در شرایط شور افزایش دهد.

در سال‌های اخیر با توجه به خصوصیات اقلیمی استان خراسان جنوبی، سطح زیر کشت پسته در این استان رو به افزایش بوده است. به‌طوری‌که براساس محصولات باغی وزارت جهاد کشاورزی در سال ۱۳۹۹ این استان دارای رتبه پنجم در سطح زیر کشت و تولید پسته در کشور می‌باشد. امّا افزایش شوری زمین‌های کشاورزی در مناطق پسته‌کاری و وضعیت ضعیف حاصلخیزی خاک آن‌ها، استقرار، رشد و عملکرد نهال‌ها و درختان پسته را با مشکل مواجه کرده است. از طرفی،

کارایی پایین کودهای فسفاته (کمتر از ۳۰ درصد) و قیمت بالای آن‌ها، یافتن منابع جایگزین تأمین فسفر را بیش از پیش ضروری ساخته است. ازاین‌رو، هدف این مطالعه بررسی تأثیر باکتری‌های حل‌کننده فسفات مقاوم به شوری در افزایش فراهمی فسفر از سنگ فسفات و بهبود رشد دانهال‌های پسته در سطوح شوری آب آبیاری می‌باشد.

مواد و روش‌ها

این پژوهش به‌صورت فاکتوریل و در قالب طرح کامل تصادفی با سه تکرار در گلخانه تحقیقاتی دانشکده کشاورزی دانشگاه بیرجند در سال ۱۴۰۰ انجام شد. فاکتورهای آزمایش شامل باکتری‌های حل‌کننده فسفات در سه سطح [شاهد (PSB_0)، باکتری *Pseudomonas sp.* 1 (PSB_1) و باکتری *Pseudomonas sp.* 2 (PSB_2)]، سنگ فسفات در دو سطح (صفر و ۳۰ میلی‌گرم فسفر در کیلوگرم خاک) و شوری آب آبیاری در سه سطح (شاهد، ۵ و ۱۰ دسی‌زیمنس بر متر از منبع NaCl) بود. باکتری‌های مورد استفاده در این پژوهش از بانک میکروبی گروه علوم و مهندسی خاک دانشکده کشاورزی دانشگاه بیرجند انتخاب شدند که قبلاً از خاک‌های شور جداسازی شده بودند. این باکتری‌ها توانایی انحلال تری کلسیم فسفات در دو محیط جامد و مایع، تولید ایندول استیک اسید، سیدروفور و آنزیم ACC- دآمیناز در شرایط آزمایشگاهی را داشتند (Azarmi *et al.*, 2015). خاک مورد استفاده در این پژوهش از یکی از مناطق کشاورزی استان خراسان جنوبی با درجه شوری مناسب انتخاب گردیده و برخی از خصوصیات فیزیکی و شیمیایی آن تعیین گردید (جدول ۱). پس از گذراندن خاک تهیه شده از الک چهار میلی‌متری، به هر گلدان دو کیلوگرم خاک همگن ریخته شد. پودر سنگ فسفات نیز که از معدن آسفوردی یزد تهیه شده بود، براساس تیمارها قبل از کاشت با خاک مخلوط شد. برای کاشت، ابتدا در هر گلدان چهار بذر جوانه زده پسته (رقم بادامی ریز زرند) در عمق سه سانتی‌متری قرار داده شد و برای جلوگیری از آلودگی دیگر تیمارها، ابتدا تیمارهای بدون تلقیح کشت شدند. برای تلقیح، روی هر بذر ۵۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتری‌های مورد نظر (آماده شده در محیط Nutrient Broth با جمعیت 10^8 سلول در میلی‌لیتر) اضافه شد. چهار هفته پس از کاشت، تعداد دانهال‌ها در هر گلدان به دو عدد کاهش داده شد. آبیاری گلدان‌ها به‌مدت چهار هفته با آب غیرشور (۱/۲۰ دسی‌زیمنس بر متر) انجام شد و پس از آن تا زمان برداشت، آبیاری با استفاده از آب‌های شور تهیه شده از نمک کلریدسدیم (NaCl) و براساس نقشه طرح انجام شد. لازم به ذکر است که در طول دوره رشد، رطوبت خاک گلدان‌ها در حدود ۸۰ درصد ظرفیت زراعی (FC) به‌روش وزنی نگهداری شد. در طول دوره رشد، دمای گلخانه در روز و شب به‌ترتیب ۲±۲۸ و ۲±۱۹ درجه سانتی‌گراد و رطوبت نسبی ۴۵ درصد بود. در انتهای دوره رشد (هفته بیستم پس از کاشت)، دانهال‌ها از محل طوقه قطع و وزن خشک اندام‌هوایی و ریشه پس از خشک کردن نمونه‌ها به‌مدت ۴۸ ساعت در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد در آون با استفاده از ترازوی دیجیتال اندازه‌گیری شد. برای اندازه‌گیری مقدار کلروفیل a و کلروفیل b، نمونه برگ تازه از برگ‌های سالم و بالغ تهیه شد. سپس ۰/۲۵ گرم از نمونه برگ تازه در هاون چینی با پنج میلی‌لیتر استون ۸۰ درصد ساییده شد تا به‌صورت محلول یکنواخت درآید. سپس نمونه‌ها به لوله‌های سانتریفوژ منتقل و به‌مدت ۱۰ دقیقه با دور ۳۵۰۰ در دقیقه سانتریفوژ شدند. در نهایت، میزان جذب نور در محلول رویی توسط اسپکتروفتومتر (Shimadzu BioSpec-1601, Japan) در طول موج‌های ۶۴۶/۴ و ۶۶۳/۶ نانومتر قرائت و غلظت کلروفیل محاسبه شد (Porra, 2002). اندازه‌گیری مقدار کاروتنوئیدها نیز در همان عصاره تهیه شده برای اندازه‌گیری کلروفیل و تعیین میزان جذب در طول موج ۴۷۰ نانومتر انجام گردید (Lichtenthaler & Wellburn, 1983). برای تعیین غلظت پرولین، نمونه تازه برگ با اتانول ۹۵ درصد ساییده شده و پس از سانتریفوژ کردن به محلول رویی معرف ناین هیدرین، اسید فسفریک و اسید استیک گلایسیال اضافه شد. سپس نمونه‌ها در حمام آب گرم قرار داده شده و پس از خنک شدن به آن‌ها بنزن اضافه گردید. در نهایت، پس از انجام واکنش، مقدار جذب در طول موج ۵۱۵ نانومتر اندازه‌گیری شد (Paquin & Lechasseur, 1979). برای اندازه‌گیری قندهای محلول، عصاره الکلی که قبلاً برای اندازه‌گیری پرولین تهیه شده بود را با آنترون تازه تهیه شده، مخلوط کرده و به‌مدت ۱۰ دقیقه در حمام آب‌گرم قرار داده شد تا واکنش انجام و محلول رنگی شود. پس از خنک شدن، میزان جذب آن با استفاده از اسپکتروفتومتر در طول موج ۶۲۵ نانومتر شد (Irigoyen *et al.*, 1992). برای تعیین مقدار نسبی آب برگ (RWC)، ۰/۵ گرم از نمونه در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر قرار داده شد. پس از مدت چهار ساعت، وزن برگ در حالت تورژسانس اندازه‌گیری گردید. پس از آن، نمونه‌ها در دمای ۷۰ درجه سلسیوس درون آون خشک شده و مقدار RWC از معادله زیر محاسبه شد (Gonzalez & Gonzalez-Vilar, 2003):

RWC (%) = [(وزن خشک – وزن تازه)/(وزن خشک – وزن آماس)]×100

برای اندازه‌گیری شاخص پایداری غشا (MSI) از هر برگ دو نمونه تهیه و در ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر قرار داده شد. یک نمونه در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۳۰ دقیقه (EC_1) و نمونه دیگری در دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۱۵ دقیقه (EC_2) درون حمام آب قرار داده شدند. سپس هدایت الکتریکی نمونه‌ها اندازه‌گیری و از معادله زیر مقدار این شاخص محاسبه شد (Sairam, 1994):

$$MSI = [1 - (EC_1/EC_2)] \times 100$$

برای اندازه‌گیری غلظت عناصر فسفر و سدیم در برگ و ریشه، نمونه‌ها در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد خشک و سپس، درون کوره با دمای ۵۰۰ درجه سانتی‌گراد خاکستر شدند. سپس نمونه‌های خاکستر شده با استفاده از اسیدکلریدریک دو نرمال عصاره‌گیری شده و برای تهیه عصاره شفاف از کاغذ صافی عبور داده شدند. در نهایت، غلظت سدیم با استفاده از فلیم فتومتر و غلظت فسفر به‌روش مولیبدات–وانادات با استفاده از اسپکتروفوتومتر تعیین شدند. (Chapman & Pratt, 1961).

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SAS انجام شد. مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون LSD در سطح احتمال یک و پنج درصد انجام گرفت. برای رسم نمودارها نیز از نرم‌افزار Excel استفاده شد.

جدول ۱- ویژگی‌های خاک مورد استفاده در آزمایش

Table 1- The properties of the soil used in this experiment

بافت خاک Texture	pH	هدایت الکتریکی EC (dS.m^-1^)	مواد آلی Organic matter (%)	درصد اشباع Saturated percentage	فسفر P	پتاسیم K	سدیم Na	کلسیم Ca	منیزیم Mg
					(mg.kg^{-1})		(mg.l^{-1})		
Sandy Loam	7.50	1.40	0.57	30	7.12	179	168	112	91

نتایج و بحث

وزن خشک اندام هوایی و ریشه

نتایج تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که اثرات اصلی و متقابل باکتری‌های حل‌کننده فسفات، سنگ فسفات و شوری آب آبیاری بر وزن خشک اندام هوایی و ریشه دانهال‌های پسته معنی‌دار ($p<0.05$) شد (جدول ۲). نتایج آزمایش مشخص کرد که افزایش شوری آب آبیاری به ۵ و ۱۰ دسی زیمنس بر متر وزن خشک اندام هوایی را به‌ترتیب ۱۴ و ۳۶ درصد و وزن خشک ریشه را به‌ترتیب ۱۷ و ۵۸ درصد در مقایسه با شاهد کاهش داد (جدول ۳). نتایج بیانگر واکنش شدید ریشه نسبت به اندام هوایی دانهال‌های پسته در برابر شوری است. در محیط‌های شور به‌دلیل اثرات منفی پتانسیل اسمزی پایین محلول خاک و جذب کم آب و عناصر غذایی و تأثیر سوء شوری بر فتوسنتز و فرآیندهای جانبی آن، انرژی لازم برای رشد مناسب ریشه و اندام هوایی در اختیار آن‌ها قرار نمی‌گیرد. شوری طولانی‌مدت موجب پیری زودرس برگ‌های بالغ و کاهش شدید رشد گیاه می‌شود (Munns and Tester, 2008). کاهش رشد پارامترهای رویشی گیاه از جمله وزن خشک نهال‌های پسته تحت تنش شوری توسط پژوهشگران مختلف گزارش شده است (Ferguson *et al.*, 2002 Azarmi *et al.*, 2016;). کاربرد تنهای سنگ فسفات تأثیر معنی‌داری به‌ویژه در شرایط شور بر وزن خشک دانهال‌های پسته نشان نداد. از طرفی، تلقیح با باکتری‌های حل‌کننده فسفات PSB_1 و PSB_2 وزن خشک اندام هوایی را در تمام سطوح شوری نسبت به همان سطح شوری افزایش معنی‌داری داد. امّا در وزن خشک ریشه، فقط کاربرد PSB_2 براین پارامتر در تمام سطوح شوری مؤثر بود. با توجه به نتایج به‌دست آمده، کاربرد هم‌زمان سنگ فسفات با هر دو سویه موجب افزایش معنی‌دار وزن خشک اندام هوایی و ریشه دانهال‌های پسته در تمام سطوح شوری در مقایسه با همان سطح شوری گردید. اگرچه کارایی باکتری PSB_2 در این افزایش بیشتر از باکتری PSB_1 بود. بیشترین وزن خشک اندام هوایی و ریشه دانهال‌ها به‌ترتیب برابر ۱/۸۹ و ۱/۵۹ گرم بر نهال بود که از کاربرد هم‌زمان سنگ فسفات و PSB_2 در شرایط غیرشور حاصل گردید (جدول ۳). باکتری‌های جنس *سودوموناس* به‌دلیل تولید طیف وسیعی از ترکیبات مختلف و تحریک رشد گیاهان در خاک‌های شور، نقش مهمی در افزایش حاصلخیزی خاک و کاهش تنش شوری در گیاه دارند (Mishra *et al.*, 2010). با توجه به تولید هورمون اسید ایندول استیک (IAA) و انحلال فرم‌های کم‌محلول فسفر توسط باکتری‌های مورد استفاده در این پژوهش، می‌توان بهبود رشد دانهال‌ها را به آن‌ها نسبت داد. اکسین تولید شده توسط این باکتری‌ها می‌تواند به‌صورت مستقیم موجب افزایش تقسیم و رشد سلول شده و یا به‌صورت غیرمستقیم موجب افزایش تولید آنزیم ACC–دآمیناز شود (Patten & Glick, 2002). به نظر می‌رسد که هورمون اکسین و آنزیم ACC–دآمیناز در افزایش رشد گیاه مکمل یکدیگر هستند. شاهارونا و همکاران (Shaharroona *et al.*, 2006) گزارش کردند که تلقیح با باکتری‌های محرک رشد گیاه تولیدکننده IAA موجب افزایش وزن ریشه، رشد طولی و انشعابات فرعی ریشه و تولید ریشه‌های نازک‌تر شده و در نتیجه، جذب آب و عناصر غذایی را افزایش می‌دهند.

جدول ۲- تجزیه واریانس (میانگین مربعات) اثر باکتری‌های حل‌کننده فسفات و سنگ فسفات بر رشد و برخی ویژگی‌های فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی دانهال‌های پسته در سطوح مختلف شوری آب آبیاری

Table 2- ANOVA (mean squares) for the effect of PGPR on the growth, physiological and biochemical traits of pistachio seedlings irrigated by different levels of water salinity

منابع تغییر S.O.V	درجه آزادی df	وزن خشک اندام‌هوایی Shoot dry weight	وزن خشک ریشه Root dry weight	کلروفیل a Chlorophyll a	کلروفیل b Chlorophyll b	کاروتنوئید Carotenoids	قندهای محلول برگ Leaf soluble sugars	پرولین برگ Leaf proline
سنگ فسفات Rock phosphate (RP)	1	0.96**	0.34**	0.015*	0.003ns	0.10**	1568**	208**
باکتری Bacteria (PSB)	2	0.56**	0.44**	0.48**	0.28**	0.14**	579**	493**
شوری Salinity (S)	2	1.74**	2.47**	1.23**	1.64**	1.16**	1275**	1617**
RP × PSB	2	0.005ns	0.044**	0.003ns	0.003ns	0.005*	73.7**	10.5*
RP × PSB	2	0.006ns	0.020**	0.043**	0.004*	0.007**	104**	1.49ns
PSB × S	4	0.064**	0.050**	0.030**	0.016**	0.008**	6.24ns	33.6**
RP × PSB × S	4	0.010*	0.009*	0.002ns	0.003*	0.005**	36.2**	8.08*
خطا Error	36	0.004	0.003	0.003	0.0009	0.0008	9.46	2.87
ضریب تغییرات CV (%)		5.54	6.65	3.79	3.63	2.93	8.69	9.93

منابع تغییر S.O.V	درجه آزادی df	مقدار نسبی آب برگ RWC	شاخص پایداری غشا MSI	غلظت فسفر اندام‌هوایی Shoot P concentration	غلظت فسفر ریشه Root P concentration	غلظت سدیم اندام هوایی Shoot Na concentration	غلظت سدیم ریشه Root Na concentration
سنگ فسفات Rock phosphate (RP)	1	222*	642**	0.064**	0.008**	0.0006ns	0.003*
باکتری Bacteria (PSB)	2	1070**	1181**	0.13**	0.063**	0.41**	0.036*
شوری Salinity (S)	2	1882**	3193**	0.059**	0.041**	0.416**	0.175**
RP × PSB	2	4.61ns	10.2 ns	0.013**	0.002**	0.0001ns	0.0002ns
RP × PSB	2	7.03ns	42.7**	0.002*	0.0002ns	0.018**	0.004**
PSB × S	4	54.9**	40.2**	0.004**	0.0008**	0.003**	0.001*
RP × PSB × S	4	19.4*	18.2*	0.002**	0.0005*	0.0008ns	0.0001ns
خطا Error	36	6.95	5.84	0.0004	0.0001	0.0007	0.0004
ضریب تغییرات CV (%)		3.89	4.45	10.2	6.33	9.03	6.28

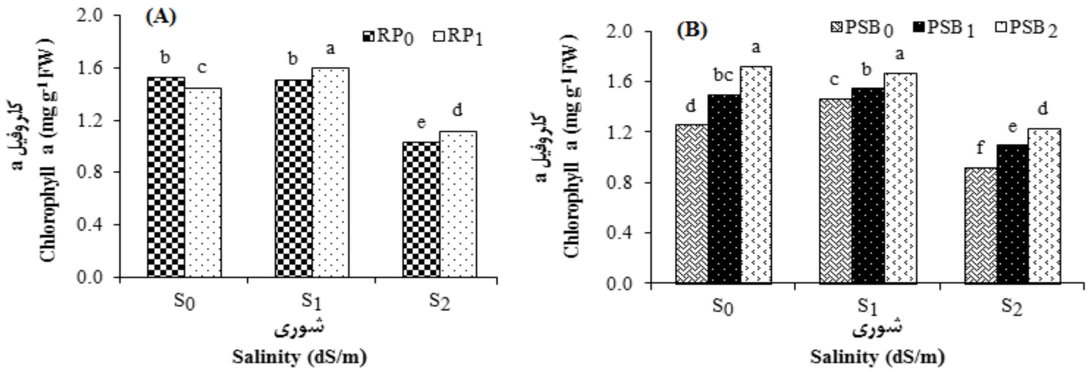
ns، ** و * به‌ترتیب عدم معنی‌داری، معنی‌داری در سطح احتمال ۱ و ۵ درصد.

ns, ** and *: non-significant, and significant at $p \leq 0.01$ and $p \leq 0.05$, respectively.

RWC: Relative Water Content, MSI: Membrane Stability Index

مقدار کلروفیل a، کلروفیل b و کاروتنوئیدها

نتایج آزمایش بیانگر تأثیر معنی‌دار اثرات اصلی باکتری‌های حل‌کننده فسفات، سنگ فسفات و شوری آب آبیاری و همچنین برهم‌کنش سنگ فسفات و شوری و برهم‌کنش باکتری و شوری بر مقدار کلروفیل a برگ ($p<0.01$) بود (جدول ۲). نتایج نشان داد اگرچه سطح شوری ۵ دسی زیمنس بر متر اثر معنی‌داری بر کلروفیل a نداشت، امّا با افزایش شوری آب آبیاری به ۱۰ دسی زیمنس بر متر، مقدار این پارامتر ۳۲ درصد کاهش یافت. غلظت کلروفیل در گیاهان رشد کرده تحت تنش می‌تواند معیار مناسبی برای تخمین مقاومت آن به تنش باشد. کاهش مقدار کلروفیل در شرایط شور می‌تواند به‌دلیل اثر بازدارندگی یون‌های سدیم و کلر در بیوسنتز رنگیزه‌ها، تخریب سنتز و یا تشدید تجزیه آن‌ها باشد (Ashraf & Harris, 2013). کاهش رنگدانه‌های فتوسنتزی تحت تأثیر شوری ممکن است ناشی از کاهش سنتز کمپلکس اصلی رنگدانه کلروفیل، تخریب نوری کمپلکس پروتئینی رنگدانه‌های a و b که محافظت‌کننده دستگاه فتوسنتزی هستند، آسیب اکسیداتیو لیپیدهای کلروپلاست، رنگدانه‌ها و پروتئین‌ها یا افزایش فعالیت آنزیم کلروفیلاز باشد (Egert & Tevini, 2002). کاربرد سنگ فسفات در شرایط غیرشور موجب کاهش، ولی در شرایط شور موجب افزایش معنی‌دار کلروفیل a نسبت به همان سطح شوری گردید (شکل ۱-A). کمبود فسفر می‌تواند با محدود کردن رشد ریشه، جذب عناصر غذایی مختلف مانند نیتروژن را کاهش داده و بدین‌ترتیب موجب کاهش سطح رنگدانه‌های فتوسنتزی در برگ شود (Fageria *et al.*, 2009). همچنین براساس نتایج برهم‌کنش باکتری و شوری، کاربرد هر دو سویه باکتری غلظت کلروفیل a را در تمام سطوح شوری در مقایسه با همان سطح شوری افزایش داد. کمترین مقدار غلظت این پارامتر از سطح شوری ۱۰ دسی‌زیمنس بر متر (۰/۹۱ میلی‌گرم بر گرم وزن تر) و بیشترین آن از تلقیح باکتری PSB_2 در شرایط غیرشور (۱/۷۲ میلی‌گرم بر گرم وزن تر) به‌دست آمد که با تیمار کاربرد باکتری PSB_1 در سطح شوری ۵ دسی‌زیمنس بر متر اختلاف معنی‌داری نداشت (شکل ۱-B). باکتری‌ها با توسعه ریشه و افزایش دسترسی به آب و عناصر غذایی، کارایی مصرف آب در محیط شور را افزایش داده و در نتیجه، تأثیر شوری بر فتوسنتز را کاهش می‌دهند. ماراته و همکاران (Marathe *et al.*, 2017) بیان کردند که استفاده از باکتری‌های حل‌کننده فسفات تولیدکننده IAA (*سودوموناس ایروژینوزا*) توانست جذب نیتروژن، پتاسیم و فسفر و غلظت کلروفیل در گیاه را افزایش دهد.



شکل ۱- برهم‌کنش سنگ فسفات × شوری آب آبیاری (A) و باکتری‌های حل‌کننده فسفات × شوری آب آبیاری (B) بر محتوای کلروفیل a برگ دانهال‌های پسته

Figure 1- The interaction effects of rock phosphate ×salinity (A), and PSB ×salinity (B) on the leaf chlorophyll a content of pistachio seedlings (LSD, $p\leq 0.05$)

نتایج تجزیه واریانس داده‌ها حاکی از معنی‌دار بودن ($p<0.05$) اثرات اصلی و متقابل باکتری‌های حل‌کننده فسفات، سنگ فسفات و شوری آب آبیاری بر مقدار کلروفیل b و کاروتنوئید برگ دانهال‌های پسته داشت (جدول ۲). نتایج نشان داد که با افزایش شوری آب آبیاری به ۵ و ۱۰ دسی زیمنس بر متر، غلظت کلروفیل b به‌طور معنی‌داری کاهش یافت. معمولاً نقش کلروفیل a نسبت به b در فتوسنتز گیاهان غالب‌تر است، امّا تنش شوری موجب نزدیک‌تر شدن ارزش آن‌ها به‌هم می‌شود (Mane *et al.*, 2011). موسوی و همکاران (Mousavi *et al.*, 2008) نشان دادند که افزایش غلظت کلرید سدیم از ۴۰ به ۱۶۰ میلی‌مولار موجب کاهش کلروفیل a، b و a+b در درختان زیتون شد. کریمی و همکاران (Karimi *et al.*, 2009) نشان دادند که با افزایش شوری میزان فتوسنتز خالص در دو رقم پسته بادامی و قزوینی کاهش یافت. همچنین در مقادیر بالای شوری غلظت کلروفیل a، b و کلروفیل کل در هر دو رقم کاهش نشان داد. کاربرد تنهای سنگ فسفات نیز

تأثیر معنی‌داری بر مقدار این پارامتر در هیچ‌کدام از سطوح شوری نشان نداد. از طرفی، تلقیح با باکتری PSB_1 و در سطوح شوری صفر و ۵ دسی‌زیمنس بر متر و تلقیح با باکتری PSB_2 در تمام سطوح شوری مقدار کلروفیل b را در مقایسه با همان سطح شوری به‌طور معنی‌داری افزایش داد. همچنین کاربرد همزمان هر دو سویه با سنگ فسفات موجب افزایش معنی‌دار این پارامتر در تمام سطوح شوری گردید. هرچند، بیشترین مقدار کلروفیل b از تلقیح باکتری PSB_2 در شرایط غیرشور برابر با ۱/۳۰ میلی‌گرم بر گرم وزن تر به‌دست آمد (جدول ۳). افزایش غلظت کلروفیل در نهال‌های تلقیح شده با باکتری‌ها می‌تواند به‌دلیل افزایش جذب عناصر غذایی دخیل در ساختار کلروفیل از جمله منیزیم، آهن و منگنز باشد. هم‌چنین باکتری‌ها کارایی مصرف آب را در محیط شور افزایش داده و بدین ترتیب، تأثیر شوری بر فتوسنتز را کاهش می‌دهند. باکتری‌ها علاوه‌بر افزایش فراهمی فسفر خاک، با تأثیر بر مورفولوژی ریشه، جذب فسفر و غلظت کلروفیل را افزایش می‌دهند. الهایسوفی و همکاران (Elhaissoufi *et al.*, 2020) نشان دادند که کاربرد باکتری‌های حل‌کننده فسفات همراه با سنگ فسفات مقدار کلروفیل a و b را در گندم افزایش داد.

باتوجه به نتایج این آزمایش، مقدار کاروتنوئیدهای برگ با افزایش شوری آب آبیاری به ۵ و ۱۰ دسی زیمنس بر متر به‌ترتیب ۱۷ و ۴۶ درصد نسبت به شاهد در همان سطح شوری کاهش یافت. کاروتنوئیدها علاوه‌بر دخالت مستقیم در فرآیند فتوسنتز، در افزایش مقاومت سیستم‌های دفاعی گیاهان برابر تنش‌های اکسیداتیو نیز نقش دارند (Parida & Das, 2005). از طرفی، اگرچه کاربرد تنهای سنگ فسفات فقط در سطح شوری ۵ دسی زیمنس بر متر موجب افزایش معنی‌دار این پارامتر شد، امّا کاربرد همزمان سنگ فسفات با باکتری‌ها غلظت کاروتنوئیدها را در تمام سطوح شوری نسبت به همان سطح شوری به طور معنی‌داری افزایش داد. بیشترین مقدار کاروتنوئیدهای برگ مربوط به کاربرد باکتری در شرایط غیرشور (۱/۳۵ میلی‌گرم بر گرم وزن تر) و کمترین مقدار آن مربوط به سطح شوری ۱۰ دسی زیمنس بر متر (۰/۵۸ میلی‌گرم بر گرم وزن تر) بود (جدول ۳). آذرمی و همکاران (Azarmi *et al.*, 2016) گزارش کردند که تلقیح نهال‌های پسته با باکتری‌های سودوموناس فلوروسنت موجب افزایش رشد و غلظت کاروتنوئیدهای برگ در شرایط شور گردید. همچنین افزایش غلظت کلروفیل و کاروتنوئیدها در نهال‌های برنج تلقیح شده با باکتری *Bacillus* spp. گزارش شده است (Khan *et al.*, 2021).

جدول ۳- اثر متقابل باکتری‌های حل‌کننده فسفات و سنگ فسفات بر وزن خشک اندام هوایی و ریشه و محتوای کلروفیل b و کاروتنوئیدهای برگ دانهال‌های پسته در سطوح مختلف شوری آب آبیاری

Table 3- The interaction effect of rock phosphate ×PSB on the shoot and root dry weight, and chlorophyll b and carotenoids contents of pistachio seedlings irrigated by different levels of water salinity

باکتری Bacteria	سنگ فسفات Rock phosphate	شوری Salinity ($dS.m^{-1}$) 0	5	10	شوری Salinity ($dS.m^{-1}$) 0	5	10
		وزن خشک اندام هوایی Shoot dry weight ($g.plant^{-1}$)			وزن خشک ریشه Root dry weight ($g.plant^{-1}$)		
PSB_0	RP_0	0.96 fg	0.82 hi	0.61 k	0.87 ef	0.72 g	0.36 i
	RP_1	1.01 f	0.98 fg	0.67 jk	1.10 d	0.75 g	0.40 i
PSB_1	RP_0	1.32 cd	1.15 e	0.75 ij	1.21 c	0.81 fg	0.44 i
	RP_1	1.53 b	1.26 d	0.92 gh	1.45 b	1.09 d	0.74 g
PSB_2	RP_0	1.49 b	1.14 e	0.74 ij	1.36 b	0.86 ef	0.58 h
	RP_1	1.89 a	1.34 c	1.02 f	1.59 a	0.91 e	0.62 h
		کلروفیل b Chlorophyll b ($mg.g^{-1}$ FW)			کاروتنوئید Carotenoids ($mg.g^{-1}$ FW)		
PSB_0	RP_0	0.92 e	0.71 g	0.45 k	1.08 ef	0.89 i	0.58 m
	RP_1	0.91 e	0.73 g	0.43 kl	1.12 de	0.94 h	0.60 m
PSB_1	RP_0	1.13 c	0.84 f	0.49 jk	1.29 b	1.01 g	0.71 k
	RP_1	1.15 c	0.90 e	0.53 ij	1.35 a	1.14 d	0.79 j
PSB_2	RP_0	1.30 a	0.93 de	0.56 i	1.20 c	0.94 h	0.66 l
	RP_1	1.24 b	0.97 d	0.62 h	1.23 c	1.05 fg	0.88 i

برای هر صفت میانگین‌هایی که حداقل یک حرف مشترک دارند در سطح احتمال ۵ درصد بر اساس آزمون LSD اختلاف معنی‌داری ندارند.

Values followed by different letters have significant difference according to LSD test at $p<0.05$.

مقدار قندهای محلول و پرولین برگ

نتایج تجزیه واریانس داده‌ها حاکی از معنی‌دار بودن اثرات اصلی و متقابل باکتری‌های حل‌کننده فسفات، سنگ فسفات و شوری آب آبیاری بر مقدار قندهای محلول ($p<0.01$) و پرولین برگ ($p<0.05$) دانهال‌های پسته بود (جدول ۲). با توجه به نتایج مقایسه میانگین‌ها، آبیاری با هر دو سطح شوری آب آبیاری موجب افزایش غلظت قندهای محلول برگ گردید. تجمع قندهای محلول مانند ساکارز در بافت‌های گیاهی تحت شرایط تنش به‌عنوان تنظیم‌کننده اسمزی عمل می‌کند. علاوه‌براین، این ترکیبات می‌توانند با درشت مولکول‌های درون سلول برهم‌کنش داشته و موجب افزایش پایداری و عملکرد آن‌ها شوند (Murakeozy *et al.*, 2003). کریمی و همکاران (Karimi *et al.*, 2009) دلیل تجمع قندهای محلول با افزایش شوری را کاهش میزان فتوسنتز، تبدیل نشاسته به قند و یا مصرف کمتر کربوهیدرات توسط گیاه گزارش کردند. براساس نتایج این پژوهش، کاربرد تنهای سنگ فسفات در هیچ‌کدام از سطوح شوری بر این پارامتر تأثیر معنی‌داری نشان نداد. همچنین، اگرچه کاربرد تنهای باکتری PSB_1 تأثیر معنی‌داری بر مقدار قندهای محلول برگ در هیچ‌کدام از سطوح شوری آب نداشت، امّا کاربرد باکتری PSB_2 موجب افزایش ۸۰ و ۲۴ درصدی مقدار این پارامتر به‌ترتیب در سطوح شوری صفر و ۵ دسی زیمنس بر متر شد. به هر حال، بیشترین تأثیر بر مقدار قندهای محلول را کاربرد هم‌زمان سنگ فسفات و باکتری داشت. به‌طوری‌که بیشترین مقدار این پارامتر (۵۹/۱ میلی‌گرم بر گرم وزن تر) از کاربرد هم‌زمان باکتری PSB_2 و سنگ فسفات در سطح شوری ۱۰ دسی‌زیمنس بر متر و کمترین مقدار آن (۱۴/۶ میلی‌گرم بر گرم وزن تر) از شاهد به‌دست آمد (جدول ۴). افزایش قندهای محلول در گیاهان تلقیح شده با ریزجانداران خاکزی به بهبود وضعیت تغذیه‌ای گیاهان نسبت داده می‌شود. مطالعات نشان داده است که تلقیح با باکتری‌ها از جمله *سودوموناس‌ها* موجب افزایش غلظت و جذب فسفر در گیاه می‌شود. فسفر نقش کلیدی در انتقال انرژی و شکستن کربوهیدرات‌ها دارد (Demir, 2004). از طرفی، تلقیح با این باکتری‌ها سطح هورمون‌های گیاهی مانند سیتوکینین و جیبرلین را در گیاه افزایش می‌دهد که این هورمون‌ها می‌توانند با افزایش انتقال یون‌های مؤثر در باز شدن روزنه‌ها و تنظیم سطح کلروفیل، موجب افزایش سرعت فتوسنتز و در نهایت، محتوای قندهای محلول در گیاهان شوند (Selvaraj & Chellappan, 2006).

براساس نتایج به‌دست آمده، شوری موجب تجمع پرولین در برگ دانهال‌های پسته گردید. به‌طوری‌که در سطح شوری آب ۱۰ دسی زیمنس بر متر، مقدار این پارامتر نسبت به شاهد ۳/۴ برابر افزایش نشان داد. پرولین احتمالاً در سلول‌های تحت تنش، نقش آنتی‌اکسیدانی دارد و با تجمع در سیتوپلاسم سلول‌ها از طریق کاهش پتانسیل اسمزی درون سلولی، تجمع نمک در واکوئل را تنظیم می‌کند (Akhkha *et al.*, 2011). افزایش تجمع پرولین در نهال‌های پسته تحت تنش شوری توسط بهزادی راد و همکاران (Behzadi Rad *et al.*, 2021) نیز گزارش شده است. کاربرد سنگ فسفات نیز فقط در سطح شوری ۱۰ دسی‌زینس بر متر بر مقدار پرولین برگ اثر معنی‌دار داشت که موجب افزایش غلظت آن شد. شهریاری‌پور و همکاران (Shahriaripour *et al.*, 2011) گزارش کردند که کاربرد فسفر موجب کاهش غلظت پرولین برگ نهال‌های پسته در سطوح مختلف شوری شد. همچنین تلقیح با باکتری PSB_2 مقدار پرولین برگ را در سطوح شوری صفر، ۵ و ۱۰ دسی‌زیمنس بر متر به‌ترتیب ۷۴، ۶۹ و ۹۴ درصد نسبت به همان سطح شوری افزایش معنی‌دار داد. از طرفی، کاربرد هم‌زمان باکتری‌ها با سنگ فسفات تأثیر بیشتری بر مقدار پرولین برگ داشت. بیشترین مقدار این پارامتر (۳۶/۷ میلی‌گرم بر گرم وزن تر) از کاربرد هم‌زمان سنگ فسفات و باکتری PSB_2 در سطح شوری ۱۰ دی زیمنس بر متر به‌دست آمد که با کاربرد تنهای باکتری PSB_2 در سطح شوری ۱۰ دی زیمنس بر متر اختلاف معنی‌داری نداشت (جدول ۴). سویه‌های مختلف باکتری‌های محرک رشد گیاه با افزایش سنتز پرولین در گیاهان رشد کرده در شرایط تنش موجب حفظ آب سلول می‌شوند (Sziderics *et al.*, 2007). افزایش غلظت پرولین در گیاهان تلقیح شده با این باکتری‌ها را می‌توان به تنظیم مسیرهای سنتز پرولین برای حفظ سطح بالای آن در درون سلول نسبت داد. آذرمی و همکاران (Azarmi *et al.*, 2016) نیز نشان دادند که باکتری‌های محرک رشد گیاه موجب افزایش پرولین در برگ نهال‌های پسته شد.

مقدار نسبی آب (RWC) و شاخص پایداری غشای (MSI) برگ

با توجه به نتایج تجزیه واریانس داده‌ها، اثرات اصلی و متقابل باکتری‌های حل‌کننده فسفات، سنگ فسفات و شوری آب آبیاری بر مقدار نسبی آب و شاخص پایداری غشای برگ دانهال‌های پسته معنی‌دار ($p<0.05$) شد (جدول ۲). نتایج مقایسه میانگین‌ها نشان داد که اعمال شوری آب آبیاری ۵ و ۱۰ دسی زیمنس بر متر موجب کاهش ۱۰ و ۳۱ درصدی مقدار نسبی آب برگ نسبت به شاهد شد. مقدار RWC گیاه شاخصی مناسب برای ارزیابی وضعیت آب گیاه و تعیین تحمل آن به تنش شوری است. با توجه به افزایش غلظت یون سدیم در برگ دانهال‌های پسته با افزایش شوری، کاهش آب در برگ دانهال ها با افزایش شوری را می‌توان به تجمع یون سدیم در برگ‌ها نسبت داد. از طرفی، کاربرد تنهای سنگ فسفات نیز فقط در سطح شوری ۵ دسی‌زیمنس بر متر بر مقدار این پارامتر تأثیر معنی‌دار داشت که باعث افزایش هشت درصدی آن نسبت همان سطح شوری گردید. تلقیح با

هر دو سویه PSB_1 و PSB_2 نیز موجب افزایش معنی‌دار مقدار نسبی آب برگ در تمام سطوح شوری آب شد. اگرچه، کارایی سویه PSB_2 در مقایسه با سویه PSB_1 در این تأثیر بیشتر بود. کاربرد همزمان سنگ فسفات و باکتری‌ها بیشترین تأثیر را در افزایش این پارامتر داشت. به‌طوری‌که کاربرد همزمان سنگ فسفات و باکتری PSB_2 مقدار نسبی آب برگ را در سطوح شوری صفر، ۵ و ۱۰ دسی‌زیمنس بر متر به‌ترتیب ۳۴، ۱۹ و ۵۲ درصد نسبت به همان سطح شوری افزایش داد (جدول ۴). یکی از بارزترین خصوصیات محرک رشدی باکتری‌های جنس *سودوموناس* تولید هورمون اکسین است. نتایج تحقیقات مختلف نشان داده است که اکسین موجب افزایش رشد ریشه‌های جانبی و در نتیجه، حجم و طول ریشه گیاه می‌شود. با توجه به افزایش وزن ریشه دانهال-های پسته تلقیح شده با باکتری‌های *سودوموناس* تولیدکننده اکسین در این پژوهش، افزایش مقدار آب در برگ دانهال‌ها را می‌توان به افزایش ریشه‌های مویین و در نتیجه، دسترسی بهتر و بیشتر به آب به‌ویژه در شرایط شور نسبت داد. مایاک و همکاران (Mayak *et al.*, 2004) گزارش کردند که باکتری‌های محرک رشد گیاه می‌توانند با بهبود کارایی مصرف و مقدار آب گیاه موجب افزایش ریشه‌زایی و در نتیجه، رشد آن در شرایط تنش شوند. افزایش مقدار RWC در برگ نهال‌های پسته (Azarmi *et al.*, 2016) و توت فرنگی (Karlidag *et al.*, 2013) تلقیح شده با کاربرد باکتری‌های محرک رشد گیاه در شرایط شور نیز گزارش شده است.

براساس نتایج، مقدار شاخص پایداری غشای برگ با افزایش شوری آب آبیاری به ۵ و ۱۰ دسی‌زیمنس بر متر به‌ترتیب ۹ و ۳۲ درصد نسبت به شاهد کاهش نشان داد. یکی از مهم‌ترین اثرات شوری بر گیاه کاهش استحکام غشا و تخریب آن است. پراکسیداسیون لیپیدهای غشا نشان دهنده آسیب به غشای سلولی و در نتیجه، افزایش نفوذپذیری آن تحت تنش شوری است (Katsuhara *et al.*, 2005). از طرفی، کاربرد تنهای سنگ فسفات فقط در شرایط غیرشور موجب افزایش معنی‌دار این پارامتر گردید. هر چند تلقیح با هر دو سویه PSB_1 و PSB_2 موجب افزایش معنی‌دار شاخص پایداری غشا در تمام سطوح شوری نسبت به همان سطح شوری شد که از نظر آماری اختلافی بین دو سویه مشاهده نشد. به هر حال، کاربرد همزمان باکتری و سنگ فسفات تأثیر بیشتری در افزایش این شاخص داشت که نقش سویه PSB_1 در این افزایش بیشتر از سویه PSB_2 بود.

جدول ٤- اثر متقابل باکتری‌های حل‌کننده فسفات×سنگ فسفات بر مقدار قندهای محلول، پرولین، مقدار نسبی آب و پایداری غشای برگ دانهال‌های پسته در سطوح مختلف شوری آب آبیاری

Table 4- The interaction effect of rock phosphate ×PSB on the soluble sugars, proline, RWC and MSI content of pistachio seedlings leaf irrigated by different levels of water salinity

باکتری Bacteria	سنگ فسفات Rock phosphate	شوری Salinity (dS.m^{-1}) 0	5	10	شوری Salinity (dS.m^{-1}) 0	5	10
		قندهای محلول برگ Leaf soluble sugars (mg.g^{-1} FW)			پرولین برگ Leaf proline (mg.g^{-1} FW)		
PSB_0	RP_0	14.6 k	23.1 ij	31.5 efg	5.22 h	9.73 efg	17.5 d
	RP_1	17.5 jk	27.5 ghi	33.1 ef	5.89 h	11.6 ef	21.5 c
PSB_1	RP_0	18.9 jk	24.5 hi	28.9 fgh	7.36 gh	12.3 e	24.1 c
	RP_1	24.4 hi	35.0 de	47.2 b	10.0 efg	16.6 d	31.0 b
PSB_2	RP_0	26.3 hi	28.7 fgh	35.6 de	9.13 fg	16.5 d	34.0 a
	RP_1	33.0 ef	41.7 c	59.1 a	15.9 d	22.0 c	36.7 a
		مقدار نسبی آب برگ RWC (%)			شاخص پایداری غشا MSI (%)		
PSB_0	RP_0	68.0 ef	61.1 g	46.5 i	50.1 f	45.6 gh	33.9 k
	RP_1	71.0 de	66.2 f	47.9 i	63.3 c	49.2 fg	35.0 jk
PSB_1	RP_0	73.5 cd	68.0 ef	56.1 h	73.2 b	59.2 d	41.8 hi
	RP_1	77.3 c	71.5 de	60.3 gh	84.0 a	64.5 c	51.7 f
PSB_2	RP_0	84.2 b	73.4 cd	61.3 g	64.0 c	51.9 ef	38.0 ij
	RP_1	91.0 a	72.7 d	70.6 de	70.9 b	55.8 de	45.3 gh

برای هر صفت میانگین‌هایی که حداقل یک حرف مشترک دارند در سطح احتمال ۵ درصد بر اساس آزمون LSD اختلاف معنی‌داری ندارند.

Values followed by different letters have significant difference according to LSD test at $p<0.05$.
RWC: Relative Water Content, MSI: Membrane Stability Index

بیشترین مقدار شاخص پایداری غشا (۸۴ درصد) از کاربرد همزمان سنگ فسفات و سویه PSB_1 در شرایط غیرشور و کمترین مقدار آن از سطح شوری ۱۰ دسی‌زیمنس بر متر (۳۳/۹ درصد) به‌دست آمد (جدول ۴). باکتری‌های محرک رشد گیاه با افزایش قابلیت جذب عناصر غذایی و آب و همچنین تولید متابولیت‌های مختلف از جمله اکسین و آنزیم ACC–دآمیناز موجب بهبود وضعیت تغذیه‌ای گیاه شده و در نتیجه، با

کاهش غلظت گونه‌های فعال اکسیژن و رادیکال‌های آزاد، استحکام غشای سلولی را افزایش می‌دهند. گزارش شده است که مقدار MSI در گیاه توت فرنگی تلقیح شده با باکتری‌های محرک رشد گیاه تحت تنش شوری افزایش یافت (Karlding *et al.*, 2013).

غلظت فسفر اندام هوایی و ریشه

نتایج تجزیه واریانس داده‌ها بیانگر معنی‌دار بودن اثرات اصلی و متقابل باکتری‌های حل‌کننده فسفات، سنگ فسفات و شوری آب آبیاری بر غلظت فسفر اندام هوایی ($p<0.01$) و ریشه ($p<0.05$) دانهال‌های پسته بود (جدول ۲). با توجه به نتایج این آزمایش، اگرچه غلظت فسفر اندام هوایی فقط تحت تأثیر شوری ۱۰ دسی‌زیمنس بر متر قرار گرفت (کاهش ۴۲ درصدی)، امّا غلظت فسفر ریشه با اعمال هر دو سطح شوری آب ۵ و ۱۰ دسی‌زیمنس بر متر به‌ترتیب ۲۵ و ۵۳ درصد به‌طور معنی‌داری نسبت به شاهد کاهش یافت (جدول ۵). برخی پژوهشگران گزارش کرده‌اند که شوری خاک موجب کاهش جذب فسفر توسط گیاه می‌شود. به عقیده آن‌ها فسفر در شرایط شور با کاتیون‌های Ca^{2+}، Mg^{2+} و Zn^{2+} واکنش داده و به‌صورت غیرقابل دسترس برای گیاه در خاک تثبیت می‌شود (Cantrell & Lindermann, 2001). از سوی دیگر، کاهش مقدار فسفر قابل‌جذب در خاک‌های شور می‌تواند به اثر یون مشترک که باعث کاهش فعالیت یون فسفات و تشکیل کانی‌های فسفات کلسیم که غلظت فسفر خاک را در سطح پایینی نگه می‌دارد، مربوط باشد. کاهش جذب فسفر در برگ و ریشه نهال‌های پسته توسط اسکندری و مظفری (Eskandari & Mozaffari, 2014) گزارش شده است. در مقابل، کاربرد تنهای سنگ فسفات فقط بر مقدار فسفر ریشه در سطح شوری ۱۰ دسی‌زیمنس بر متر اثر معنی‌دار داشت که آن را ۳۳ درصد نسبت به همان سطح شوری افزایش داد. براساس نتایج به‌دست آمده، تلقیح با هر دو سویه PSB_1 و PSB_2 مقدار فسفر اندام هوایی و ریشه دانهال‌های پسته را در تمام سطوح شوری در مقایسه با همان سطح شوری به‌طور معنی‌داری افزایش داد. هرچند، مقدار این افزایش در اثر کاربرد سویه PSB_2 بیشتر از کاربرد سویه PSB_1 بود. تلقیح با سویه PSB_2 در سطوح شوری صفر، ۵ و ۱۰ دسی زیمنس بر متر غلظت فسفر اندام هوایی را به‌ترتیب ۹۱، ۸۷ و ۱۴۲ درصد و غلظت فسفر ریشه را به‌ترتیب ۵۲، ۷۸ و ۱۰۰ درصد در مقایسه با همان سطح شوری افزایش معنی‌دار داد. به هر حال، بیشترین غلظت فسفر اندام هوایی (۰/۴۱ درصد) از کاربرد همزمان سنگ فسفات و PSB_2 در سطح شوری ۵ دسی‌زیمنس بر متر و بیشترین غلظت فسفر ریشه (۰/۳۵ درصد) از کاربرد همزمان سنگ فسفات و PSB_2 در شرایط غیرشور به‌دست آمد (جدول ۵). مطالعات نشان داده است که بیش از ۹۰ درصد فسفر به‌ویژه در خاک‌های شور از دسترس گیاه خارج است. از طرفی، فراهمی فسفر آلی خاک برای گیاه بیشتر از فسفر معدنی با قابلیت انحلال پایین است. فسفر آلی می‌تواند با فعالیت جمعیت میکروبی خاک به‌صورت قابل‌جذب برای گیاه تبدیل شود. انحلال و فراهمی فسفر خاک توسط جمعیت میکروبی به نوع منبع فسفاتی (آلی یا معدنی)، نوع گیاه میزبان، جمعیت میکروبی، pH و ترکیب آنیون‌ها و کاتیون‌ها بستگی دارد (Niu *et al.*, 2010). پاتل و همکاران (Patel *et al.*, 2012) گزارش کردند که باکتری‌های جدا شده از خاک‌های شور، فسفر محلول خاک را افزایش دادند. بنابراین استفاده از باکتری های حل‌کننده فسفات، نقش مهمی در افزایش فسفر قابل جذب گیاه در خاک‌های شور دارد. براساس مطالعات آزمایشگاهی، باکتری‌های استفاده شده در این پژوهش توانایی انحلال تری کلسیم فسفات را به عنوان منبع نامحلول فسفر دارا بودند. از دیگر اثرات مهم ریزجانداران حل‌کننده‌ی فسفات از جمله *سودوموناس*‌ها در افزایش فراهمی فسفر قابل استفاده، افزایش ریشه‌زایی گیاه می‌باشد. باکتری‌های *سودوموناس* بر قابلیت ارتجاع ریشه مؤثر بوده و با افزایش انشعابات ریشه و تارهای کشنده، جذب عناصر غذایی را افزایش می‌دهند (De.freitas & Germida, 1990).

غلظت سدیم اندام هوایی و ریشه

نتایج تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که اثرات اصلی باکتری و شوری آب آبیاری و همچنین اثرات متقابل سنگ فسفات و شوری آب آبیاری، و باکتری‌های حل‌کننده فسفات و شوری بر غلظت سدیم اندام هوایی دانهال‌های پسته معنی‌دار ($p<0.01$) شد (جدول ۲). نتایج مقایسه میانگین اثر متقابل سنگ فسفات و شوری آب آبیاری نشان داد که با افزایش شوری آب به ۵ و ۱۰ دسی‌زیمنس بر متر، غلظت سدیم اندام هوایی به‌ترتیب ۲/۱ و ۳/۵ برابر نسبت به شاهد افزایش یافت (شکل ۲-A).

جدول ۵- اثر متقابل باکتری‌های حل‌کننده فسفات × سنگ فسفات بر محتوای فسفر اندام هوایی و ریشه دانهال‌های پسته در سطوح مختلف شوری آب آبیاری

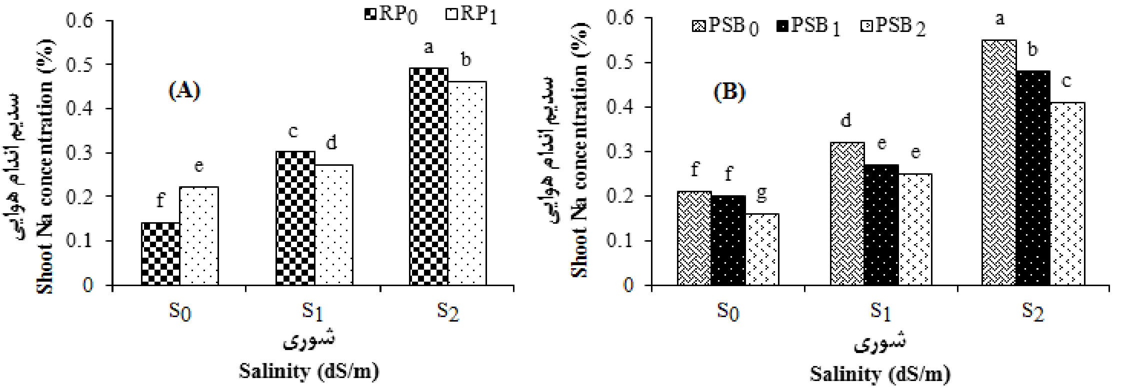
Table 5- The interaction effect of rock phosphate ×PSB on the shoot and root phosphorus content of pistachio seedlings irrigated by different levels of water salinity

باکتری Bacteria	سنگ فسفات Rock phosphate	شوری Salinity (dS.m⁻¹) فسفر اندام هوایی Shoot P (%)			شوری Salinity (dS.m⁻¹) فسفر ریشه Root P (%)		
		0	5	10	0	5	10
PSB_0	RP_0	0.12 gh	0.15 fg	0.07 i	0.19 fg	0.14 j	0.09 l
	RP_1	0.10 hi	0.17 f	0.10 hi	0.18 gh	0.15 ij	0.12 k
PSB_1	RP_0	0.16 f	0.20 e	0.11 h	0.22 e	0.17 gh	0.14 ij
	RP_1	0.25 cd	0.31 b	0.16 f	0.26 cd	0.20 ef	0.16 hi
PSB_2	RP_0	0.23 de	0.28 bc	0.17 f	0.29 b	0.25 d	0.18 gh
	RP_1	0.39 a	0.41 a	0.23 de	0.35 a	0.27 bc	0.22 e

برای هر صفت میانگین‌هایی که حداقل یک حرف مشترک دارند در سطح احتمال ۵ درصد بر اساس آزمون LSD اختلاف معنی‌داری ندارند.

Values followed by different letters have significant difference according to LSD test at $p<0.05$.

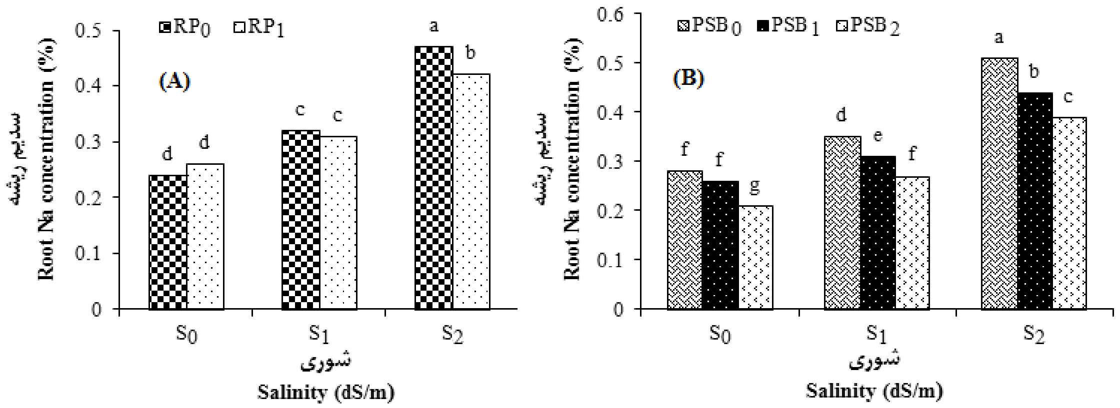
از مهم‌ترین اثرات تنش شوری بر گیاهان انباشت یون‌های سمی در اندام‌های مختلف آن‌ها به‌ویژه برگ‌ها می‌باشد. هرچند مقاومت گیاه پسته به تنش شوری نسبتاً بالاست، ولی با افزایش غلظت سدیم در محیط رشد ریشه، توانایی ریشه برای کنترل و تجمع سدیم در خود کاهش یافته و در نتیجه، انتقال آن به اندام هوایی افزایش می‌یابد. به‌طور کلی، به‌دلیل تجمع عناصر سمی مانند سدیم و کلر در اندام‌هوایی گیاهان، آسیب‌پذیری برگ‌ها نسبت به ریشه در برابر این عناصر بیشتر است. در مطالعه‌ای بر روی دو پایه پسته (سرخس و قزوینی) مشخص شد که با افزایش شوری، غلظت سدیم در اندام‌هوایی هر دو پایه به‌طور قابل‌ملاحظه‌ای افزایش یافت، هرچند غلظت سدیم در پایه سرخس بیشتر از پایه قزوینی بود (Saadatmand *et al.*, 2007). براساس مطالعات بهزادی راد و همکاران (Behzadi Rad *et al.*, 2021)، شوری موجب افزایش غلظت سدیم در اندام هوایی و ریشه سه رقم نهال پسته (قزوینی، قرمز پسته و موتیکا) مورد بررسی گردید، هرچند تجمع این عنصر در اندام‌هوایی هر سه رقم بیشتر از ریشه بود. همچنین براساس نتایج آن‌ها، تجمع سدیم در گونه حساس به شوری (موتیکا) بیشتر از گونه‌های مقاوم بود. از طرفی، کاربرد سنگ فسفات در شرایط غیرشور موجب افزایش و در شرایط شور موجب کاهش سدیم اندام هوایی نسبت به همان سطح شوری شد (شکل ۲-A). همچنین با توجه به نتایج برهم‌کنش باکتری‌های حل‌کننده فسفات و شوری آب، تلقیح با هر دو سویه PSB_1 و PSB_2 موجب کاهش غلظت سدیم اندام هوایی در شرایط شور نسبت به همان سطح شوری شد. هرچند، کارایی سویه PSB_2 در کاهش این پارامتر بیشتر از سویه PSB_1 بود. تلقیح با باکتری PSB_2 در سطوح شوری صفر، ۵ و ۱۰ دسی‌زیمنس بر متر، مقدار سدیم اندام هوایی را به‌ترتیب ۲۳، ۲۱ و ۲۵ درصد نسبت به همان سطح شوری کاهش داد (شکل ۲-B).



شکل ۲- برهم‌کنش سنگ فسفات × شوری آب آبیاری (A) و باکتری‌های حل‌کننده فسفات × شوری آب آبیاری (B) بر محتوای سدیم اندام هوایی دانهال‌های پسته

Figure 2- The interaction effects of rock phosphate ×salinity (A), and PSB ×salinity (B) on the shoot Na content of pistachio seedlings (LSD, *p≤0.05*)

غلظت سدیم ریشه تحت تأثیر معنی‌دار (p<0.01) اثرات اصلی باکتری‌های حل‌کننده فسفات، سنگ فسفات و شوری آب آبیاری و همچنین اثرات متقابل سنگ فسفات و شوری آب آبیاری، و باکتری‌های حل‌کننده فسفات و شوری آب آبیاری قرار گرفت (جدول ۲). براساس نتایج برهم‌کنش سنگ فسفات و شوری آب، کاربرد سنگ فسفات فقط در سطح شوری ۱۰ دسی‌زیمنس بر متر بر مقدار سدیم ریشه مؤثر بود که موجب کاهش ۱۱ درصدی این پارامتر نسبت به همان سطح شوری شد (شکل ۳-A). تلقیح با باکتری‌ها نیز به‌ویژه در شرایط شور موجب کاهش سدیم ریشه شد. تلقیح با سویه‌های PSB_1 و PSB_2 غلظت سدیم ریشه را در سطح شوری ۵ دسی‌زیمنس بر متر به‌ترتیب ۱۰ و ۲۳ درصد و در سطح شوری ۱۰ دسی‌زیمنس بر متر به‌ترتیب ۱۴ و ۲۴ درصد در مقایسه با همان سطح شوری کاهش داد (شکل ۳-B). باکتری‌های محرک رشد گیاه می‌توانند با تولید اگزوپلی ساکاریدها با کاتیون‌هایی نظیر سدیم پیوند برقرار کرده و فراهمی آن را برای گیاه کاهش دهند. از طرفی، کاهش جذب سدیم در گیاهان تلقیح شده با باکتری‌ها می‌تواند به کاهش جریان انبوه (آپوپلاستی) سدیم مربوط باشد (Ashraf *et al.*, 2004).



شکل ۳- برهم‌کنش سنگ فسفات × شوری آب آبیاری (A) و باکتری‌های حل‌کننده فسفات × شوری آب آبیاری (B) بر غلظت سدیم ریشه دانهال‌های پسته

Figure 3- The interaction effects of rock phosphate ×salinity (A), and PSB ×salinity (B) on the root Na content of pistachio seedlings (LSD, *p≤0.05*)

نتیجه‌گیری

اگرچه درختان پسته (به‌ویژه رقم بادامی) مقاومت نسبتاً بالایی به شوری خاک و آب دارند، ولی حد تحمل نهال‌های پسته به تنش شوری کمتر است. با توجه به نتایج این پژوهش، علائم شوری در سطح شوری آب ۱۰ دسی‌زیمنس بر متر در برگ‌های دانهال‌ها نمایان بود که موجب خشکیدگی برگ‌های پایین و سوختگی حاشیه و نوک برگ‌های جوان گردید. بنابراین، این نکته در زمان کاشت نهال‌های پسته در اراضی با خاک و آب شور (به‌ویژه در کاشت مستقیم بذر در خاک باغات) می‌بایست مورد توجه قرار گیرد. از طرفی، کاربرد سنگ فسفات همراه با تلقیح با باکتری‌های حل‌کننده فسفات موجب افزایش رشد، تجمع پرولین و قندهای محلول، غلظت کلروفیل و کاروتنوئیدها، مقدار آب نسبی و پایداری غشا و غلظت فسفر دانهال‌های پسته به‌ویژه در شرایط شور شد. باکتری‌های مورد استفاده در این پژوهش توانایی تولید ترکیبات محرک رشدی و مقاومت به تنش شوری در شرایط آزمایشگاهی را دارا بودند. بهبود رشد و افزایش مقاومت در برابر تنش شوری در دانهال‌های تلقیح شده با باکتری‌ها را می‌توان به تولید هورمون ایندول استیک اسید، اسیدهای آلی و پروتون و آنزیم ACC-دآمیناز توسط این باکتری‌ها نسبت داد. ایندول استیک اسید و آنزیم ACC- دآمیناز ترشح شده توسط باکتری‌ها موجب تحریک ریشه‌زایی و افزایش رشد ریشه می‌گردد. از طرفی، تولید اسیدهای آلی و پروتون باعث کاهش اسیدیته محیط و افزایش فراهمی عناصری مانند فسفر به‌ویژه از سنگ فسفات می‌شود. بنابراین، افزایش رشد ریشه و فراهمی عناصر غذایی در محیط ریشه دانهال‌های تلقیح شده با باکتری‌ها، مقدار جذب آب و عناصر غذایی در دانهال‌ها را افزایش داده و موجب بهبود رشد و مقاومت آن‌ها در شرایط تنش می‌گردد. افزایش وزن خشک اندام هوایی و ریشه دانهال‌های تیمار شده با باکتری‌ها و سنگ فسفات در این پژوهش تأییدکننده موارد فوق است. از طرفی، کاهش آثار تنش شوری نظیر خشک شدن برگ‌ها و سوختگی حاشیه برگ‌ها در دانهال‌های تیمار شده با باکتری‌ها و سنگ فسفات نیز به‌صورت ظاهری مشاهده شد. بنابراین، استفاده از باکتری‌های حل‌کننده فسفات می‌تواند به رشد و استقرار دانهال‌های پسته در شرایط تنش شوری و افزایش کارایی سنگ فسفات و تأمین فسفر مورد نیاز دانهال‌ها کمک کند.

References

1- Akhkha, A., Boutra, T., & Alhejely, A. (2011). The rates of photosynthesis chlorophyll content, dark respiration, proline and abscicic acid (ABA) in wheat (*Triticum durum*) under water deficit conditions. *International Journal of Agricultural and Biology*, *13*, 215-221.

2- Alori, E.T., Glick, B.R. & Babalola, O.O. (2017). Microbial phosphorus solubilization and its potential for use in sustainable agriculture. *Frontiers in Microbiology*, *8*, 971. https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00971

3- Ashraf, M., & Harris, P.J.C. (2013). Photosynthesis under stressful environments: An overview. *Photosynthetica*, *51*, 163-190. https://doi.org/10.1007/s11099-013-0021-6

4- Ashraf, M., Hasnain, S., Berge, O., & Mahmood, T. (2004). Inoculating wheat seedlings with exopolysaccharide-producing bacteria restricts sodium uptake and stimulates plant growth under salt stress. *Biology and Fertility of Soils*, *40*, 157-162. https://doi.org/10.1007/s00374-004-0766-y

5- Ayeni, L.S., Adeleye, E.O., & Adejumo, J.O. (2012). Comparative effect of organic, organomineral and mineral fertilizers on soil properties, nutrient uptake, growth and yield of maize (*Zea mays*). *International Research Journal of Agricultural Science and Soil Science*, *2*(11), 493-497. https://doi.org/10.13140/RG.2.2.15371.18721

6- Azarmi, F., Mozafari, V., Abbaszadeh-Dahaji, P., & Hamidpour, M. (2015). Isolation and evaluation of plant growth promoting indices of *Pseudomonas fluorescens* isolated from pistachio rhizosphere. *Journal of Soil Biology*, *2*(2), 173-186. https://doi.org/10.22092/sbj.2015.100867

7- Azarmi, F., Mozafari, V., Abbaszadeh-Dahaji, P., & Hamidpour, M. (2016). Biochemical, physiological and antioxidant enzymatic activity responses of pistachio seedlings treated with plant growth promoting rhizobacteria and Zn to salinity stress. *Acta Physiologiae Plantarum*, *38*, 21. https://doi.org/10.1007/s11738-015-2032-3

8- Behzadi Rad, P., Roozban, M.R., Karimi, S., Ghahremani, R., & Vahdati, K. (2021). Osmolyte accumulation and sodium compartmentation key role in salinity tolerance of pistachios rootstocks. *Agriculture*, *11*, 708. https://doi.org/10.3390/agriculture11080708

9- Cantrell, I.C., & Linderman, R.G. (2001). Pre-inoculation of lettuce and onion with VA mycorrhizal fungi reduces deleterious effects of soil salinity. *Plant and Soil*, *233*, 269-281. https://doi.org/10.1023/A:1010564013601

10- Chapman, H.D., & Pratt, P.F. (1961). Methods of analysis for soils, plants and waters. University of California, Riverside.

11- De-Freitas, J.R., & Germida, J.J. (1990). A root tissue culture system to study winter wheat-rhizobacteria interactions. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *33*, 589-595. https://doi.org/10.1007/BF00172557

12- Demir, S. (2004. Influence of arbuscular mycorrhiza on some physiological growth parameters of pepper. *Turkish Journal of Biology*, *28*, 85-90.

13- Egert, M., & Tevini, M. (2002). Influence of drought on some physiological parameters symptomatic for oxidative stress in leaves of chives (*Allium schoenoprasum*). *Environmental and Experimental Botany*, *48*, 43-49. https://doi.org/10.1016/S0098-8472(02)00008-4

14- Elhaissoufi, W., Khourchi, S., Ibnyasser, A., Ghoulam, C., Rchiad, Z., Zeroual, Y., Lyamlouli, K., & Bargaz, A. (2020). Phosphate solubilizing rhizobacteria could have a stronger influence on wheat root traits and above ground physiology than rhizosphere P solubilization. *Frontiers in Plant Science*, *11*, 979. https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00979

15- Eskandari, S., & Mozaffari, V. (2014). Interactive effect of soil salinity and copper application on growth and chemical composition of pistachio seedlings (cv. Badami). *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, *45*, 688-702. https://doi.org/10.1080/00103624.2013.874022

16- Fageria, N.K., Filho, M.P., Barbosa Moreira, A., & Guimarães, C.M. (2009). Foliar fertilization of crop plants. *Journal of Plant Nutrition*, *32*(6), 1044-1064. https://doi.org/10.1080/01904160902872826

17- FAOSTAT. (2020). Food and agriculture organization of the United Nations. Retrieved from FAOSTAT database. http://ww1.faostat.org/ Accessed on 22 June 2020.

18- Ferguson, L., Poss, J.A., Grattan, S.R., Grieve, G.M., Wang, D., Wilson, C., Donovan, T.J. & Chao, C.T. (2002). Pistachio rootstocks influence scion growth and ion relations under salinity and boron stress. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, *127*, 194-199. https://doi.org/10.21273/JASHS.127.2.194

19- Glick, B.R. (2004). Bacterial ACC deaminase and the alleviation of plant stress. *Advances in Applied Microbiology*, *56*, 291-312. https://doi.org/10.1016/S0065-2164(04)56009-4

20- Gonzalez, L., & Gonzalez-Vilar, M. (2003). Determination of Relative Water Content. In: M.J. Reigosa (Ed.) Handbook of plantecophysiology techniques. Dordrecht: Kluwer Academic, p. 207-212

21- Grattan, S.R., & Grieve, C.M. (1999). Salinity-mineral nutrient relations in horticultural crops. *Scientia Horticulture*, *78*, 127 157. https://doi.org/10.1016/S0304-4238(98)00192-7

22- Iqbal, M., & Ashraf, M. (2013). Alleviation of salinity-induced perturbations in ionic and hormonal concentrations in spring wheat through seed preconditioning in synthetic auxins. *Acta Physiologiae Plantarum*, *35*, 1093-1112. https://doi.org/10.1007/s11738-012-1147-z

23- Irigoyen, J.J., Emerich, D.W., & Sanchez-Diaz, M. (1992). Water stress induced changes in concentrations of proline and total soluble sugars in nodulated alfalfa (*Medicago sativa*) plants. *Physiologia Plantarum, 84*, 55-60. https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1992.tb08764.x
24- Jilani, G., Akram, A., Ali, R.M., Hafeez, F.Y., Shamsi, I.H., Chaudhry, A.N. & Chaudhry, A.G. (2007). Enhancing crop growth, nutrients availability, economics and beneficial rhizosphere microflora through organic and biofertilizers. *Annals of Microbiolgy, 57*, 177-183. https://doi.org/10.1007/BF03175204
25- Kang, J., Amoozegar, A., Hesterberg, D., & Osmond, D.L. (2011). Phosphorus leaching in a sandy soil as affected by organic and incomposted cattle manure. *Geoderma, 161*, 194-201. https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2010.12.019
26- Karimi, S., Rahemi, M., Maftoun, M., Eshghi, S., & Tavallali, V. (2009). Effect of long–term salinity on growth and performance of two pistachio (*Pistacia vera* L.) rootstocks. *Australian Journal of Crop Science, 3*, 1630-1639.
27- Karlidag, H., Yildirim, E., Turan, M., Pehluvan, M., & Donmez, F. (2013). Plant growth-promoting rhizobacteria mitigate deleterious effects of salt stress on strawberry plants (*Fragaria× ananassa*). *HortScience, 48*(5), 563-567. https://doi.org/10.21273/HORTSCI.48.5.563
28- Katsuhara, M., Otsuka, T. & Ezaki, B. (2005). Salt stress-induced lipid peroxidation is reduced by glutathione S-transferase, but this reduction of lipid peroxides is not enough for a recovery of root growth in *Arabidopsis*. *Plant Science, 169*, 369-373. https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2005.03.030
29- Khan, M.S., Zaidi, A., & Ahmad, E. (2014). Mechanism of phosphate solubilization and physiological functions of phosphate-solubilizing microorganisms, Phosphate Solubilizing Microorganisms. Springer, pp. 31-62.
30- Khan, MA., Hamayun, M., Asaf, S., Khan, M., Yun, B.W., Kang, S.M., & Lee, I.J. (2021). Rhizospheric *Bacillus spp*. rescues plant growth under salinity stress via regulating gene expression, endogenous hormones, and antioxidant system of *Oryza sativa* L. *Frontiers in Plant Science, 12*, 665590. https://doi.org/10.3389/fpls.2021.665590
31- Lichtenthaler, H.K., & Wellburn, A.R. (1983). Determinations of total carotenoids and chlorophylls a and b of leaf extracts in different solvents. *Biochemical Society Transactions, 11*, 591-592. https://doi.org/10.1042/bst0110591
32- Malhotra, H., Vandana, S., Harma, S., & Pandey, R. (2018). Phosphorus nutrition: Plant growth in response to deficiency and excess" in Plant Nutrients and Abiotic Stress Tolerance. M. Hasanuzzaman M. Fujita H. Oku K. Nahar and B. Hawrylak-Nowak (Eds) (Singapore: Springer Singapore), 171-190.
33- Mane, A.V., Deshpande, T.V., Wagh, V.B., Karadge, B.A., & Samant, J.S. (2011). A critical review on physiological changes associated with reference to salinity. *International Journal of Environmental Sciences*, 1192-1216.
34- Marathe, R., Phatake, Y., Shaikh, A., Shinde, B., & Gajbhiye, M. (2017). Effect of IAA produced by *Pseudomonas aeruginosa* 6a (bc4) on seed germination and plant growth of *Glycin max*. *Journal Experimental Biology and Agriculture Sciences, 5*, 351-358. https://doi.org/10.18006/2017.5(3).351.358
35- Mayak, S., Tirosh, T., & Glick, B.R. (2004). Plant growth-promoting bacteria confer resistance in tomato plants to salt stress. *Plant physiology and Biochemistry, 42*(6), 565-572. https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2004.05.009
36- Meloni, D.A., Oliva, M.A., Ruiz, H.A. & Martinez, C.A. (2001). Contribution of proline and inorganic solutes to osmotic adjustment in cotton under salt stress. *Journal of Plant Nutrition, 24*, 599- 668. https://doi.org/10.1081/PLN-100104983
37- Mishra, M., Kumar, U., Mishra, P.K., & Prakash, P. (2010). Efficiency of plant growth promoting rhizobacteria for the enhancement of *Cicer arietinum* L. growth and germination under salinity. *Advances in Biological Research, 4*, 92-96.
38- Mousavi, A., Lessani, H., Babalar, M., Talaei, A.R., & Fallahi, E. (2008). Influence of salinity on chlorophyll, leaf water potential, total soluble sugars, and mineral nutrients in two young olive cultivars. *Journal of Plant Nutrition, 31*, 1906-1916. https://doi.org/10.1080/01904160802402807
39- Munns, R., & Tester, M. (2008). Mechanisms of salinity tolerance. *Annual Review of Plant Biology, 59*, 651-681. https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.59.032607.092911
40- Murakeozy, E.P., Nagy, Z., Duhaze, C., Bouchereau, A., & Tuba, Z. (2003). Seasonal changes in the levels of compatible osmolytes in three halophytic species of inland saline vegetation in Hungary. *Journal of Plant Physiology, 160*, 395-401. https://doi.org/10.1078/0176-1617-00790
41- Naeem, A., Akhtar, M. & Ahmad, W. (2013). Optimizing available phosphorus in calcareous soils fertilized with diammonium phosphate and phosphoric acid using Freundlich adsorption isotherm. *The Scientific World Journal 2013*, 680257. http://dx.doi.org/10.1155/2013/680257
42- Niu, S., Wu, M., Han, Y.I., Xia, J., Zhang, Z., Yang, H. & Wan, S. (2010). Nitrogen effects on net ecosystem carbon exchange in a temperate steppe. *Global Change Biology, 16*, 144-155. https://doi.org/10.1111/j.1365-2486.2009.01894.x
43- Paquin, R., & Lechasseur, P. (1979). Observations on measurement method of free proline in extracts from plants. *Canadian Journal of Botany, 57*, 1851-1854. https://doi.org/10.1139/b79-233
44- Parida, A.K., & Das, A.B. (2005). Salt tolerance and salinity effects on plants: A review. *Ecotoxicology Environmental Safety, 60*, 324-349. https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2004.06.010

45- Patel, D., Jha, C.K., Tank, N., & Saraf, M. (2012). Growth enhancement of chickpea in saline soils using plant growth-promoting rhizobacteria. *Journal of Plant Growth Regulation*, *31*, 53-62. https://doi.org/10.1007/s00344-011-9219-7
46- Patten, C.L., & Glick, B.R. (2002). Role of *Pseudomonas putida* indole acetic acid in development of the host plant root system. *Applied Environmental Microbiology*, *68*, 3795-3801. https://doi.org/10.1128/AEM.68.8.3795-3801.2002
47- Paul, D., & Nair, S. (2008). Stress adaptations in a plant growth promoting rhizobacterium (PGPR) with increasing salinity in the coastal agricultural soils. *Journal of Basic Microbiology*, *48*, 1-7. https://doi.org/10.1002/jobm.200700365
48- Porra, R.J. (2002). The chequered history of the development and use of simultaneous equations for the accurate determination of chlorophylls a and b. *Photosynthesis Research*, *73*, 149-156. https://doi.org/10.1007/1-4020-3324-9-56
49- Razaq, M., Zhang, P., Shen, H., & Salahuddin (2017). Influence of nitrogen and phosphorous on the growth and root morphology of *Acer mono*. *Plos One*, *12*(2), e0171321. https://doi.org/10.1371/journal
50- Saadatmand A.R., Banihashemi Z., Maftoun M. & Sepaskhah, A.R. (2007). Interactive effect of soil salinity and water stress on growth and chemical compositions of pistachio nut tree. *Journal of Plant Nutrition*, *30*, 2037-2050. https://doi.org/10.1080/01904160701700483
51- Sairam, R.K. (1994). Effect of moisture stress on physiological activities of two contrasting wheat genotypes. *Indian Journal of Experimental Biology*, *32*, 584-593.
52- Sarcheshmehpour, M., Besharati, H., & Savaghebi, G.R. (2015). Increasing the efficiency of rock phosphate by some indigenous microorganisms of pistachio orchards to improve growth and nutrition of pistachio seedlings under salt stress. *Iranian Journal of Soil Research*, *29*(3), 371-381. https://doi.org/10.22092/IJSR.2015.103511
53- Selvaraj, T., & Chellappan, P. (2006). Arbuscular mycorrhizae: A diverse personality. *Journal of Central European Agriculture*, *7*, 349-358.
54- Shaharroona, B., Arshad, M., Zahir, Z.A., & Khalid, A. (2006). Performance of *Pseudomonas spp.* containing ACC-Deaminase for improving growth and yield of maize (*Zea mays* L.) in the presence of nitrogenous fertilizer. *Soil Biology and Biochemistry*, *38*, 2971-2975. https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2006.03.024
55- Shahbazi, K., & Besharati, H. (2013). Overview of agricultural soil fertility status of Iran. *Journal of Land Management*, *1*, 1-15. https://doi.org/10.22092/LMJ.2013.100072
56- Shahriaripour, R., Tajabadi Pour, A., & Mozaffari, V. (2011). Effects of salinity and soil phosphorus application on growth and chemical composition of pistachio seedlings. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, *42*, 144-158. https://doi.org/10.1080/00103624.2011.535065
57- Sziderics, A.H., Rasche, F., Trognitz, F., Wilhelm, E. & Sessitsch, A. (2007). Bacterial endophytes contribute to abiotic stress adaptation in pepper plants (*Capsicum annuum* L.). *Canadian Journal of Microbiology*, *53*, 1195-1202. https://doi.org/10.1139/W07-082
58- Tavallali, V., Rahemi, M., & Kholdebarin, B. (2009). Ameliorative effect of zinc on pistachio (*Pistacia vera* L.) growth under salt-affected soil condition. *Research Journal of Environmental Science*, *3*, 656-666. https://doi.org/10.3923/rjes.2009.656.666
59- Vives-Peris, V., Gomez-Cadenas, A., & Perez-Clemente, R.M. (2018). Salt stress alleviation in citrus plants by plant growth-promoting rhizobacteria *Pseudomonas putida* and *Novosphingobium* sp. *Plant Cell Reports*, *37*, 1557-1569. https://doi.org/10.1007/s00299-018-2328-z
60- Zeinali Bafghi, M., Gholamnezhad, J., Esmailzadeh-Hosseini, S.A., Shirmardi, M., & Jafari, A. (2020). Influence of growth promoting bacteria on growth and physiological traits of pistachio in saline soils. *Horticultural Plants Nutrition*, *2*(2), 107-129. (In Persian with English abstract). https://doi.org/10.22070/HPN.2020.4548.1030

Journal of Horticultural Science
https://jhs.um.ac.ir

Research Article
Vol. 38, No. 2, Summer 2024, p. 321-337

Assessments of Humic Acid Soil Application and Deficit Irrigation on Growth, Fruit Quality and Water Use Efficiency of *Physalis peruviana* L.

S.A.H. Mousavi[1], F. Nekounam[2*], T. Barzegar[3], Z. Ghahremani[3], J. Nikbakht[4]

1, 2, and 3- Former M.Sc. Student, Assistant Professor, Associate Professor and Associate Professor, Department of Horticultural Science, Faculty of Agriculture, University of Zanjan, Zanjan, Iran, respectively.

(*- Corresponding Author Email: nekounam@znu.ac.ir)

4- Associate Professor, Department of Water Engineering, Faculty of Agriculture, University of Zanjan, Zanjan, Iran

Received:	05-01-2023	**How to cite this article:**
Revised:	04-03-2023	Mousavi, S.A.H., Nekounam, F., Barzegar, T., Ghahremani, Z., & Nikbakht, J. (2024). Assessments of humic acid soil application and deficit irrigation on growth, fruit quality and water use efficiency of *Physalis peruviana* L.. *Journal of Horticultural Science, 38*(2), 321-337. (In Persian with English abstract). https://doi.org/10.22067/jhs.2023.80428.1226
Accepted:	12-03-2023	
Available Online:	12-03-2023	

Introduction

Physalis peruviana L. is a short perennial shrub that is a member of the Solanaceae family. These fruits have many benefits for human health because of their nutritional and bioactive compounds (vitamins (A, B, C and K), essential fats and etc.) and reduced the risk of diseases such as cancer, malaria, asthma, hepatitis, dermatitis and rheumatism. Therefore, it has received special attention for cultivation all over the world. Increasing crop production and mitigating abiotic stresses are major challenges under extreme climatic environments and intense farming activities. Crop management strategies such as deficit irrigation can decrease soil evaporation, runoff, and plant transpiration, and increase water use efficiency (WUE) and water conservation. In addition to these practices, organic input, which includes the application of organic materials such as compost and humic substances, is an additional strategy that increases soil water retention and can potentially improve plant WUE. Water is crucial for agriculture and needs to be used effectively due to climate change and drought in Iran. For this reason, to adapt to water deficit scenarios, deficit irrigation applications are increasing in importance. Water availability is expected to be a growth limiting factor that would affect fruit yield in *Physalis peruviana* due to reduced flower set and elevated floral abscission rate.

Materials and Methods

In order to investigate the effect of humic acid on physiological characteristics, yield and fruit quality of *Physalis peruviana* under deficit irrigation conditions, a split plot experiment based on randomized complete block design with three replications was conducted during 2021. Treatments consisted arrangement of three levels of irrigation (starting irrigation at 100, 80 and 60% ETc (crop evapotranspiration)) and three levels of humic acid (0, 1.5 and 3 kg ha^{-1}). The seeds of *Physalis peruviana* were sown in seedling trays contain peat moss. The seedlings were grown under normal conditions (25±2 °C/day and 20±2 °C at night with 60-65% RH). Plant height, total chlorophyll, fruit yield per plant, total soluble solid content, titratable acidity, vitamin C content and water use efficiency were measured. Statistical analyses were performed with SAS V9.3, and means comparison were separated by Duncan's multiple range tests at $p < 0.05$.

Results and Discussion

The results showed that deficit irrigation significantly reduced growth, fruit yield, vitamin C and increased

©2023 The author(s). This is an open access article distributed under Creative Commons Attribution 4.0 International License (CC BY 4.0).

https://doi.org/10.22067/jhs.2023.80428.1226

water use efficiency (WUE) and Total soluble solid content of *Physalis peruviana*. The soil application of humic acid significantly increased total chlorophyll, fruit quality and yield, and decreased leaf electrolyte leakage under normal and deficit irrigation, thus, the deficit irrigation 60 ETc% decreased the plant height by 18.6% and the fruit yield by 22.2% compared to irrigation 100 ETc%. The maximum plant length (200.3 cm), total chlorophyll content (2.42 mg g^{-1}FW) and fruit yield (4793.3 kg ha^{-1}) were observed in plants treated with 3 kg ha^{-1} humic acid under 100% ETc irrigation. The highest value of total soluble solid (12.6 B°), antioxidant activity (90.06 %) and WUE (1.23 kg m^{-3}) were obtained with 3 kg ha^{-1} soil application of humic acid under deficit irrigation 60% ETc. The application of 3 kg ha-^{1} humic acid under 100 and 80 %ETc irrigation increased the fruit yield by 25% and 4%, respectively, compared to the control plants (non treated with humic acid) under irrigation100 ETc% and under deficit irrigation 60 ETc%, with decreasing 11% fruit yield, water consumption was saved by 40%. Soil and crop management practices that alter plant water and nutrient availability could affect the processes of crop evapotranspiration and WUE, which can influence the yield and fruit quality by changing the internal nutrient and water balance. Incorporating organic matter within a crop growth system either as leaf spray or soil mix is a complementary strategy to improve crop growth and WUE. By inducing antioxidant enzyme activities, HS could assist plants in stomata functioning, thereby closing stomata more efficiently under drought stress, which results in plant water conservation. The reason of the difference between WUE values probably appeared due to the differences on *Physalis peruviana* yield. WUE showed an upward trend with an increasing in irrigation.

Conclusion

Study results suggest that soil application of humic acid with increasing vitamin C, TSS and TA, improved fruit quality. According to the results, application of 3 kg ha^{-1} humic acid is suggested to improve fruit yield and quality of *Physalis peruviana* under normal and deficit irrigation conditions.

Keywords: Total chlorophyll, Total soluble solid, Vitamin C, Water use efficiency

نشریه علوم باغبانی
https://jhs.um.ac.ir

مقاله پژوهشی
جلد ۳۸، شماره ۲، تابستان ۱۴۰۳، ص. ۳۳۷-۳۲۱

ارزیابی کاربرد خاکی اسید هیومیک و تنش کم‌آبیاری بر رشد، خواص کیفی میوه و کارآیی مصرف آب عروسک پشت پرده (*Physalis peruviana* L.)

سید امیر حسین موسوی[۱]- فاطمه نکونام[۲]*- طاهر برزگر[۳]- زهرا قهرمانی[۳]- جعفر نیکبخت[۴]

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۱۰/۱۵
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۱۲/۲۱

چکیده

به‌منظور بررسی اثر اسید هیومیک بر رشد، خواص کیفی میوه و کارآیی مصرف آب عروسک پشت پرده (*Physalis peruviana* L.) تحت شرایط کم‌آبیاری، آزمایشی به‌صورت کرت‌های خرد شده در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی در سه تکرار در سال ۱۴۰۰ اجرا شد. تیمارهای آزمایشی شامل سه سطح آبیاری (۱۰۰، ۸۰ و ۶۰ در صد نیاز آبی گیاه) و سه سطح اسید هیومیک (صفر، ۱/۵ و ۳ کیلوگرم در هکتار) بود. نتایج نشان داد که تنش کم‌آبیاری به‌طور معنی‌داری رشد و عملکرد میوه را کاهش داد، به‌طوری‌که تیمار کم‌آبیاری ۶۰ درصد باعث کاهش ۱۸/۶ درصد ارتفاع بوته و ۲۲/۲ در صد عملکرد میوه در مقایسه با آبیاری ۱۰۰ در صد شد. کاربرد خاکی اسید هیومیک، ارتفاع بوته، عملکرد میوه در بوته، کارایی مصرف آب و کلروفیل کل و خواص کیفی میوه از جمله اسیدیته قابل تیتراسیون، مواد جامد محلول و ویتامین ث میوه را تحت شرایط آبیاری نرمال و کم آبیاری افزایش داد. بیشترین ارتفاع بوته (۲۰۰/۳۳ سانتی‌متر)، کلروفیل کل (۲/۴۲ میلی‌گرم بر گرم وزن تر)، اسیدیته قابل تیترا سیون (۱/۸۱ در صد) و ویتامین ث (۱۹/۵۲ میلی‌گرم بر گرم وزن تر) با کاربرد خاکی ۳ کیلوگرم در هکتار اسید هیومیک تحت شرایط کم‌آبیاری ۱۰۰ در صد نیاز آبی گیاه به‌دست آمد. حداکثر مواد جامد محلول میوه (۱۲/۶۳ درجه بریکس) و کارایی مصرف آب (۱/۲۳ کیلوگرم بر متر مکعب) در گیاهان تیمار شده با اسید هیومیک ۳ کیلوگرم در هکتار در شرایط آبیاری ۶۰ در صد مشاهده شد. در مقایسه با گیاهان شاهد تحت آبیاری ۱۰۰ در صد، کاربرد اسید هیومیک ۳ کیلوگرم در هکتار تحت آبیاری ۱۰۰ و ۸۰ در صد، به‌ترتیب باعث افزایش ۲۵ و ۴ در صد مقدار عملکرد میوه شد و در شرایط کم‌آبیاری ۶۰ در صد نیاز آبی با کاهش ۱۱ در صد عملکرد میوه، در مصرف آب ۴۰ در صد صرفه‌جویی شد. با توجه به نتایج، کاربرد اسید هیومیک ۳ کیلوگرم در هکتار جهت بهبود کارایی مصرف آب، عملکرد و کیفیت میوه عروسک پشت پرده گونه پرووینا تحت شرایط آبیاری نرمال و کم‌آبیاری پیشنهاد می‌شود.

واژه‌های کلیدی: کارایی مصرف آب، کلروفیل کل، مواد جامد محلول، ویتامین ث

مقدمه

عروسک پشت پرده یا فیسالیس (*Physalis peruviana* L.) متعلق به خانواده Solanaceae، گیاهی علفی و بومی آمریکای جنوبی است (Fischer & Miranda, 2012). این گیاه به‌دلیل تولید میوه‌های با خواص دارویی و تغذیه‌ای بالا در جهان به‌طور گسترده مورد توجه قرار گرفته است. میوه عروسک پشت پرده یک منبع طبیعی ترکیبات آنتی‌اکسیدانی، مواد معدنی پتاسیم، فسفر و آهن و ویتامین‌های A، B، C، E و K1 می‌باشد (Ramadan & Mörsel, 2019).

کم‌آبی یک تنش غیرزیستی عمده است که رشد و بهره‌وری گیاهان را به‌ویژه در مناطق خشک و نیمه خشک محدود می کند (Meng *et al.*, 2016). تنش آبی در سبزی‌ها از اهمیت زیادی برخوردار است، زیرا بر عملکرد محصولات سبزی تأثیر می گذارد، به‌ویژه زمانی که در نقطه بحرانی در طول فصل رشد رخ دهد. عموماً همزمان با دمای بالای هوا است که تبخیر و تعرق گیاه را افزایش می‌دهد و در نتیجه، باعث بسته شدن روزنه‌ها و کاهش فعالیت و عملکرد فتوسنتزی می‌شود (Giordano *et al.*, 2021). کم‌آبی به‌طور کلی، منجر به تغییر در صفات فیزیولوژیکی، موفولوژیکی، اکولوژیکی، بیوشیمیایی و مولکولی گیاهان شده و می‌تواند بر کمیت و کیفیت رشد و عملکرد گیاهان تأثیر منفی داشته باشد (Salehi-Lisar & Bakhshayeshan-Agdam, 2020). تنش‌های غیر زیستی را می‌توان با راهبردهای مدیریتی مناسب

۱، ۲ و ۳- به‌ترتیب دانشجوی سابق کارشناسی ارشد، استادیار و دانشیار، گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زنجان، زنجان، ایران
(*- نویسندهٔ مسئول: Email: nekounam@znu.ac.ir)
۴- دانشیار، گروه مهندسی آب، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زنجان، زنجان، ایران

https://doi.org/10.22067/jhs.2023.80428.1226

کاهش داد. کم‌آبیاری یک راهبرد برای تولید پایدار محصولات کشاورزی در شرایط کمبود آب است که ضمن حفظ عملکرد محصول منجر به صرفه‌جویی در مصرف آب می‌شود (Qin *et al.*, 2019). مطالعات اخیر در گیاه هندوانه (*Citrullus lanatus* L.) نشان داد که کم‌آبیاری در مقایسه با آبیاری کامل بدون آنکه بر عملکرد کل تأثیر بگذارد، راندمان مصرف آب را افزایش داد که با کارآیی مصرف آب محصول همبستگی مثبت داشت (Qin & Leskovar, 2020). در شرایط کمبود آب، میزان آب برگ کاهش می‌یابد و کاهش پتانسیل آب برگ موجب بسته شدن روزنه و در نتیجه، کاهش هدایت روزنه‌ای می‌گردد که این امر در نهایت، باعث کاهش سرعت فتوسنتز و متعاقباً کاهش رشد می‌شود (Bota *et al.*, 2004). اصلانی و همکاران (Aslani *et al.*, 2019) گزارش کردند که با کاهش آبیاری از ۱۰۰ به ۸۰ درصد نیاز آبی در گوجه‌فرنگی (*Lycopersicon pimpinellifolium* (L.) Mill)، ارتفاع بوته، سطح برگ، کلروفیل و عملکرد بوته کاهش یافت. گزارش شد تنش کم‌آبی شدید در هندوانه، محتوای نسبی آب برگ، پایداری غشای سلولی و عملکرد میوه را کاهش داد، امّا تنش ملایم در شرایط آبیاری قطره‌ای و مالچ پلاستیکی توانست عملکرد تجاری میوه را با افزایش رشد ریشه حفظ کند (Abdelkhalik *et al.*, 2019). اعمال تنش کم‌آبیاری در گوجه‌فرنگی، نه تنها باعث افزایش کارآیی مصرف آب شد بلکه موجب بهبود کیفیت میوه گردید (Favati *et al.*, 2009). کاهش عملکرد توسط تنش کم آبی به‌طور عمده ناشی از کاهش اندازه میوه است که با دو فرآیند محدودکردن کربوهیدرات قابل دسترس با کاهش سرعت فتوسنتز و محدود کردن مستقیم رشد میوه در اثر کاهش تورژسانس سلول در پاسخ به تنش، رشد میوه را محدود می‌کند (Heydarian *et al.*, 2017).

ترکیبات آلی ارگانیک با کاهش رواناب و کمبود مواد غذایی، موجب بهبود حاصلخیزی خاک و پایداری خاک‌دانه‌ها شده که می‌تواند بر تولید محصول تأثیر مثبت بگذارد. بنابراین، سیستم‌های کشاورزی پایدار شامل ترکیبی از آبیاری بهینه و کاربرد ترکیبات آلی ارگانیک می‌تواند در تولید محصولات باغبانی و کاهش مشکلات زیست‌محیطی کمبود آب و تخریب خاک استفاده شود (Qin *et al.*, 2019). امروزه استفاده از ترکیبات آلی مانند اسید هیومیک می‌تواند بسیاری از فرآیندهای موفولوژیکی، فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی در گیاهان را تحت تأثیر قرار داده و منجر به بهبود رشد گیاهان شود. همچنین، کاربرد اسید هیومیک برای افزایش مقاومت گیاهان در برابر تنش‌های محیطی مورد توجه قرار گرفته است (Ozfidan-Konakci *et al.*, 2018). نتایج مطالعات نشان داده است که اسید هیومیک از یک سو با توان بالای کلات کنندگی می‌تواند در بهبود فراهمی عناصر غذایی مانند نیتروژن، فسفر، آهن و روی به‌ویژه در خاک‌های قلیایی و آهکی مؤثر باشد (Ozfidan-Konakci *et al.*, 2018) و از سوی دیگر، همانند یک مخزن عمل کرده و عناصر غذایی خاک را جذب نموده و آن‌ها را به‌موقع در اختیار ریشه گیاهان قرار دهد که بدین‌ترتیب می‌تواند شرایط مناسبی را برای رشد گیاهان فراهم سازد (Turan *et al.*, 2011). اسید هیومیک می‌تواند با بهبود ساختمان خاک و کاهش تبخیر از سطح خاک به نگهداری آب در خاک کمک نموده و سبب بهبود جذب آب توسط گیاهان شود. این ویژگی سبب شده است تا کاربرد اسید هیومیک در شرایط تنش کم‌آبی مورد توجه قرار بگیرد (Ozfidan-Konakci *et al.*, 2018). اصلانی و همکاران (Aslani *et al.*, 2019) گزارش کردند که کاربرد ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر اسید هیومیک باعث افزایش ارتفاع بوته و سطح برگ در گوجه‌فرنگی شد. محلول‌پاشی اسید هیومیک در شرایط تنش کم‌آبی بر گیاه خربزه (*Cucumis melo* cv. Zard Jalali)، تعداد و وزن میوه، درصد گوشت میوه و محتوای مواد جامد محلول را افزایش داد (Azizi *et al.*, 2016). گزارش شد که کاربرد خاکی اسید هیومیک در گیاه تربچه رقم هندوانه‌ای (*Raphanus sativus* cv. Watermelon)، رشد رویشی، عملکرد غده و محتوای ویتامین ث، آنتوسیانین و مواد جامد محلول کل غده را بهبود بخشید (Barzegar *et al.*, 2021).

اگر چه مطالعاتی زیادی در مورد اثر ترکیبات هیومیک بر گیاهان انجام شده است، امّا اطلاعات کمی در مورد اثرات اسید هیومیک بر رشد و عملکرد و خواص کیفی میوه عروسک پشت پرده در شرایط تنش کم‌آبی وجود دارد، لذا این پژوهش با هدف بررسی اثر اسید هیومیک بر خصوصیات فیزیولوژیکی و فعالیت آنتی‌اکسیدانی عروسک پشت پرده رقم پروویانا تحت شرایط کم‌آبیاری انجام شد.

مواد و روش‌ها

این پژوهش به‌صورت کرت‌های خرد شده در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی در سه تکرار در مزرعه تحقیقاتی دانشکده کشاورزی دانشگاه زنجان در سال ۱۴۰۰ اجرا شد. تیمارهای آزمایش شامل سه سطح آبیاری (۱۰۰، ۸۰ و ۶۰ درصد نیاز آبی گیاه) و سه سطح اسید هیومیک (صفر، ۱/۵ و ۳ کیلوگرم در هکتار) که تیمار آبیاری به‌عنوان عامل اصلی و اسید هیومیک به‌عنوان عامل فرعی بود. اسید هیومیک مورد استفاده با نام تجاری هیومکس از شرکت Biotak Gh آمریکا محتوی ۷۹ درصد اسید هیومیک، ۱۲ درصد اکسید پتاسیم و ۱۲ درصد اسید فولویک بود. نتایج حاصل از تجزیه خاک در جدول ۱ آورده شده است.

جدول ۱- خصوصیات فیزیکی و شیمیایی خاک محل اجرای آزمایش

Table 1- Physical and chemical properties on the site of experimental field

باقت خاک Soil texture	ماده آلی O.M. (%)	پتاسیم Potassium ($g.kg^{-1}$)	سدیم Sodium ($g.kg^{-1}$)	کلسیم Calcium ($g.kg^{-1}$)	نیتروژن Nitrogen (%)	هدایت الکتریکی EC ($dS.m^{-1}$)	اسیدیته pH
لوم رسی Clay loam	0.94	0.2	0.13	0.12	0.07	1.49	7.4

بذرهای عروسک پشت پرده (*Physalis peruviana* L.) در داخل سینی‌های مخصوص کاشت بذر در بستر حاوی پیت‌ماس و پرلیت در گلخانه (دمای۱±۲۵ روز و ۱±۱۸ شب با رطوبت نسبی ۶۰-۷۰ درصد) کشت شدند. پس از آماده شدن زمین، نشاها در مرحله چهار- پنج برگی به زمین اصلی منتقل شدند. فاصله ردیف‌ها ۱۰۰ سانتی‌متر و فاصله بوته‌ها ۵۰ سانتی‌متردر نظر گرفته شد. به‌مدت یک هفته به‌طور منظم آبیاری کامل برای همه گیاهان انجام گرفت و پس از استقرار اولیه گیاهان، کاربرد خاکی اسید هیومیک در دو مرحله قبل از گل‌دهی و بعد از گل‌دهی به فاصله ۲۰ روز صورت گرفت. تیمارهای آبیاری یک هفته پس از اولین کاربرد خاکی اسید هیومیک اعمال شد. نیاز آبی گیاه برای شاهد با استفاده از میانگین بلندمدت داده‌های روزانه و داده‌های سال جاری شاخص‌های هواشناسی ثبت شده در ایستگاه هواشناسی زنجان (جدول ۲) و معادله استاندارد فائو- پنمن- مانتیس برآورد گردید (Vaziri *et al.*, 2008).

$$ET_C = ET_0 \times K_C \qquad (۱)$$

که در این معادله، ET_C: نیاز آبی عروسک پشت پرده (میلی‌متر در روز)، ET_0: تبخیر-تعرق گیاه مرجع چمن (میلی‌متر در روز) و K_C: ضریب گیاهی عروسک پشت پرده (بدون واحد) هستند. لازم به توضیح است مقادیر ET_0 براساس روش استاندارد فائو- پنمن- مانتیث برآورد شد. پس از محاسبه مقادیر ET_C، مقادیر نیاز خالص و نیاز ناخالص آب آبیاری گیاه عروسک پشت پرده براساس فواصل کشت، نوع سیستم آبیاری (قطره‌ای- نواری) و دور آبیاری (سه روز) برآورد شد و سپس، در هر نوبت آبیاری به گیاه داده می‌شد. نیـاز آبـی سایر تیمارها (تیمارهای تنش آبی) براساس نیاز آبی شاهد و درصد تنش آبی، برآورد و توزیع شد. در پایان دوره رشد، از هر واحد آزمایشی با حذف اثر حاشیه‌ای از پنج بوته نمونه‌برداری و برای اندازه‌گیری صفات مورد نظر به آزمایشگاه دانشکده کشاورزی دانشگاه زنجان منتقل شد.

جدول ۲- میانگین پارامترهای هواشناسی ایستگاه سینوپتیک زنجان در دوره رشد (۱۴۰۰)

Table 2- Average daily climatic parameters of Zanjan Synoptic station during the growth season (2021)

	بارندگی Rainfall (mm)	میانگین رطوبت نسبی Average relative humidity (%)	دمای حداقل Minimum temperature (°C)	دمای حداکثر Maximum temperature (°C)
خرداد June	12.4	28	13.0	32.6
تیر July	7.9	31	16.2	34.5
مرداد August	8.8	41	16.3	33.1
شهریور September	0.0	31	16.7	32.8
مهر October	0.5	43	6.7	24.3

صفات مورد ارزیابی

ارتفاع بوته با استفاده از متر بر حسب سانتی‌متر اندازه‌گیری شد. به منظور ارزیابی عملکرد و وزن متوسط میوه، میوه‌ها پس از برداشت با ترازوی دیجیتال گرمی وزن شدند. وزن متوسط میوه‌های یک بوته به صورت گرم برآورد شد. همچنین کارایی مصرف آب (WUE)، با تقسیم نمودن عملکرد کل به آب مصرفی در طی فصل رشد بر حسب کیلوگرم در متر مکعب برآورد گردید.

برای سنجش محتوای کلروفیل کل از بافت تازه برگ استفاده شد. ۰/۱ گرم از نمونه‌ها در هاون چینی با ۱۰ میلی‌لیتر استون ۸۰ درصد ساییده شد. سپس با دور ۵۰۰۰ به‌مدت پنج دقیقه سانتریفیوژ گردید. میزان جذب محلول روشناور با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر SAFAS MONACO (RS 232) در طول موج‌های ۶۴۵ و ۶۶۳ نانومتر قرائت شد. در نهایت، غلظت آن‌ها بر حسب میلی‌گرم بر گرم وزن تر با استفاده از معادله دو محاسبه گردید که در این معادله، V:

حجم نهایی عصاره کلروفیل در استون ۸۰ درصد، W: وزن تازه بافت استخراج شده و A: جذب در طول موج مشخص می‌باشد (Rajalakshmi & Banu, 2015).

(۲) کلروفیل کل= [20.2 (A645)+ 8.02 (A663)]×V/(W×1000

اسیدیته قابل تیتراسیون براساس اسید آلی غالب اندام گیاهی (اسید مالیک) به‌روش تیتر با سدیم هیدروکسید با استفاده از معادله ۳ اندازه گیری شد (AOAC, 2000). در این معادله، E: اکی والان اسید مورد نظر، N: نرمالیته محلول سدیم هیدروکسید، S: مقدار سدیم هیدروکسید مصرف شده (میلی‌لیتر)، F: فاکتور NaOH و C: مقدار عصاره را نشان می‌دهد.

(۳) اسیدیته قابل تیتراسیون (درصد) = [E×N×S×F/C] ×100

محتوای مواد جامد محلول میوه با استفاده از دستگاه رفرکتومتر مدل ATAGO Brixo-32 اندازه‌گیری شد و میزان مواد جامد محلول بر حسب درصد بریکس بیان شد (Mostofi & Najafi, 2005).

برای اندازه‌گیری اسید آسکوربیک (ویتامین ث) میوه، عصاره به روش متافسفریک استخراج شد. جذب محلول حاصل در طول موج ۵۲۰ نانومتر خوانده شد. غلظت اسید آسکوربیک با استفاده از منحنی استاندارد تهیه شده از غلظت‌های مختلف اسید آسکوربیک در حضور دی‌کلروایندوفنل محاسبه شد (AOAC, 2000).

برای اندازه‌گیری فعالیت آنتی‌اکسیدانی میوه از رادیکال آزاد DPPH (2,2-Diphenyl- Picryl- Hydrazyl) استفاده شد. ابتدا عصاره‌های گیاهی در غلظت دو گرم در ۱۰ میلی‌لیتر متانول ۸۰ درصد تهیه شد. سپس مخلوطی به نسبت ۱:۱ از محلول (هشت میلی‌گرم بر ۱۰۰ میلی‌لیتر) DPPH و عصاره‌های گیاهی با غلظت‌های متفاوت تهیه شد. جذب نمونه‌ها بعد از ۳۰ دقیقه در دمای آزمایشگاه در طول موج ۵۱۷ نانومتر اندازه‌گیری شد. درصد مهار رادیکال آزاد DPPH نمونه‌ها از معادله ۵ به‌دست آمد (Sun *et al.*, 2007).

(۵)

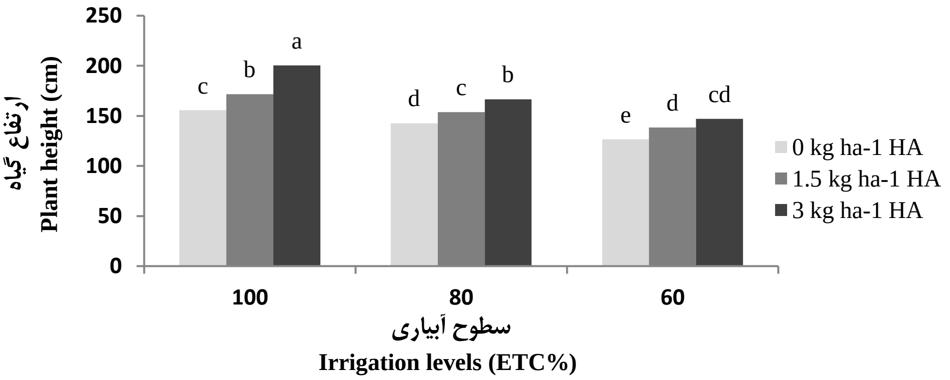
فعالیت آنتی‌اکسیدانی= [(جذب کنترل/(جذب نمونه–جذب کنترل)] × 100

آنالیز داده‌های حاصل با استفاده از نرم‌افزار SAS V9 و مقایسه میانگین داده‌ها از طریق آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح یک و پنج درصد مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند.

نتایج و بحث

ارتفاع گیاه

اعمال تنش کم‌آبیاری به‌طور معنی‌داری ارتفاع گیاه را کاهش داد و کاربرد اسید هیومیک باعث افزایش آن گردید. اثرات متقابل تیمار آبیاری و کاربرد اسید هیومیک بر ارتفاع گیاه تأثیر معنی‌داری داشت (جدول ۳). نتایج حاصل از مقایسه میانگین داده‌ها نشان داد که بیشترین ارتفاع گیاه (۲۰۰/۳ سانتی‌متر) در گیاهان تیمار شده با ۳ کیلوگرم در هکتار اسید هیومیک در شرایط آبیاری ۱۰۰ درصد نیاز آبی مشاهده شد و کمترین ارتفاع گیاه (۱۲۶/۶ سانتی‌متر) در شاهد اسید هیومیک تحت شرایط تنش کم‌آبیاری ۶۰ درصد نیاز آبی حاصل شد (شکل ۱).



شکل ۱- اثر اسید هیومیک (HA) بر روی ارتفاع گیاه عروسک پشت پرده تحت شرایط کم‌آبیاری

Figure 1- The effect of humic acid on the plant height of *Physalis peruviana* under deficit irrigation. (DMRT, *p≤0.05*)

جدول ۳- تجزیه واریانس اثر اسید هیومیک بر رشد، عملکرد و کارایی مصرف آب گیاه عروسک پشت پرده تحت شرایط کم‌آبیاری
Table 3- ANOVA for the effects of humic acid on the growth, yield and water use efficiency of Cape gooseberry under deficit irrigation

منابع تغییرات S.O.V	درجه آزادی df	Mean of Squares			
		ارتفاع گیاه Plant height	کلروفیل کل Total chlorophyll	عملکرد میوه در بوته Fruit yield per plant	کارایی مصرف اب Water use efficiency
تکرار Replication	2	3.3703	0.01	67.3	0.4469
آبیاری irrigation	2	3360.259**	1.424**	7900.765**	0.2464**
خطای کرت اصلی Error (Main plot)	4	24.3703	0.013	196.582	0.0095
اسید هیومیک Humic acid	2	1991.592**	0.414**	2848.960**	0.089**
آبیاری× اسیدهیومیک Irrigation×humic acid	4	145.092**	0.465**	389.977*	0.0908**
خطای کرت فرعی Error (sub plot)	12	24.75	0.011	88.49	0.0041
ضریب تغییرات C.V (%)	-	3.19	6.02	5.3	6.53

ns، ** و * به‌ترتیب عدم معنی‌داری، معنی‌داری در سطح احتمال ۱ و ۵ درصد.
ns, ** and *: non-significant, and significant at $p\leq0.01$ and $p\leq0.05$, respectively.

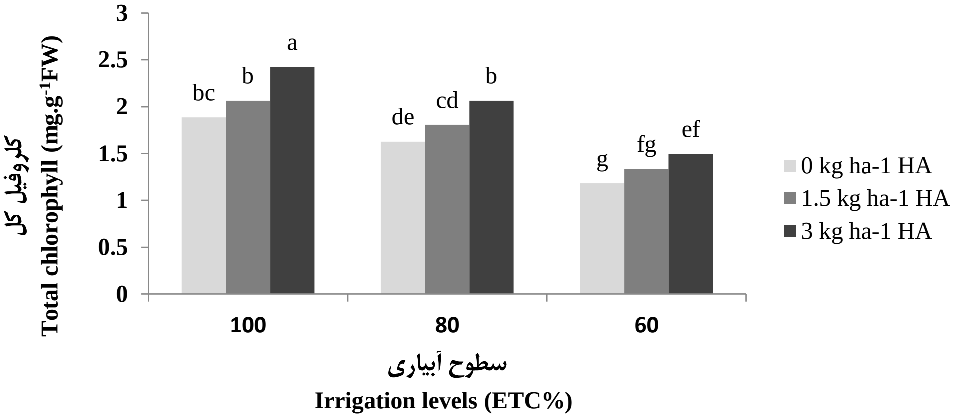
نتایج آزمایش حاضر نشان داد که ارتفاع بوته عروسک پشت پرده تحت آبیاری کامل بیشتر از شرایط کم‌آبیاری بود. کاهش ارتفاع گیاه به این دلیل است که تنش کم‌آبیاری باعث کاهش تقسیمات سلولی شده و رشد رویشی گیاه را کاهش می‌دهد. کمبود آب سبب کاهش فشار آماس می‌گردد و از آنجایی‌که توسعه و رشد سلول وابسته به فشار آماس می‌باشد، نمو سلول کاهش و اندازه کوچک‌تر می‌گردد و در نتیجه، ارتفاع بوته کاهش می‌یابد، به‌گونه‌ای که افزایش تقسیم سلولی و بزرگ شدن سلول‌ها و در نتیجه، رشد گیاه مستلزم آبیاری مناسب می‌باشد (Seyfi & Rashidi, 2007). تقدسی‌نیا و همکاران (Taghdasinia *et al.*, 2020) گزارش کردند که کاهش طول بوته در اثر تنش کم‌آبیاری به‌دلیل کاهش جذب آب، سطح برگ، فتوسنتز و در نتیجه، کاهش میزان آسمیلات می‌باشد. رشد سلول که یکی از فرایندهای فیزیولوژیکی حساس به کم‌آبی است، به‌دلیل کاهش در فشار تورژسانس، در شرایط تنش کم‌آبیاری کاهش می‌یابد. اختلال در تقسیم میتوز و توسعه و طویل شدن سلول منجر به کاهش ارتفاع بوته، سطح برگ و رشد گیاه در این شرایط می‌شود (Hussain *et al.*, 2008). نتایج پژوهش حاضر با یافته‌های برزگر و همکاران (Barzegar *et al.*, 2011) مبنی بر اثرات تنش کم‌آبیاری بر کاهش طول بوته مطابقت دارد.

کاربرد ترکیبات هیومیکی موجب افزایش عناصر پرمصرف و کم مصرف (روی، منگنز و مس) در خاک می‌شود که با ظرفیت ترکیبات هیومیکی در کاهش pH خاک و افزایش ظرفیت تبادل کاتیونی خاک با کاهش جذب سطحی عناصر مرتبط است (Liang *et al.*, 2006).

اسید هیومیک از طریق تأثیر بر غشا و در نتیجه، بهبود انتقال عناصر غذایی، افزایش سنتز پروتئین و فتوسنتز بر رشد گیاهان تأثیرگذار است (Dalvand *et al.*, 2018). همچنین، اسید هیومیک به‌عنوان یک هورمون تنظیم‌کننده رشد، موجب افزایش هورمون‌های اکسین، جیبرلین و سایتوکنین می‌شود که با افزایش این هورمون‌ها طول ساقه و ارتفاع بوته افزایش یافته و رشد گیاه را بهبود می‌بخشد (Calvo *et al.*, 2014). در یک مطالعه بر روی ذرت، مشاهده کردند که اسیدهای هیومیک فعالیت ATPase در سلول‌های ریشه را افزایش داده و باعث افزایش در سطح ریشه و در نتیجه، منجر به افزاش رشد گیاه می‌گردد (Canellas *et al.*, 2009). اثر مثبت اسید هیومیک در افزایش ارتفاع بوته در گوجه‌فرنگی (Aslani *et al.*, 2019) و اسفناج (*Spinacia Oleracea* var. spinoza) (Ayas & Gulser, 2005) نیز گزارش شده است.

کلروفیل کل برگ

نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که اثرات ساده تیمار آبیاری و اسید هیومیک و اثر متقابل آن‌ها در سطح یک درصد بر میزان کلروفیل کل معنی‌دار گردید (جدول ۳). با اعمال تنش کم‌آبی، محتوای کلروفیل برگ کاهش یافت و کاربرد خاکی اسید هیومیک باعث افزایش محتوای کلروفیل کل گردید. با توجه به نتایج، بیشترین مقدار کلروفیل کل (۲/۴۲ میلی‌گرم بر گرم وزن تر) در گیاهان تیمار شده با سطح ۳ کیلوگرم در هکتار اسید هیومیک در شرایط آبیاری ۱۰۰ درصد نیاز آبی و کمترین مقدار آن در شاهد در شرایط آبیاری ۶۰ درصد نیاز آبی گیاه به‌دست آمد (شکل ۲).



شکل ۲- اثر اسید هیومیک (HA) بر محتوای کلروفیل کل برگ عروسک پشت پرده تحت شرایط کم‌آبیاری

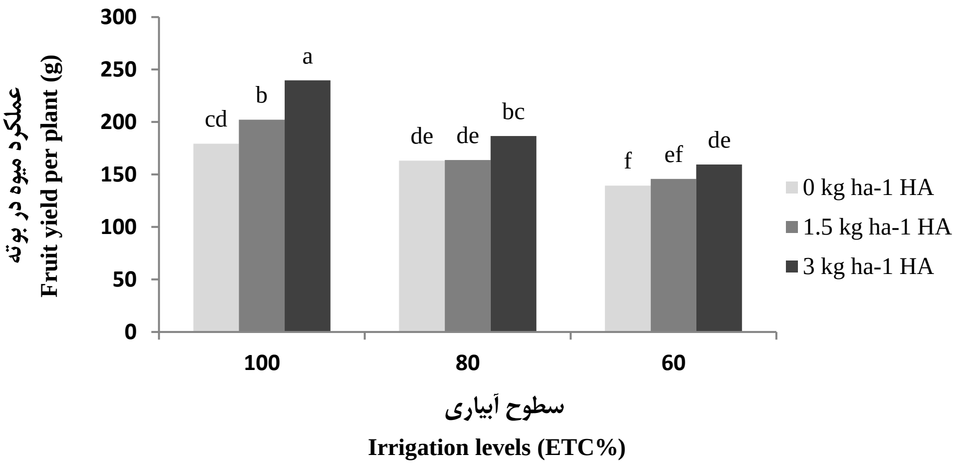
Figure 2- The effect of humic acid on the total chlorophyll content of *Physalis peruviana* under deficit irrigation. (DMRT, *p≤0.05*)

از عوامل مؤثر بر کاهش میزان کلروفیل در اثر تنش کم‌آبی، افزایش تولید رادیکال‌های اکسیژن در سلول است که این رادیکال‌های آزاد سبب پراکسیداسیون و در نتیجه، تجزیه این رنگدانه‌ها می‌گردند (Xiao *et al.*, 2008). از طرف دیگر، در شرایط تنش، به‌دلیل کاهش کارآیی استفاده از کربن و افزایش تولید اتانول و لاکتات و در نتیجه، افزایش تنفس و تولید اتیلن منجر به فعال‌سازی آنزیم‌های مسیر کاتابولیسم کلروفیل (کلروفیلاز، پراکسیداز و لیپوکسیژناز) شده و به این ترتیب، کلروفیل تحت تأثیر این آنزیم‌ها تجزیه می‌شود (Dalal & Tripathy, 2012). در بررسی اثر تنش خشکی روی دو رقم گوجه فرنگی کاهش کلروفیل a و b تحت تنش در سطح ۴۰ و ۶۰ درصد گزارش شد (Ghorbanli *et al*., 2013).

در بین عناصر غذایی، نیتروژن و آهن سهم مهمی در ساخت کلروفیل گیاه دارند. کاربرد اسید هیومیک احتمالاً با افزایش قابل توجه جذب نیتروژن و آهن در گیاه موجب افزایش محتوای کلروفیل برگ گردیده است (Abdel Mawgoud *et al*., 2007). در پژوهشی گزارش کردند که محتوای کلروفیل برگ با جذب اکسیژن وابسته است و کاربرد اسیدهیومیک، اکسیژن کافی را به اندام‌های سلولی می‌رساند و اسیدهای آلی مثل اسید هیومیک و اسیدفولویک غلظت mRNA را در سلول‌های گیاهی افزایش می‌دهد (Ferrara & Brunetti, 2008). نتایج این پژوهش با نتایج حاصل در گیاه گوجه‌فرنگی همخوانی دارد که بیان کردند کاربرد اسید هیومیک تحت تنش کم‌آبیاری مانع از کاهش محتوای کلروفیل گردید (Aslani *et al.*, 2019). همچنین در پژوهشی دیگر، محققین مشاهده کردند که کاربرد خاکی اسید هیومیک در تربچه، به‌طور معنی‌داری محتوای کلروفیل برگ را نسبت به شاهد افزایش داد (Barzegar *et al.*, 2021).

عملکرد میوه در بوته

اعمال تنش کم‌آبیاری به‌طور معنی‌داری عملکرد میوه در بوته را کاهش داد و کاربرد اسید هیومیک باعث افزایش مقدار عملکرد میوه گردید (جدول ۳). نتایج حاصل از مقایسه میانگین داده‌ها نشان داد که بیشترین مقدار عملکرد میوه (۲۳۹/۶ گرم در بوته) در گیاهان تیمار شده با ۳ کیلوگرم در هکتار اسید هیومیک تحت شرایط آبیاری ۱۰۰ درصد نیاز آبی مشاهده شد و کمترین مقدار آن‌ها در شاهد اسید هیومیک تحت شرایط تنش کم‌آبیاری ۶۰ درصد نیاز آبی حاصل شد (شکل ۳). با توجه به نتایج، میزان تولید میوه در گیاهان شاهد تغذیه نشده با اسید هیومیک تحت آبیاری ۱۰۰ درصد، ۱۷۹/۳ گرم بود و در گیاهان تغذیه شده با اسید هیومیک ۳ کیلوگرم در هکتار در شرایط کم‌آبیاری ۸۰ درصد، مقدار میوه در بوته ۱۸۶/۶ گرم بود که نشان می‌دهد با کاربرد خاکی ۳ کیلوگرم در هکتار اسید هیومیک می‌توان با تولید محصول بیشتر در مقایسه با گیاهان شاهد تحت آبیاری ۱۰۰، در مصرف آب ۲۰ درصد صرفه‌جویی کرد (شکل ۳).



شکل ۳- اثر اسید هیومیک (HA) بر مقدار عملکرد میوه عروسک پشت پرده تحت شرایط کم‌آبیاری

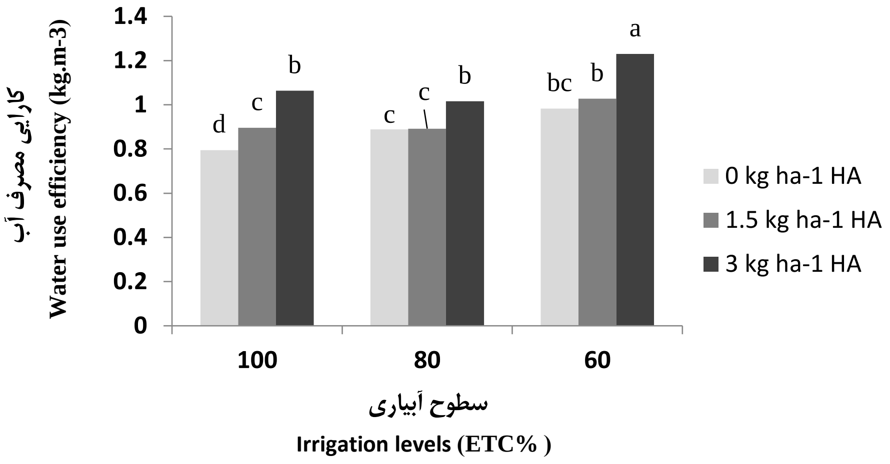
Figure 3- The effect of humic acid on the fruit yield of *Physalis peruviana* under deficit irrigation. (DMRT, $p \leq 0.05$)

هر گیاهی جهت تولید میوه بیشتر و رشد مناسب آن‌ها و به عبارتی، دستیابی به عملکرد بالا، نیازمند رشد رویشی مناسب و داشتن ذخایر غذایی کافی است. این رشد مناسب در صورت جذب بهینه و کافی آب و عناصر غذایی توسط ریشه‌ها میسر خواهد شد (Turhan & Eris, 2005). برای انجام فتوسنتز، توسعه سطح برگ و تبادلات گازی، باز بودن روزنه‌ها ضروری است. بنابراین، در اثر کمبود آب و بسته شدن روزنه‌ها تبادلات گازی کاهش یافته، دی‌اکسیدکربن کمتری در دسترس گیاهان قرار می‌گیرد و شدت فتوسنتز کاهش می‌یابد، همچنین تنش کم‌آبی عمدتاً رشد برگ و در نتیجه، سطح برگ را در بسیاری از گونه‌ها کاهش می‌دهد که این امر موجب کاهش تولید مواد فتوسنتزی می‌گردد. کاهش رشد و عملکرد می‌تواند به‌دلیل کاهش جذب عناصر مغذی پرمصرف و کم‌مصرف باشد که منجر به کاهش سطح برگ و محتوای کلروفیل و در نتیجه، فتوسنتز می‌شود (Atilgan *et al.*, 2022). کاهش فتوسنتز منجر به کاهش رشد و عملکرد تولیدی در گیاهان خواهد شد (Farooq *et al.*, 2009). در مطالعه انجام شده در کاهو (*Lactuca sativa* L.) با کاهش میزان آبیاری از ۱۰۰ درصد نیاز آبی به ۷۰ درصد نیاز آبی، تعداد برگ و عملکرد بوته کاهش یافت (Khani *et al.*, 2020).

اسید هیومیک با افزایش ظرفیت تبادل کاتیونی، ظرفیت نگهداری آب در خاک و همچنین، ایفای نقش بر روی نفوذپذیری غشا به‌عنوان ناقل پروتئین، فعال کردن تنفش، چرخه کربس، فتوسنتز و تولید آمینواسید و آدنوزین‌تری‌فسفات باعث افزایش رشد و عملکرد گیاهان شود (Muscolo *et al.*, 2013). اسید هیومیک با گسترش سیستم ریشه می‌تواند در کاهش اثرات تنش کم‌آبی کاربرد زیادی داشته باشند (Hartz & Bottoms, 2010). علاوه‌براین اسید هیومیک حاصلخیزی خاک را بهبود بخشیده، قابلیت دسترسی و جذب عناصری نظیر نیتروژن، کلسیم، فسفر، پتاسیم، منگنز، آهن، روی و مس را افزایش داده و در نتیجه، موجب افزایش رشد گیاه و عملکرد می‌شود (Chowdhury *et al.*, 2017). نتایج این پژوهش با نتایج کاربرد اسید هیومیک در گیاه خیار (*Cucumis sativus* L.) (El-Nemar *et al.*, 2012)، فلفل [(*Capsicum annum* L.) cv. Demre sivrisi] (Karakurt *et al.*, 2009) و بامیه (*Abelmoschus esculentus* L. 'Kano') (Barzegar *et al.*, 2017) همخوانی دارد.

کارایی مصرف آب

نتایج به‌دست آمده نشان داد که اعمال تنش کم‌آبیاری، کارایی مصرف آب به‌طور معنی‌داری افزایش داد. همچنین، کاربرد اسید هیومیک سبب افزایش کارایی مصرف آب گردید (جدول ۳). نتایج حاصل از مقایسه میانگین داده‌ها نشان داد که بیشترین کارایی مصرف آب (۱/۲۳ کیلوگرم در متر مکعب) در گیاهان تیمار شده با ۳ کیلوگرم در هکتار اسید هیومیک تحت شرایط آبیاری ۶۰ درصد نیاز آبی حاصل شد. کاربرد اسید هیومیک ۳ کیلوگرم در هکتار در تیمارهای آبیاری ۶۰، ۸۰ و ۱۰۰ درصد نیاز آبی گیاه به‌ترتیب موجب افزایش ۳۵/۳۶، ۲۱/۷۵ و ۲۵/۲ درصد کارایی مصرف آب در مقایسه با گیاهان تیمار نشده با اسید هیومیک، تحت آبیاری ۱۰۰ درصد شد (شکل ۴). نتایج این پژوهش با نتایج به‌دست آمده در هندوانه (Qin & Leskovar, 2020) و گوجه‌فرنگی (Aslani *et al.*, 2019) همخوانی دارد.



شکل ٤- اثر اسید هیومیک (HA) بر کارآیی مصرف آب گیاه عروسک پشت پرده تحت شرایط کم‌آبیاری

Figure 4- Effect of humic acid on water use efficiency of *Physalis peruviana* under deficit irrigation. (DMRT, *p≤0.05*)

با توجه به محدودیت منابع آب، یافتن راهکارهایی جهت حفظ آب و بالا بردن کارایی مصرف آب در گیاهان ضروری است (Alenazi *et al.*, 2015). کارایی مصرف آب با توانایی یک گیاه برای جذب غلظت های بالاتری از کربن (دلالت بر حفظ میزان فتوسنتز بالا) همراه است و از دست دادن آب را از طریق کنترل یاز و بسته شدن روزنه‌ها محدود می‌کند (Flexas *et al.*, 2013). به نظر می‌رسد کاربرد اسید هیومیک در شرایط آبیاری مطلوب و تنش متوسط کم‌آبیاری، از طریق افزایش رشد ریشه و جذب عناصر غذایی و در نتیجه، ارتقای توان فتوسنتزی گیاه، عملکرد میوه عروسک پشت پرده و در نهایت، کارایی مصرف آب را به‌طور معنی‌داری افزایش داد. در بررسی تأثیر کاربرد اسید هیومیک بر کارایی مصرف آب و شاخص‌های فیزیولوژیکی رشد ذرت در شرایط کم‌آبیاری گزارش شد که کاربرد اسید هیومیک به‌میزان ۷۵۰ میلی‌گرم در لیتر در طی دوره رشد، افزایش معنی‌دار کارایی مصرف آب را به دنبال دارد (Shahhosseini *et al.*, 2012). کاربرد مواد آلی هیومیکی در یک سیستم رشد محصول چه به‌صورت محلول‌پاشی برگی یا کاربرد خاکی یک راهبرد تکمیلی برای بهبود رشد محصول و کارایی مصرف آب است. ترکیبات هیومیکی با القای فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی می تواند به گیاهان در عملکرد روزنه‌ها کمک کند، در نتیجه روزنه‌ها را تحت تنش خشکی به‌طور مؤثرتری می بندد، که منجر به حفظ آب گیاه می شود (Aguiar *et al.*, 2016).

اسیدیته قابل تیتراسیون

براساس نتایج (جدول ۴)، اعمال تنش کم‌آبیاری به‌طور معنی‌داری (P ≤۰/۰۱) اسید کل میوه را کاهش داد و کاربرد خاکی اسید هیومیک منجر به افزایش آن گردید، ولی بین سطوح مختلف اسید هیومیک تفاوت معنی‌داری وجود نداشت. با توجه به نتایج مقایسه اثرات متقابل، بیشترین میزان اسیدیته قابل تیتراسیون (۱/۸۱ و ۱/۷۶ درصد) با کاربرد ۳ کیلوگرم در هکتار اسید هیومیک به‌ترتیب در شرایط آبیاری ۱۰۰ و ۸۰ درصد نیاز آبی گیاه به‌دست‌آمد که تفاوت معنی‌داری با سطح ۱/۵ کیلوگرم در هکتار اسید هیومیک نداشت و کمترین مقدار آن در شرایط آبیاری ۶۰ درصد نیاز آبی در تیمار صفر اسید هیومیک (شاهد) به‌دست آمد که تفاوت معنی‌داری با سطوح ۱/۵ و ۳ کیلوگرم در هکتار نداشت (شکل ۵).

اسیدها جزء ترکیبات مهم در ایجاد طعم میوه‌ها محسوب می‌شوند. گزارش شده است که در انگور رقم مرلوت (*Vitis vinifera* cv. Merlette) میزان اسیدیته کل برای تیمار تنش خشکی همواره کمتر از شاهد بود. این نشان می‌دهد که بوته‌هایی که به‌طور مستمر آبیاری شده مقدار اسیدیته کل بالائی دارند (Rabiei *et al.*, 2003). همچنین، در پژوهشی در کاهو گزارش شد که با کاهش میزان آبیاری از اسیدیته کل برگ‌های کاهو کاسته شد (Khani *et al.*, 2019). بالاترین اسیدیته قابل تیتراسیون میوه با ۳ گرم در لیتر اسید هیومیک به‌دست آمد که نتیجه مشابهی نیز توسط امینی‌فرد و همکاران در فلفل گزارش شده است (Aminifard *et al.*, 2012).

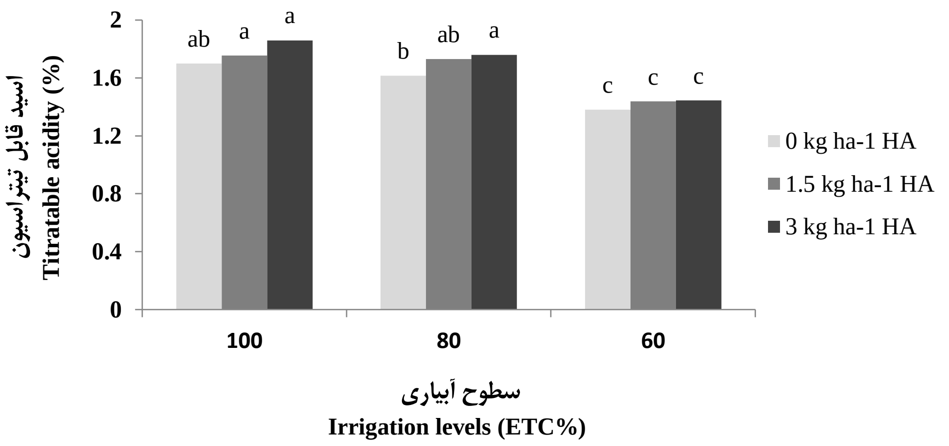
جدول ٤- تجزیه واریانس اثر اسید هیومیک بر خواص کیفی میوه عروسک پشت پرده تحت شرایط کم‌آبیاری

Table 4- ANOVA for the effects of humic on some qualitative properties of *Physalis peruviana* fruit under deficit irrigation

منابع تغییرات S.O.V	درجه آزادی Df	Mean squares		
		اسید قابل تیتراسیون Titratable acidity	مواد جامد محلول Total soluble solids	ویتامین ث Vitamin C
تکرار Replication	2	0.700	0.006	0.0179
آبیاری irrigation	2	13.068**	0.295**	38.617**
خطای کرت اصلی Main plot error	4	0.372	0.001	0.134
اسید هیومیک Humic acid	2	3.789**	0.028*	7.377**
آبیاری× اسیدهیومیک Irrigation×humic acid	4	2.515**	0.081**	11.649**
خطای کرت فرعی Error (sub plot)	12	0.234	0.005	0.241
ضریب تغییرات C.V (%)	-	4.3	4.0	2.99

ns، ** و * به‌ترتیب عدم معنی‌داری، معنی‌داری در سطح احتمال ۱ و ۵ درصد.

ns, ** and *: non-significant, and significant at $p≤0.01$ and $p≤0.05$, respectively.



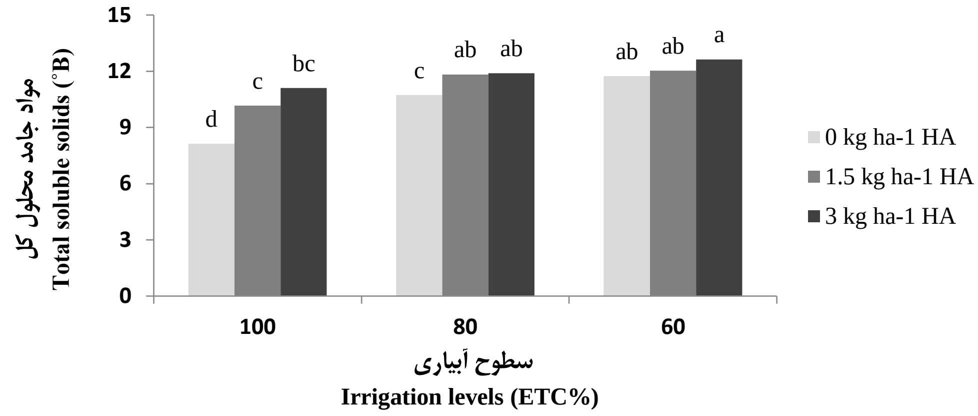
شکل ٥- اثر اسید هیومیک (HA) بر درصد اسید قابل تیتراسیون میوه عروسک پشت پرده تحت شرایط کم‌آبیاری

Figure 5- The effect of humic acid on the titratable acidity of *Physalis peruviana* under deficit irrigation. (DMRT, $p≤0.05$)

این احتمال وجود دارد که زمان استفاده از کودهای آلی مانند اسید هیومیک برای حفظ نسبت کربن به نیتروژن در گیاهان، کربن اضافی ممکن است برای تولید اسیدهای آلی مانند اسید سیتریک و اسید مالیک که مسئول اسیدیته میوه هستند، استفاده شده باشد (Toor *et al.*, 2006). همچنین، در پژوهشی در گیاه گوجه‌فرنگی نشان داده شد که اسید هیومیک با افزایش نفوذپذیری غشای سلولی، ورود پتاسیم را تسهیل نمود و افزایش پتاسیم باعث افزایش اسیدیته قابل تیتراسیون گردید (Wang *et al.*, 2009).

مواد جامد محلول

با اعمال تنش کم‌آبیاری، میزان مواد جامد محلول در میوه عروسک پشت پرده افزایش یافت. میزان مواد جامد محلول از ۸/۱ درصد بریکس در تیمار آبیاری ۱۰۰ درصد نیاز آبی به ۱۱/۷ درصد بریکس در تیمار کم‌آبیاری ۶۰ درصد نیاز آبی گیاه رسید. اسید هیومیک همچنین باعث افزایش میزان مواد جامد محلول شد (جدول ۴). مقایسه میانگین اثر متقابل تیمار کم‌آبیاری و اسید هیومیک نشان داد که تیمار ۳ کیلوگرم در هکتار اسید هیومیک در شرایط کم‌آبیاری ۶۰ درصد نیاز آبی گیاه عروسک پشت پرده بیشترین مقدار مواد جامد محلول را داشت (شکل ۶) که با نتایج به‌دست آمده در گوجه‌فرنگی (Barzegar *et al.*, 2019) مطابقت دارد.



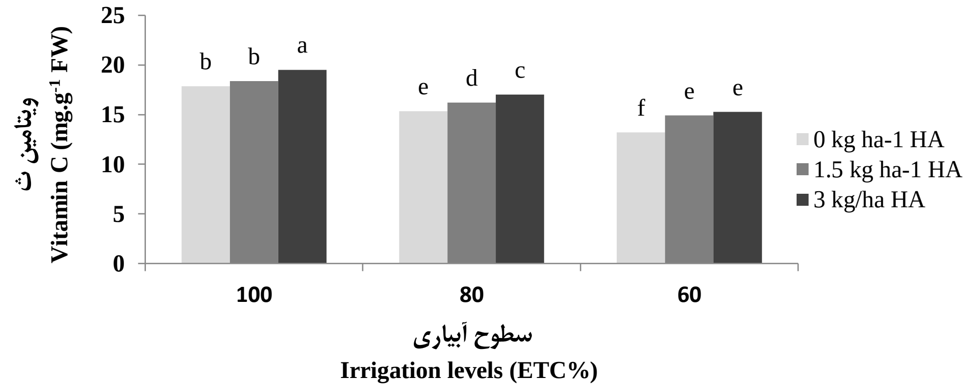
شکل ٦- اثر اسید هیومیک (HA) بر محتوای مواد جامدمحلول کل میوه عروسک پشت پرده تحت شرایط کم‌آبیاری

Figure 6- The effect of humic acid on the total soluble solid content of *Physalis peruviana* under deficit irrigation. (DMRT, *p≤0.05*)

مقادیر مواد جامد محلول به‌عنوان درصدی از وزن تر، ارتباط بسیار نزدیکی با مقادیر قند کل نشان می‌دهد و به‌عنوان یک مشخصه کیفی مهم در نظر گرفته می‌شود. کاهش آبیاری منجر به کاهش محتوای آب میوه شده و در نتیجه، باعث بهبود مقدار مواد جامد محلول میوه می‌شود (Zhang *et al.*, 2017). افزایش تنفس در تنش کم‌آبیاری باعث شکسته شدن پلی‌ساکاریدها و تبدیل آن‌ها به ترکیبات ساده‌تر و افزایش مواد جامد محلول می‌شود (Ivan Garcia *et al.*, 2011). اسید هیومیک با بهبود تولید قند، پروتئین و ویتامین در گیاه و نیز با تأثیر مثبتی که بر جنبه‌های فتوسنتز دارد، محتوای غذایی محصولات را افزایش می‌دهد (Nardi *et al.*, 2002). همچنین، کاربرد اسید هیومیک تولید رنگیزه‌های کلروفیلی را تحریک می‌کند و در نتیجه آن باعث افزایش فتوسنتز و رشد گیاه می‌شود. با گسترش سطح فتوسنتز، تولید آسمیلات‌ها نیز زیاد شده و این باعث افزایش میزان مواد جامد محلول میوه می‌شود (Asri *et al.*, 2015). نتایج به‌دست آمده از این تحقیق با نتایج حاصل روی محصولات گوجه‌فرنگی (Aslani *et al.*, 2019) و فلفل (Karakurt *et al.*, 2009; Aminifard *et al.*, 2012) در یک راستا می‌باشد.

ویتامین ث

اعمال تنش کم‌آبیاری به‌طور معنی‌داری مقدار ویتامین ث میوه را کاهش داد و کاربرد اسید هیومیک باعث افزایش مقدار ویتامین ث گردید (جدول ۴). نتایج حاصل از مقایسه میانگین داده‌ها نشان داد که بیشترین مقدار ویتامین ث (۱۹/۵ میلی‌گرم بر گرم وزن تر) در میوه گیاهان تیمار شده با اسید هیومیک ۳ کیلوگرم در هکتار، تحت شرایط آبیاری ۱۰۰ درصد نیاز آبی و کمترین مقدار آن (۱۵/۲ میلی‌گرم بر گرم وزن تر) در شاهد تحت شرایط آبیاری ۶۰ درصد نیاز آبی حاصل شد (شکل ۷).



شکل ۷- اثر اسید هیومیک (HA) بر محتوای ویتامین ث میوه عروسک پشت پرده تحت شرایط کم‌آبیاری

Figure 7- The effect of humic acid on the vitamin C content of *Physalis peruviana* fruit under deficit irrigation. (DMRT, *p≤0.05*)

ویتامین ث یک ترکیب ضروری برای گیاهان، با نقش‌های مهم به صورت یک آنتی‌اکسیدان و تعدیل‌کننده رشد گیاه از طریق پیام‌رسانی هورمونی است. علاوه‌براین، نقش مهمی در رشد گیاه، فتوسنتز و فعالیت آنزیم‌های پراکسیداز و سوپراکسید دیسموتاز دارد (Cavusoglu & Bilir, 2015). در بررسی انجام شده روی انگور (Zonouri et al., 2014) و خربزه (Sharma et al., 2014) کم‌آبیاری باعث کاهش قابل توجهی در مقدار ویتامین ث شده است. چون ویتامین ث از اسیدهای آلی می‌باشد، به‌دلیل دمای زیاد ایجاد شده ناشی از تنش کم‌آبی، تنفس افزایش یافته، بنابراین اسیدها به‌عنوان سوبسترا در پدیده تنفسی شرکت می‌کنند. این امر باعث کاهش اسیدیته کل و در نتیجه، باعث کاهش ویتامین ث در اثر تنش کم‌آبی می‌شود (Sharma et al., 2014). همچنین با توجه به اینکه مسیر سنتز ویتامین ث از D- گلوکز، آغاز شده است، کاهش میزان ویتامین ث ممکن است به کاهش سطح سنتز D- گلوکز نسبت داده شود که در طول دوره تنش اتفاق می‌افتد (Mahendran & Bandara, 2000). کودهای آلی با جذب رطوبت و مواد غذایی خاک مدت زمان زیادی در خاک باقی مانده و باعث بهبود ساختار خاک شده و به‌طور غیرمستقیم نیز باعث افزایش ویتامین ث میوه‌های تولیدی شده است (Mahmoudi et al., 2016). افزایش ویتامین ث می‌تواند به‌وسیله نقش اسید هیومیک در گسترش قابلیت دسترسی مواد غذایی توجیه شود. کاربرد اسید هیومیک، دسترسی به عناصری چون فسفر و پتاسیم را بیشتر کرده و این امر نیز باعث افزایش میان ویتامین ث میوه شده است (Yildirim, 2007). نتایج به‌دست آمده از این تحقیق با نتایج حاصل از بررسی‌هایی انجام شده بر روی فلفل (Aminifard et al., 2012) و تربچه (Barzegar et al., 2021) مطابقت داشت.

نتیجه‌گیری

با توجه به نتایج حاصل از آزمایش می‌توان بیان نمود که کم‌آبیاری تأثیر معنی‌داری بر رشد و عملکرد گیاه عروسک پشت پرده داشت. با اعمال کم‌آبیاری مواد جامد محلول و کارایی مصرف آب افزایش افزایش یافت. استفاده از اسید هیومیک اثرات مثبت و معنی‌داری بر عملکرد و کیفیت میوه عروسک پشت پرده در شرایط آبیاری نرمال و کم‌آبیاری داشت، به‌طوری‌که سبب افزایش ارتفاع گیاه، وزن میوه و کارایی مصرف آب گیاه گردید. در نهایت، با توجه به اینکه استفاده از اسید هیومیک ۳ کیلوگرم در هکتار منجر به حفظ کلروفیل برگ، افزایش ویتامین ث، اسیدیته قابل تیتراسیون، کارایی مصرف آب و عملکرد میوه در بوته شد. بنابراین، براساس نتایج حاصل و با توجه به بحران کم‌آبی کنونی، استفاده از اسید هیومیک ۳ کیلوگرم در هکتار در شرایط آبیاری نرمال و کم‌آبیاری در جهت تعدیل اثرات مضر تنش کم‌آبی و بهبود عملکرد و کیفیت میوه عروسک پشت پرده می‌تواند مفید واقع شود.

References

1- Abdelkhalik, A., Pascual-Seva, N., Najera, I., Giner, A., Baixauli, C., & Pascual, B. (2019). Yield response of seedless watermelon to different drip irrigation strategies under Mediterranean conditions. *Agricultural Water Management*, *212*, 99–110. https://doi.org/10.1016/j.agwat.2018.08.044

2- Abdel-Mawgoud, A.M.R., El-greadly, N.H.M., Helmy, Y.I., & Singer, S.M. (2007). Responses of tomato plants to different rates of humic-based fertilizer and NPK fertilization. *Journal of Applied Sciences Research*, 3, 169-174.

3- Aguiar, N.O., Medici, L.O., Olivares, F.L., Dobbss, L.B., Torres-Netto, A., Silva, S.F., Novotny, E.H., & Canellas, L.P. (2016). Metabolic profile and antioxidant responses during drought stress recovery in sugarcane treated with humic acids and endophytic diazotrophic bacteria. *Annals of Applied Biology*, *168*, 203–213. https://doi.org/10.1111/aab.12256

4- Alenazi, M., Abdel-Razzak, H., Ibrahim, A., Wahb-Allah, M., & Alsadon, A. (2015). Response of muskmelon cultivars to plastic mulch and irrigation regimes under greenhouse conditions. *Journal of Animal and plant Sciences*, *25*(5), 1398-1410.

5- Aminifard, M.H., Aroiee, H., Azizi, M., Nemati, H., & Jaafar, H.Z.E. (2012). Effect of humic acid on antioxidant activities and fruit quality of hot pepper (*Capsicum annuum*). *Journal of Herbs, Spices and Medicinal Plant*, *18*, 360-369. https://doi.org/10.1080/10496475.2012.713905

6- AOAC. (2000). Official method of analysis of the association of official analytical chemists. Washington D.C 12, 377-378.

7- Aslani, S., Barzegar, T., & Nikbakht, J. (2019). Effect of foliar application of humic acid on growth, yield and fruit quality of tomato (*Lycopersicon pimpinellifolium* (L.) Mill) under irrigation deficit stress. *Plant Process and Function*, *8*(32), 69-83. (In Persian with English abstract)

8- Atilgan, A., Rolbiecki, R., Saltuk, B., Jagosz, B., Arslan, F., Erdal, I., & Aktas, H. (2022). Deficit irrigation stabilizes fruit aield and Alters leaf macro and micronutrient onccentration in tomato cultivation in greenhouses: A case study in Turkey. *Agronomy*, *12*, 2950. https://doi.org/10.3390/agronomy1212295

9- Asri, F.O., Ari, N., & Demirtas, E.I. (2015). Change in fruit yield, quality and nutrient concentration in response to soil humic acid applications in processing tomato. *Bulgarian Journal of Agricultural Science*, *21*(3), 585-591.

10-Ayas, H., & Gulser, F. (2005). The effects of sulfur and humic acid on yield components and macronutrient contents of spinach (*Spinacia Oleracea* var. spinoza). *Journal of Biological Sciences*, *5*(6), 801–804.

11-Azizi, Z., Barzegar, T., & Gharmani, Z. (2016). Effect of humic acid and salicylic acid on fruit yield and quality of "Zard Jalali" melon under water stress. *Journal of Agricultural Agriculture*, *19*(2), 378-400. (In Persian with English abstract)

12-Barbagallo, R.N., Chisari, M., & Patané, C. (2012) Polyphenol oxidase total phenolics and ascorbic acid changes during storage of minimally processed ‘California Wonder’ and ‘Quadrato d'Asti’ sweet peppers. *Food Science and Technology*, *49*, 192–196. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2012.06.023

13-Barzegar, T., Delshad, M., Majdabadi, A., Kashi, A., & Ghashghaei, J. (2011). Effects of water stress on yield, growth and some physiological parameters in Iranian melon. *Iranian Journal of Horticultural Science*, *42*(4), 357-363. (In Persian with English abstract)

14-Barzegar, T., Esfahani, Z., Ghahrani, Z., & Nikbakht, J. (2019). Investigating some physiological and biochemical responses of Rio Grande variety tomato (*Lycopersicon esculentum* cv. Rio Grande) to foliar application of biostimulant under water stress. *Plant Process and Function*, *8*(29), 229-239. (In Persian)

15-Barzegar, T., Mahmoodi, S., Nekounam, F., Ghahremani Z., & Khademi, O. (2021). Effects of humic acid and cytokinin on yield, biochemical attributes and nutrient elements of radish (*Raphanus sativus* L.) cv. Watermelon, *Journal of Plant Nutrition*, *45*(1),1-17. https://doi.org/10.1080/01904167.2021.2003395

16-Barzegar, T., Moradi, P., Hasanzadeh, Z., Ghahrani, Z., & Nikbakht, J. (2017). Evaluation of growth, yield and vitamin C content of okra with application of putrescine and humic acid under deficit irrigation stress. *Agricultural Knowledge and Sustainable Production*, *28*(1), 109-123. (In Persian with English abstract)

17-Bernstein, N., Shoresh, M., Xu, Y., & Huang, B. (2010). Involvement of the plant antioxidative response in the differential growth sensitivity to salinity of leaves vs roots during cell development. *Free Radical Biology and Medicine*, *49*(7), 1161-1171. https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2010.06.032

18-Bota, J., Flexas, J., & Medrano, H. (2004). Is photosynthesis limited by decreased Rubisco activity and RuBP content under progressive water stress? *New Phytolgist*, *162*, 671-681. https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2004.01056.x

19-Calvo, P., Nelson, L., & Kloepper, J.W. (2014). Agricultural uses of plant biostimulants. *Plant and Soil*, *383*(1-2), 3-41. https://doi.org/10.1007/s11104-014-2131-8

20-Canellas, L.P., Silva, S.F., Olk, D.C., & Olivares, F.L. (2015). Foliar application of plant growth-promoting bacteria and humic acid increase maize yields. *Journal of Food, Agriculture and Environment*, *13*, 131-138.

21-Cavusoglu, K., & Bilir, G. (2015). Effects of ascorbic acid on the seed germination, seedling growth and leaf anatomy of barley under salt stress. *ARPN Journal of Agricultural and Biological Science*, *10*(4), 124-129.

22-Chowdhury, J.A., Karim, M.A., Khaliq, Q.A., Ahmed, A.U., & Mondol, A.M. (2017). Effect of drought stress on water relation traits of four soybean genotypes. *SAARC Journal of Agriculture*, *15*(2), 163-175. https://doi.org/10.3329/sja.v15i2.35146

23-Dalal, V.K., & Tripathy, B.C. (2012). Modulation of chlorophyll biosynthesis by water stress in rice seedlings during chloroplast biogenesis. *Plant Cell and Environment*, *35*, 1685-1703. https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2012.02520.x

24-Dalvand, M., Solgi, M., & Khaleghi, A. (2018). Effects of foliar application of humic acid and drought stress on growth and physiological characteristics of marigold (*Taget erecta*). *Journal of Soil and Plant Interactions*, *9*(2), 67–80. (In Persian). https://doi.org/10.29252/ejgcst.9.2.67

25-El-Nemr, M.A., El-Desuki, M., El-Bassiony, A.M., & Fawzy, Z.F. (2012). Response of growth and yield of cucumber plants (*Cucumis sativus* L.) to different foliar applications of humic acid and bio-stimulators. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*, *6*, 630-637.

26-Farooq, M., Wahid, A., Kobayashi, N., Fujita, D., & Basra, S.M.A. (2009). Plant drought stress: Effects, mechanisms and management. *Agronomy for Sustainable Development*, *29*, 185–212. https://doi.org/10.1051/agro:2008021

27-Favati, F., Lovelli, S., Galgano, F., Miccolis, V., Di Tommaso, T., & Candido, V. (2009). Processing tomato quality as affected by irrigation scheduling. *Scientia Horticulturae*, *122*(4), 562–571. https://doi/10.1016/j.scienta.2009.06.026

28-Ferrara, G., & Brunetti, G. (2008). Influence of foliar applications of humic acids on yield and fruit quality of table grape cv. Italia. *Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin*, *42*, 79–87. https://doi.org/10.20870/oeno-one.2008.42.2.822

29-Fischer, G., & Miranda, D. (2012). Uchuva (*Physalis peruviana* L.), In Fischer, G. (Ed.). Manual para el cultivo de frutales en el trópico. *Produmedios, Bogotá*, *4*(22), 851-873.

30-Flexas, J., Niinemets, U., Galle, A., Barbour, M.M., Centritto, M., Diaz-Espejo, A., Douthe, C., Galmes, J., Ribas-Carbo, M., Rodriguez, P.L., & Rossello, F. (2013). Diffusional conductances to CO_2 as a target for increasing photosynthesis and photosynthetic water use efficiency. *Photosynthesis Research*, *117*(1-3), 45-59. https://doi.org/10.1007/s11120-013-9844-z

31-Giordano, M., Petropoulos, S.A., & Rouphael, Y. (2021). Response and defence mechanisms of vegetable crops against drought, heat and salinity stress. *Agriculture*, *11*, 463. https://doi.org/10.3390/ agriculture11050463

32-Ghorbanli, M., Gafarabad, M., Amirkian, T., & Allahverdi Mamaghani, B. (2013). Investigation of proline, total protein, chlorophyll, ascorbate and dehydroascorbate changes under drought stress in Akria and Mobil tomato cultivars. *Iranian Journal of Plant Physiology*, *3*, 651-658.

33-Hartz, T.K., & Bottoms, T.G. (2010). Humic substances generally ineffective in improving vegetable crop nutrient uptake or productivity. *Horticulture Science*, *45*(6), 906-910. https://doi.org/10.21273/HORTSCI.45.6.906

34-Heydarian, N., Barzegar, T., & Ghahremani, Z. (2017). Effect of water deficit stress on growth, yield, fruit quality and water use efficiency of some Iranian melon accessions. *Agricultural Crop Management*, *19*(2), 287-302. (In Persian with English abstract). https://doi.org/10.22059/jci.2017.60413

35-Hussain, M., Malik, M.A., Farooq, M., Ashraf, M.Y. & Cheema, M.A. (2008). Improving drought tolerance by exogenous application of glycinebetaine and salicylic acid in sunflower. *Journal of Agronomy and Crop Science*, *194*(3), 193-199. https://doi.org/10.1111/j.1439-037X.2008.00305.x

36-Ivan Garcia, T., Victor Hugo, D.Z., & Jose Luis, M.F. (2011). Long-term impact of sustained deficit irrigation on yield and fruit quality in *sweet orange* cv. Salustiana (SW Spain). *Comunicata Scientiae*, *2*(2), 76-84.

37-Jubany-Mari, T., Prinsen, E., Munne-Bosch, S. and Alegre, L. 2010. The timing of methyl jasmonate, hydrogen peroxidase and ascorbate accumulation during water deficit and subsequent recovery in the Mediterranean shrub *Cistus albidus* L. *Journal Environmental and Experimental Botany*, *69*, 47-55. https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2010.02.003

38-Karakurt, Y., Unlu, H., Unlu, H., & 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*, 233-237. https://doi.org/10.1080/09064710802022952

39-Khani, A., Barzegar, T., Gharmani, Z., & Nikbakht, J. (2019). The effect of calcium lactate foliar spray on growth, yield and quality of lettuce (*Lactuca sativa* L.) cv. New Red Fire under water deficit stress. *Plant process and function*, *8*(33), 187-201. (In Persian with English abstract)

40-Khani, A., Barzegar, T., Nikbakht, J., & Ghahremani, Z. (2020). Effect of foliar spray of calcium lactate on the growth, yield and biochemical attribute of lettuce (*Lactuca sativa* L.) under water deficit stress. *Advances in Horticultural Science*, *34*(1), 11-24. https://doi.org/10.13128/ahsc-8252

41-Liang, B., J. Lehmann, D. Solomon, J. Kinyangi, J. Grossman, B. O'Neill, J.O. Skjemstad, J. Thies, F.J. Luizao, J. Petersen, and E.G. Neves. 2006. Black carbon increases cation exchange capacity in soils. *Soil Science Society of America Journal*, *70*, 1719– 1730. https://doi.org/10.2136/sssaj2005.0383

42-Mahendran, S., & Bandara, D.C. (2000). Effects of soil moisture stress at different growth stages on vitamin C, capsaicin, and b-carotene contents of chili (*Capsicum annum* L.) fruits and their impact on yield. *Tropical Agricultural Research*, *12*, 95–106.

43-Mahmoudi, H., Shekohian, A.A., Asghari, A., & Ghanbari, A. (2016). Investigating the effect of humic acid application on the quantitative and qualitative characteristics of kiwi fruit of Hayward variety. *Fruit Growing Researches*, *2*(2), 96-108. (In Persian with English abstract)

44-Meng, S., Zhanga, C., Sua, L., Lia, Y., & Zhaoa, Z. (2016). Nitrogen uptake and metabolism of *Populus simonii* in response to PEG-induced drought stress. *Environmental and Experimental Botany*, *123*, 78-87. https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2015.11.005

45-Mostofi, Y., & Najafi, F. (2005). *Analytical laboratory methods in horticultural sciences*. Tehran University Publications. Tehran, Iran. 15-60. (In Persian)

46-Muscolo, A, Sidari, M., & Nardi, S. (2013). Humic substance: Relationship between structure and activity. Deeper information suggests univocal findings. *Journal of Geochemical. Exploration*, *129*, 57-63. https://doi.org/10.1016/j.gexplo.2012.10.012

47-Nardi, S., Pizzeghello, D., Muscolo, A., & Vianello, A. (2002). Physiological effects of humic substances on higher plants. *Soil Biology and Biochemistry*, *34*, 1527-1536. https://doi.org/10.1016/S0038-0717(02)00174-8
48-Ozfidan-Konakci, C., Yildiztugay, E., Bahtiyar, M., & Kucukoduk, M. (2018). The humic acid-induced changes in the water status, chlorophyll fluorescence and antioxidant defense systems of wheat leaves with cadmium stress. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, *155*, 66–75. https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.02.071
49-Qin, K., Dong, X., Jifon, J., & Leskovar, D.I. (2019). Rhizosphere microbial biomass is affected by soil type, organic and water inputs in a bell pepper system. *Applied Soil Ecology*, *138*, 80–87. https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2019.02.024
50-Qin K., & Leskovar D.I. (2020). Assessments of humic substances application and deficit irrigation in triploid watermelon. *Hortscience*, *55*(5), 1-6. https://doi.org/10.21273/HORTSCI14872-20
51-Rabiei, V., Talai, A., Petrlonger, A., Ebadi, A., & Ahmadi, A. (2003). The effect of low irrigation at the end of the season on the fruit composition of "Merlot" grape variety. *Agricultural Sciences of Iran*, *34*, 961-968. (In Persian with English abstract)
52-Rajalakshmi, K., & Banu, N. (2015). Extraction and estimation of chlorophyll from medicinal plants. *International Journal of Science and Research*, *4*(11), 2319-7064.
53-Ramadan, M.F., & Mörsel, J.T. (2019). Goldenberry (*Physalis peruviana*) oil. pp. 397-404. In: Fruit oils: Chemistry and functionality, Springer Nature Switzerland AG, Switzerland. https://doi.org/10.1007/978-3-030-12473-1_19
54-Salehi-Lisar, S.Y., & Bakhshayeshan-Agdam, H. (2020). Agronomic crop responses and tolerance to drought stress. *Agronomic Crops*, *3*, 63-91. https://doi.org/10.1007/978-981-15-0025-1_5
55-Seyfi, K., & Rashidi, M. (2007). Effect of drip irrigation and plastic mulch on crop yield and yield components of cantaloupe. *International Journal of Agricultuer and Biological*, *2*, 247-249.
56-Seyoum, A., Asres, K. & El-Fiky, F.K. (2006) Structure radical scavenging activity relationships of flavonoid. *Phytochemistr*, *67*(18), 2058-2070. https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2006.07.002
57-Shahhosseini, Z., Gholami, A., & Asghari Asghari, H. (2012). Effect of arbuscular mycorrhiza and humic acid on water use efficiency and physiological growth indices of maize under water deficit condition. *Arid Biome*, *2*(1), 39-57. (In Persian). https://doi.org/10.22059/JCI.2019.282993.2228
58-Sharma, H.S., Fleming, C., Selby, C., Rao, J.R., & Martin, T. (2014). Plant biostimulants: A review on the processing of macroalgae and use of extracts for crop management to reduce abiotic and biotic stresses. *Journal Applied Phycology*, *26*, 465-490. https://doi.org/10.1007/s10811-013-0101-9
59-Sun, T., Powers, J. R., & Tang, J. (2007). Evaluation of the antioxidant activity of Asparagus, broccoli and their juices. *Food Chemistry*, *105*, 101-106. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.03.048
60-Taghdasinia, F., Gharmani, Z., Barzegar, T., & Alaei, M. (2020). Effect of deficit irrigation at different growth stages of two Iranian melon accessions on growth, yield, fruit quality and water use efficiency. *Horticultural Sciences of Iran*, *51*(2), 503-515. (In Persian with English abstract). https://doi.org/10.22059/ijhs.2019.272138.1567
61-Theunissen, J. P., Ndakidemi, A. and Laubscher, C. P. (2010) Potential of vermicompost produced from plant waste on the growth and nutrient status in vegetable production. *International Journal of the Physical Sciences*, *5*(13), 1964- 1973.
62-Toor, R.K., Savage, G.P., & Heeb, A. (2006). Influence of different types of fertilisers on the major antioxidant components of tomatoes. *Journal of Food Composition and Analysis*, *19*, 20-27. https://doi.org/10.1016/j.jfca.2005.03.003
63-Turan, M.A, Asik, B.B., Katkat, A.V., & Celik, H. (2011). The effects of soil-applied humic substances to the dry weight and mineral nutrient uptake of maize plants under soil salinity conditions. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, *39*, 171-177. https://doi.org/10.15835/nbha3915812
64-Turhan, E., & Eris, A. (2005). Effects of sodium chloride applications and different growth media on ionic composition in strawberry plant. *Journal of Plant Nutrition*, *27*, 1653-1665. https://doi.org/10.1081/PLN-200026009
65-Vaziri, Z.H., Salamat, A., Ansari, M., Masihi, M., Heydari, N., & Dehghani sanich, H. (2008). *Evapotranspiration plant (water consumption guidelines for plants) (Translation*). Publications of the National Committee of Irrigation and Drainage, printing, Tehran, Iran. (In Persian)
66-Wang, Y.T., Liu, R.L., Huang, S.W., & Jin, J.Y. (2009). Effects of potassium application on flavor compounds of cherry tomato fruits. *Journal of Plant Nutrition*, *32*, 1451-1468. https://doi.org/10.1080/01904160903092663
67-Xiao, X., Xu, X., & Yang, F. (2008). Adaptive responses to progressive drought stress in two *Populus cothayana* populations. *Silva Fennica*, *42*, 705-719. https://doi.org/10.14214/sf.224

68-Yildirim, E. (2007). Foliar and soil fertilization of humic acid affect productivity and quality of tomato. *Acta Agriculturae Scandinavica Section B-Soil and Plant Science*, *57*, 182-186. https://doi.org/10.1080/09064710600813107

69-Zhang, H., Xionga, Y., Huanga, G., Xua, X., & Huanga, Q. (2017). Effects of water stress on processing tomatoes yield, quality and water use efficiency with plastic mulched drip irrigation in sandy soil of the Hetao Irrigation District. *Agricultural Water Management*, *179*, 205–214. https://doi.org/10.1016/j.agwat.2016.07.022

70-Zonouri, M., Javadi, T., Ghaderi, N., & Saba, M.K. (2014). Effect of foliar spraying of ascorbic acid on chlorophyll a chlorophyll b, total chlorophyll, carotenoids, hydrogen peroxide, leaf temperature and leaf relative water content under drought stress in grapes. *Bulletin of Environment, Pharmacology and Life Sciences*, *3*(5), 178-184.

Journal of Horticultural Science
https://jhs.um.ac.ir

Research Article
Vol. 38, No. 2, Summer 2024, p. 339-352

Studying the Phytochemical Compounds of Ethanol and Ethyl Acetate Extracts of Three Ecotypes of *Artemisia aucheri*

S. Houshmand[1], S. Alizadeh-Salteh[2*], S. Bolandnazar[3], E. Aryakia[4]

1, 2 and 3- Ph.D. of Physiology of Production and Post-harvest of Horticultural Plants, Associate Professor and Professor, Department of Horticultural Science and Engineering, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran, respectively.
(*- Corresponding Author Email: s.a.salte@gmail.com)
4- Assistant Professor, Department of Plant Bank, Iranian Biological Resource Center (IBRC)(ACECR), Tehran, Iran

Received: 05-02-2023 Revised: 02-01-2024 Accepted: 03-01-2024 Available Online: 03-01-2024	**How to cite this article:** Houshmand, S., Alizadeh-Salteh, S., Bolandnazar, S., & Aryakia, E. (2024). Studying the phytochemical compounds of ethanol and ethyl acetate extracts of three ecotypes of *Artemisia aucheri*. *Journal of Horticultural Science, 38*(2), 339-352. (In Persian with English abstract). https://doi.org/10.22067/jhs.2024.80951.1233

Introduction

Taking into account Iran's unique meteorological and biological characteristics due to its geographic position. This has contributed to the variety and abundance of plant species cultivated there. The *Artemisia* species, which are among Iran's most valuable plants, are members of the *Asteraceae* family and are found across the country in reasonably large numbers. Antioxidants now play an indisputable role in the food, pharmaceutical, and healthcare industries. Given that the antioxidant capability is greatly influenced by the kind of solvent used, the technique used to extract the plants that were harvested from each location, as well as other factors like the weather, altitude, and light. The substantial antioxidant activity of phenolic and flavonoid compounds and their protective significance in cancer illnesses are caused by these compounds' regenerative properties.

Materials and Methods

In this work, *Artemisia aucheri*, a medicinal plant, was gathered from Semnan, Mazandaran, and Isfahan in Iran, and the antioxidant activity of these ecotypes was assessed. In this study, the quantity of total phenol and flavonoids in polar (ethanol) and non-polar (ethyl acetate) extracts, as well as the proportion and diversity of essential oil components, were assessed. Antioxidant content was also determined using the DPPH and FRAP techniques.

Results and Discussion

The most active antioxidant is found in the Semnan ecotype. The polar solvent of ethanol showed the strongest inhibition whereas the non-polar solvent of ethyl acetate shown stronger reducing activity, proving the importance of the extraction solvent on antioxidant activity in various processes. The non-polar extract (ethyl acetate) from the Mazandaran ecotype had the greatest flavonoid concentration, while the polar extract (ethanol) from the Isfahan ecotype had the highest phenolic content. The ethanolic extract performed the best when assessing total phenol. The most crucial elements of essential oils are oxidized monoterpenes. Oxygenated monoterpenes are present in 54.82% of the Semnan ecotype, 38.81% of the Mazandaran ecotype, and 24.41% of the Isfahan ecotype. In comparison to other ecotypes, the Semnan ecotype exhibited the most oxygenated monoterpene compounds and the greatest number of essential oil-containing compounds.

©2024 The author(s). This is an open access article distributed under Creative Commons Attribution 4.0 International License (CC BY 4.0).

https://doi.org/10.22067/jhs.2024.80951.1233

Conclusion

These findings suggest that *A. aucheri* possesses abundant natural antioxidant sources and is useful in both the food and pharmaceutical industries. A key aspect is the act of extraction, which is focused on the extraction's goal. The solvent used during extraction significantly affects the outcomes. Regarding the chemical makeup of the compounds, the solvent's polarity directly affects the solutes that are extracted. Since phenolic chemicals are more attracted to polar solvents, they are found in plant samples. The kind of flavonoids found in plants and their degree of polarity determine the variation in the quantity of flavonoid content between polar and non-polar extracts. On the other hand, a variety of ecological, genetic, regional, and dietary variables may have contributed to the variation in phenolic contents, essential oils, and antioxidant chemicals found in the three analyzed ecotypes.

Keywords: Artemisia, DPPH, Non-polar extract, Phenol, Polar extract

نشریه علوم باغبانی
https://jhs.um.ac.ir

مقاله پژوهشی

جلد ۳۸، شماره ۲، تابستان ۱۴۰۳، ص. ۳۵۲-۳۳۹

بررسی ترکیبات فیتوشیمیایی عصاره‌های اتانولی و اتیل استاتی سه اکوتیپ گیاه دارویی درمنه کوهی (*Artemisia aucheri*)

سپیده هوشمند[۱]- سعیده علیزاده سالطه[۲*]- صاحبعلی بلند نظر[۳]- الیاس آریاکیا[۴]

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۱۱/۱۶

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۱۰/۱۳

چکیده

از جمله گیاهان با ارزش ایران، گونه‌های جنس *Artemisia* متعلق به تیره کاسنی (Asteraceae) می‌باشند که پراکندگی نسبتاً وسیعی در نقاط مختلفی از ایران دارند. با توجه به اینکه پتانسیل آنتی‌اکسیدانی به‌میزان قابل توجهی با ماهیت حلال، روش استخراج گیاه جمع‌آوری شده از هر منطقه و نیز بستگی به پارامترهای زیادی از جمله آب‌وهوا، ارتفاع و نور دارد. در این مطالعه، گیاه دارویی درمنه کوهی با نام علمی *Artemisia aucheri* از سه ناحیه مختلف ایران (سمنان، مازندران و اصفهان) در سال ۱۴۰۰ جمع‌آوری و پتانسیل آنتی‌اکسیدانی این اکوتیپ‌ها ارزیابی شد. در این تحقیق، خواص دارویی از جمله محتوای آنتی‌اکسیدانی (با دو روش DPPH و FRAP)، مقدار فنل کل و فلاونوئید در عصاره‌های قطبی (اتانول) و غیرقطبی (اتیل استات) و در صد و تنوع ترکیبات اسانس مورد ارزیابی قرار گرفت. اکوتیپ سمنان دارای بیشترین فعالیت آنتی‌اکسیدان (۹۵/۱۵ در صد) می‌با شد. حلال غیرقطبی اتیل استات فعالیت احیاکنندگی بالاتری را نشان داده که این مورد بیانگر این است که نوع حلال مورد استفاده در عصاره‌گیری بر فعالیت آنتی‌اکسیدانی بسیار مؤثر می‌با شد. اکوتیپ اصفهان دارای بیشترین محتوای فنلی در عصاره قطبی (۶۲/۶۲ میلی‌گرم معادل اسید گالیک بر گرم وزن خشک) و اکوتیپ مازندران بیشترین محتوای فلاونوئیدی را در عصاره غیرقطبی (۸/۵۲ میلی‌گرم معادل کورستین بر گرم وزن خشک) نشان داد. اکوتیپ سمنان دارای بیشترین ترکیبات مونوترپن اکسیژن‌دار، بیشترین ترکیب در اسانس را در بین دیگر اکوتیپ‌ها دارا بود. این نتایج بیانگر این مورد هستند که گونه *A. aucheri* دارای منابع غنی آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی بوده و می‌توانند در صنایع غذایی و دارویی کاربرد فراوان داشته باشند. تنوع محتویات فنلی، ترکیبات اسانس و آنتی‌اکسیدانی مشاهده شده در سه اکوتیپ مورد مطالعه می‌تواند به‌علت عوامل مختلف اکولوژیکی، ژنتیکی، جغرافیایی و فاکتورهای تغذیه‌ای باشد.

واژه‌های کلیدی: آرتمیزیا، DPPH، فنل، عصاره قطبی، عصاره غیرقطبی

مقدمه

گیاهان دارویی از دیرباز، در تمام فرهنگ‌ها و تمدن‌ها به‌عنوان یک منبع ارزشمند دارویی مورداستفاده قرار می‌گرفته است. امروزه توجه روزافزونی به گیاهان دارویی و مشتقات حاصل از آن به‌عنوان منابع با ارزش برای تولید مواد اولیه داروها جهت معرفی داروهای جدید و نیز روش‌های تفکیک و جداسازی عصاره‌های گیاهی و اسانس‌ها به اجزای مختلف براساس فعالیت بیولوژیک آن‌ها معطوف شده است (Hoareau & Dasilva, 1999). با توجه به موقعیت جغرافیایی کشور ایران که از تنوع اقلیمی و شرایط اکولوژیکی منحصربه‌فردی برخوردار می‌باشد، این امر منجر به تنوع و غنای گونه‌ای گیاهان روییده در آن گردیده است. این موضوع محققان زیادی را می‌طلبد تا این گیاهان را شناسایی و به بررسی خصوصیات آن‌ها در اقلیم‌ها بپردازند. در بین ویژگی‌های گیاهان دارویی، مطالعه جنبه‌های بیوشیمیایی آن‌ها مورد توجه خاصی قرار گرفته است.

۱، ۲ و ۳- به ترتیب دکتری تخصصی تولید و پس از برداشت گیاهان باغی، دانشیار و استادیار، گروه علوم و مهندسی باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران

(*- نویسنده مسئول: (Email: s.a.salte@gmail.com

۴- استادیار، عضو هیأت علمی بانک گیاهی، مرکز ملی ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران (ACECR) (IBRC)

https://doi.org/10.22067/jhs.2024.80951.1233

گونه‌های جنس *Artemisia* متعلق به تیره کاسنی (Asteraceae) یکی از گیاهان باارزش ایران می‌باشند که بیش از ۴۰۰ گونه در سرتاسر جهان دارد که یکی از مهم‌ترین و گسترده‌ترین جنس‌های خانواده کاسنیان می‌باشد که دارای ۳۴ گونه در ایران است. این گیاهان که بومی یا اندمیک ایران هستند، در زبان فارسی درمنه نامیده می‌شوند (Taghavizadeh Yazdi *et al*., 2020). مرکز تنوع این گیاه آسیای مرکزی می‌باشد که شامل حدود ۱۵۰ گونه در چین، ۵۰ گونه در ژاپن و ۳۴ گونه در ایران است (Turuspekov *et al*., 2018). گونه‌های این جنس به‌دلیل سازگاری بالا با شرایط محیطی متفاوت از جمله، مقاومت در برابر کم‌آبی، مقاومت در برابر سرما و خشک‌سالی محیط، تأمین علوفه برای دام و حیات‌وحش از اهمیت زیادی برخوردار است. برخی از گونه‌های این جنس از نظر اقتصادی باارزش می‌باشند؛ در پزشکی، صنعت و به‌عنوان تثبیت‌کننده خاک استفاده می‌شوند (Bora & Sharma, 2011). این گیاه دارویی از نظر پراکنش جزء شاخص‌ترین و با اهمیت‌ترین جنس‌های گیاهی در فلور ایران محسوب می‌شود. گونه‌های مختلف جنس درمنه در ایران از نقاط پست نزدیک حاشیه دریای خزر گرفته تا ارتفاعات ۴۰۰۰ متری از سطح دریا گسترش یافته است (Bidgoli *et al*., 2013). درمنه کوهی (*Artemisia aucheri* Boiss) یکی از گونه‌های معروف درمنه در ایران می‌باشد. گیاهی چند ساله، ساقه فخیم و چوبی، پرساقه که ساقه‌های بارور متعدد، اغلب از میانه منشعب می‌باشد. ارتفاع این گیاه ۲۵ تا ۶۵ سانتی‌متر به ثبت رسیده است. اغلب بدون کرک، دارای دمبرگ به‌طول تا دو سانتی‌متر، دو تا سه بار شانه‌ای بخش دیده می‌شوند. برگ‌های ساقه‌ای مشابه برگ‌های قاعده‌ای، اغلب بدون دمبرگ مشخص با رگبرگ میانی برجسته، نوک تیز می‌باشد (Mozaffarian, 2008). غالباً در شرایط بیش از ۳۰۰ میلی‌متر بارندگی سالیانه رشد می‌کند (Nasirpour *et al*., 2014). در بررسی‌های انجام‌شده میزان اسانس فرار در این گیاه ۰/۴ درصد گزارش شده است (Safari, 1994).

این گونه‌ها دارای یک نوع طعم یا بوی به‌خصوصی هستند که توسط مونوترپن‌ها و سزکوئی‌ترپن‌ها ایجاد می‌شود که دلیل کاربرد آن‌ها در طب سنتی و بومی می‌باشد. گونه‌های آرتمیزیا عملکردهای ضدالتهابی، تب‌بر و خواص ضدباکتریایی، ضدویروسی، ضدمالاریایی، ضدقارچی و آنتی‌اکسیدانی دارند (Majdan *et al*., 2020). توجه به اینکه یکی از راهکارهای مؤثر در پیشگیری و کنترل ویروس‌ها همچنین ویروس‌های خانواده کرونا ویروس تقویت سیستم ایمنی است. محققان به این نتیجه رسیده‌اند که به‌دلیل خواص ضد باکتریایی و افزایش عملکرد سیستم ایمنی بدن، این گیاه می‌تواند به‌عنوان گزینه مناسبی جهت درمان بیماری‌های عفونی و نقص سیستم ایمنی مورد استفاده قرار گیرد (Mohabatkar *et al*., 2016). علی‌رغم موارد ذکرشده در بالا، عصاره‌های گیاهی در آسم، بیماری‌های پوستی، یبوست و همچنین، هضم معده نیز استفاده می‌شود (Sapkota, 2008). در طی تحقیقاتی که روی ۲۴۰ گونه از تیره *Asteraceae* جهت مشخص نمودن خواص دارویی آن‌ها انجام پذیرفته است، حدود ۸۴ ترکیب دارویی در گونه‌های *Artemisia* تشخیص داده شده است (Zheng & Wang, 2001).

کشور ایران دارای تنوع اکولوژیکی بسیار گسترده و غنی از گونه‌های گیاهی می‌باشد که متأسفانه مطالعات اندکی از نظر فیتوشیمیایی مخصوصاً در شرایط یکسان روی آن‌ها صورت پذیرفته است (Morshedloo *et al*., 2018).

عوامل محیطی تأثیرگذار بر روی متابولیت‌های ثانویه می‌باشند، به‌طوری‌که درصد اسانس به‌دست‌آمده از *Artemisia roxburghiana* var Basser جمع‌آوری شده از چند ارتفاع مختلف رابطه منفی معنی‌داری را بین ارتفاع و درصد اسانس گیاه نشان می‌دهد، به‌طوری‌که بیشترین مقدار اسانس در ارتفاع ۱۲۱ متری و کمترین مقدار آن در ارتفاع ۲۰۲۵ متری گزارش شده است (Haider *et al*., 2009). حسینی و همکاران (Hosseini, *et al*., 2013) عامل ارتفاع را مهم‌ترین عامل محیطی در گسترش *A. aucheri* گزارش کرده‌اند. محتشم نیا (Mohtashamnia, 2012) نیز بیشترین پراکنش گونه *A. aucheri* را در گرادیان ارتفاعی ۲۲۰۰ تا ۲۴۰۰ متری گزارش کرده است و ارتفاع از سطح دریا را به‌عنوان عامل مهم در پراکنش این‌گونه بیان کرده است. وی همچنین اظهار دارد که عوامل فیزیوگرافی به همراه تأثیر میزان بارندگی در ارتفاعات نقش تعیین‌کننده در استقرار و پراکنش این‌گونه دارند.

شدت تابش و دما به‌علت تغییرات ارتفاع تحت تأثیر قرار می‌گیرد، که خود عامل مهمی در تشکیل متابولیت‌های ثانویه در گیاهان می‌باشد. اقلیم هر منطقه همواره به‌عنوان یکی از مهم‌ترین عوامل محیطی کنترل‌کننده پوشش گیاهی مطرح بوده است. دو معیار اصلی اقلیم هر منطقه، بارندگی و دما هستند که هر دو تابعی از عامل ارتفاع می‌باشند. با توجه به اینکه ارتفاع رابطه‌ای مستقیم با میزان بارندگی و رابطه معکوس با دما دارد. به‌طور مثال، بررسی فنولوژی گونه *A. aucheri* نشان داده است که شروع رشد رویشی در ابتدای فصل رویش به شاخص دما و شاخص بارندگی فصل رشد و رطوبت خاک بستگی دارد (Rashvand *et al*., 2014; Ehsani *et al*., 2014).

بسیاری از بیماری‌های مزمن در افراد که با افزایش سن در ارتباط هستند، به‌صورت مستقیم با تنش یا تنش‌های اکسیداتیو درگیر بوده که این فرآیند ناشی از تولید بیش از اندازه رادیکال‌های آزاد یا ضعف سیستم دفاعی ارگانیسم مورد نظر است. از جمله این بیماری‌ها می‌توان

به تصلب شرائین، سکته مغزی، بیماری‌های عصبی و بیماری التهابی مزمن اشاره نمود (Bovicelli, 2010). رادیکال‌های آزاد و ROSها تنها زمانی مفید هستند که در زمان، مکان و مقدار مناسبی تولید شوند، در غیر این صورت می‌توانند مضر باشند. تنش اکسیداتیو به‌دلیل تولید بیش از اندازه رادیکال‌های آزاد و ذرات فعال اکسیژن و ضعیف شدن سیستم‌های آنتی‌اکسیدانی به‌علت تولید کم آنتی‌اکسیدان‌های اندوژن و یا افزایش استفاده از آن‌ها می‌باشد (Khalili & Ebrahimzadeh, 2015). ترکیبات فنولی موجود در گیاهان نظیر فلاونوئیدها و پروآنتوسیانیدین‌ها مسئول توان آنتی‌اکسیدانی هستند (Gulcin, 2020). محصولات گیاهی برای اهداف بهداشتی و درمانی غربالگری شده‌اند، زیرا تعداد زیادی از مردم به‌طور آشکار و یا با استفاده سنتی از محصولات مختلف با منشأ گیاهی تمایل داشته‌اند. ترکیب شیمیایی این مواد بسته به شرایط محیطی از گونه‌ای به گونه دیگر متفاوت است (Judzentiene, *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2017).

با توجه به دلایلی که ذکر گردید، جمعیت‌های بومی گیاهان دارویی به‌ویژه جمعیت‌های وحشی از نظر ویژگی‌های مورفوفنولوژیکی و نیز شیمیایی ناهمگن هستند؛ بنابراین در صورت بهره‌برداری و وارد کردن یک‌گونه دارویی به صنعت هر استراتژی که در نظر گرفته شود، از جمله بهره‌برداری از رویشگاه‌های طبیعی، اهلی کردن (در مورد جمعیت‌های وحشی) و یا اصلاح (انواع کشت شده)، نیازمند شناسایی ماهیت، ویژگی‌های شیمیایی، تأثیرپذیری از محیط و سایر خصوصیات گونه دارویی مورد نظر می‌باشد تا گیاهانی بی‌خطر با میزان متابولیت مورد نیاز از نظر ترکیبات تولید شده برای کشت انبوه به کشاورزان معرفی شوند. با توجه به ناهمگنی جمعیت‌های گیاهی و حضور انواع تیپ‌های مختلف شیمیایی، باید با بررسی تنوع موجود در طبیعت و تهیه نقشه‌های پراکنش تیپ‌های شیمیایی، رویشگاه‌های مختلف از نظر تیپ‌های شیمیایی مختلف بررسی شوند تا خصوصیت شیمیایی منطقه مورد نظر مشخص گردد. همچنین در این مطالعه سعی می‌شود، درک درستی از گونه مهم جنس *Artemisia* با توجه ویژه به پتانسیل‌های دارویی و فیتوشیمی آن ارائه شود.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری نمونه‌های گیاهی

جمع‌آوری گونه‌های مورد نظر طبق جدول ۱ از سه اکوتیپ مختلف صورت پذیرفت که برداشت این گیاهان در زمان تکمیل فاز رویشی کامل انجام گرفت، شناسایی ارقام در هرباریوم مرکز ذخایر ژنتیک ایران صورت پذیرفت و به‌روش سایه‌خشک در مجاورت جریان هوا در اتاق خشک گردیدند.

جدول ۱- مشخصات رویشگاه‌های طبیعی نمونه‌های گیاهی

Table 1- The habitat properties of plant samples

کد Code	نام گونه Species	رویشگاه Province	ارتفاع از سطح دریا Altitude	طول جغرافیایی Longitude	عرض جغرافیایی Latitude	میانگین دمای سالیانه Annual Average Temperature (° C)	میانگین بارش سالیانه Annual Average Precipitation (mm)
1	*Artemisia aucheri* Boiss.	سمنان Semnan	2377	54º33'4.6"	36º28'48.1"	14.1	161.1
2	*Artemisia aucheri* Boiss.	مازندران Mazandaran	1178	53º00'23.8"	35º56'57.6"	17.6	656
3	*Artemisia aucheri* Boiss.	اصفهان Isfahan	2313	51º42'41.7"	31º12'4.8"	10.1	400

تهیه عصاره‌های گیاهی

جهت اندازه‌گیری‌های فیتوشیمیایی، خواص دارویی از جمله محتوای آنتی‌اکسیدانی (با دو روش DPPH و FRAP) از عصاره‌های قطبی (اتانول) و غیرقطبی (اتیل استات) استفاده گردید. جهت تهیه عصاره‌های قطبی و غیرقطبی از برگ‌های خشک گیاه درمنه به‌میزان یک گرم پس از توزین، توسط روش ماسراسیون یا خیساندن در مدت زمان ۲۴ ساعت در دمای اتاق و بر روی شیکر با سرعت ۲۵۰ دور در دقیقه عصاره‌گیری انجام شد. عصاره‌های به‌دست آمده خشک شده و در شیشه استریل جمع‌آوری شد و در یخچال در دمای چهار درجه سانتی‌گراد تا زمان استفاده نگهداری شد. برای تعیین فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌های گیاه در این تحقیق از عصاره‌های قطبی (اتانول) و غیر قطبی (اتیل استات) استفاده شد.

تعیین میزان آنتی‌اکسیدان به‌روش DPPH

برای سنجش توان آنتی‌اکسیدانی از ۵۰ میکرولیتر از نمونه با غلظت های مختلف (۰/۲۵ تا ۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) با ۳۵۰ میکرولیتر محلول DPPH (یک میلی‌مولار) حل گردید و سپس، با متانول ۱۰۰ درصد به حجم دو میلی‌لیتر رسانده شد. بعد از نگهداری به‌مدت بیست

دقیقه در تاریکی و دمای اتاق، میزان جذب در طول موج ۵۱۷ نانومتر سنجش گردید(Brand-Williams, *et al.*,1995).

تعیین میزان آنتی‌اکسیدان به‌روش احیای آهن FRAP

برای سنجش توان احیایی عصاره از روش سنجش (Ferric Reducing Antioxidant Potential) FRAP استفاده شد (Benzie & Strain, 1996). این روش براساس افزایش جذب در طول موج ۵۹۳ نانومتر می‌باشد که در حضور مواد احیاکننده نمونه آزمایشی، کمپلکس آبی رنگ آهن دوظرفیتی تری پیکریدیل تریازین از آهن سه ظرفیتی بی‌رنگ به‌وجود می‌آید. محلول FRAP به‌صورت تازه و از مخلوط کردن به‌ترتیب بافر استات (۳۰۰ میلی‌مولار با پی اچ ۳/۶)، محلول TPTZ۱۰ (میلی‌مولار محلول TPTZ در ۴۰ میلی‌مولار محلول HCl)، محلول کلرید آهن ۲۰ میلی‌مولار ($FeCl_3.6H_2O$) به نسبت ۱۰:۱۰:۱۰۰ به‌دست آمد. سپس، ۲۰۰ میکرولیتر از نمونه آزمایشی با ۱۸۰۰ میکرولیتر محلول FRAP مخلوط شد و بعد از ۳۰ دقیقه نگهداری در تاریکی و دمای اتاق، میزان جذب نمونه قرائت شد. منحنی کالیبراسیون توسط محلول استاندارد $FeSO_4.7H_2O$ (غلظت ۲۰-۱ میکرومولار) به‌دست آمد. نتایج برحسب میکرومول آهن (دوظرفیتی) در گرم وزن خشک ($\mu mol\ Fe^{2+}/g\ DW$) بیان گردید. همه اندازه‌گیری‌ها FRAP وDPPH روش‌های در سه تکرار انجام گرفته و میانگین آن‌ها ثبت گردید.

تعیین مقدار فنل کل

محتوای ترکیبات فنلی در عصاره متانولی با استفاده از روش فولین سیکالچو با اندکی تغییرات نسبت به منبع اندازه‌گیری شد، درصورتی‌که هر نمونه جذبی بالاتر از جذب آخرین غلظت استاندارد داشت به نسبت مساوی رقیق گردید و اندازه‌گیری شد تا در رنج استاندارد قرار گرفت. ۲۰ میکرولیتر نمونه، استاندارد اسید گالیک، یا شاهد (آب مقطر یا دیونیزه) را در کویت ۲ میلی‌لیتری ریخته و به دنبال آن ۱/۵۸ میلی‌لیتر آب اضافه و به دنبال آن ۱۰۰ میکرولیتر فولین سیلیکاتو (FC) ریخته و آن‌ها را مخلوط کرده و به‌مدت یک تا هشت دقیقه در دمای اتاق قرار داده شد. بعد از پنج دقیقه ۳۰۰ میکرولیتر محلول کربنات سدیم ۲۰ درصد اضافه شد. حجم نهایی در اینجا دو میلی‌لیتر می‌باشد. جذب نمونه‌ها در طول‌موج ۷۶۵ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر قرائت شد. محتوای ترکیبات فنلی معادل میلی‌گرم اسید گالیک در ۱۰۰ گرم ماده خشک (DW) محاسبه گردد. منحنی کالیبراسیون با استفاده از اسید گالیک تهیه گردید (Bahukhandi *et al.*, 2013).

تعیین مقدار ترکیبات فلاونوئیدی

محتوای فلاونوئید کل به‌روش کلرومتری براساس روش هوسو و همکاران (Hosu *et al.*, 2014) با اندکی تغییرات به شرح زیر اندازه‌گیری شد. ۱۰۰ میکرولیتر عصاره متانولی، ۱۰۰ میکرولیتر آب اضافه مقطر، ۶۰۰ میکرولیتر متانول ۹۵ درصد، ۴۰ میکرولیتر $AlCl_3$ ۱۰ درصد، ۴۰ میکرولیتر استات پتاسیم یک مولار و در آخر ۱۱۲۰ میکرولیتر آب مقطر اضافه و به‌شدت شیک گردید. بعد از ۴۰ دقیقه جذب نمونه‌ها در طول‌موج ۴۱۵ نانومتر همراه با شاهد قرائت شد. نتایج معادل میلی‌گرم کورستین (QE) در ۱۰۰ گرم ماده خشک براساس منحنی استاندارد تهیه شده با کاتچین محاسبه گردید، منحنی کالیبراسیون با استفاده از کورستین تهیه گردید.

استخراج و اندازه‌گیری اسانس

مقدار ۴۰ گرم از هر نمونه گیاهی خرد و وزن شده و همراه با ۳۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر داخل بالون یک لیتری ریخته شد. سپس بالون به کلونجر وصل شده و به‌مدت سه ساعت روی هیتر طبق فارماکوپه بریتانیا قرار گرفت. بعد از گذشت این زمان هیتر خاموش شد و پس از گذشت ۳۰ دقیقه اسانس که به‌علت کمتر بودن چگالی آن از آب، روی سطح آب قرارگرفته بود؛ با سرنگ جمع‌آوری و توسط سولفات سدیم بدون آب، آبگیری شدند. پس از آماده‌سازی اسانس و تزریق آن به دستگاه کوپل شده کروماتوگرافی گازی با طیف‌سنج جرمی (-GC MS) ترکیبات تشکیل‌دهنده اسانس مورد شناسایی کمّی و کیفی قرار گرفتند. آنالیز GC-MS روی یک سیستم GC-MS (Agilent, 19091S-443, USA) مجهز به ستون HP-5MS (30 m × 0.25 mm و ضخامت لایه فاز ساکن ۰/۲۵میکرومتر) انجام شد.

تجزیه و تحلیل داده‌ها

در این آزمایش، تست نرمال بودن داده‌ها و همچنین تجزیه و تحلیل داده‌ها (تجزیه واریانس به‌روش واریانس یک‌طرفه و مقایسه میانگین به‌روش آزمون چند دامنه‌ای دانکن) با نرم‌افزار SPSS 18 انجام شد. رسم نمودارها با استفاده از نرم‌افزار Excel 2013 صورت گرفت.

نتایج

نتایج حاصل از بررسی خاصیت آنتی‌اکسیدانی این گیاه با استفاده از روش FRAP و DPPH توسط عصاره قطبی و غیرقطبی در جدول ۲ و ۳ آورده شده است.

جدول ۲- مقایسه میانگین و انحراف معیار فعالیت آنتی‌اکسیدانی DPPH عصاره‌های اتانولی و اتیل استاتی

Table 2- Comparing the mean and standard deviation of DPPH antioxidant activity of ethanol and ethyl acetate extracts

(Code)[B]	درصد فعالیت آنتی‌اکسیدانی علیه رادیکال DPPH (میانگین ± انحراف معیار[A]) (%)Antioxidant activity against DPPH radical (Mean ± SD[A])							
	اتانول Ethanol				اتیل استات Ethyl acetate			
	1	2	3	total	1	2	3	total
	95.15 ± 1.31	88.73± 3.18	58.99 ±2.72	80.96± 2.41	71.04 ±3.69	64.52± 3.47	9.09± 1.59*	48.22± 2.92

[A] انحراف معیار، [B] کد استان، * حداقل مقدار، ** حداکثر مقدار

[A] Standard deviation. [B] Province code. * Minimum. ** Maximum

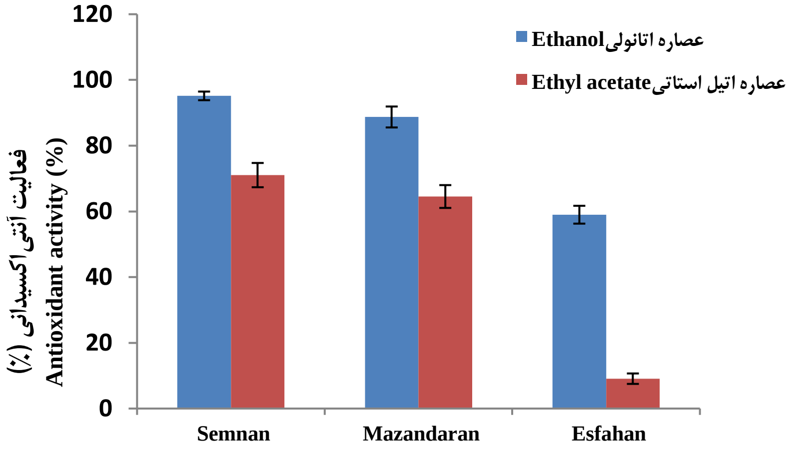
جدول ۳- مقایسه میانگین و انحراف معیار فعالیت آنتی‌اکسیدانی FARP عصاره‌های اتانولی و اتیل استاتی

Table 3- Comparing the mean and standard deviation of FARP antioxidant activity of ethanolic and ethyl acetate extracts

(Code)[B]	فعالیت آنتی‌اکسیدانی علیه رادیکال FARP (میانگین ± انحراف معیار[A]) (میکرومول آهن دوظرفیتی بر گرم ماده خشک) Antioxidant activity against FARP radical (Mean ± SD[A]) (µmol Fe^{2+}/g DW)							
	اتانول Ethanol				اتیل استات Ethyl acetate			
	1	2	3	total	1	2	3	total
	13.46± 0.61	11.55± 0.55	17.12 ±0.94	14.04± 0.70	18.54± 1.38	18.41± 1.09	17.65± 0.48	18.20± 0.99

[A] انحراف معیار، [B] کد استان، * حداقل مقدار، ** حداکثر مقدار

[A] Standard deviation. [B] Province code. * Minimum. ** Maximum



شکل ۱- ارزیابی پتانسیل آنتی‌اکسیدانی عصاره قطبی و غیرقطبی سه اکوتیپ گونه *A. aucheri* با روش DPPH

Figure 1- Evaluating the antioxidant potential of polar and non-polar extracts of 3 ecotypes of *A. aucheri* by DPPH method

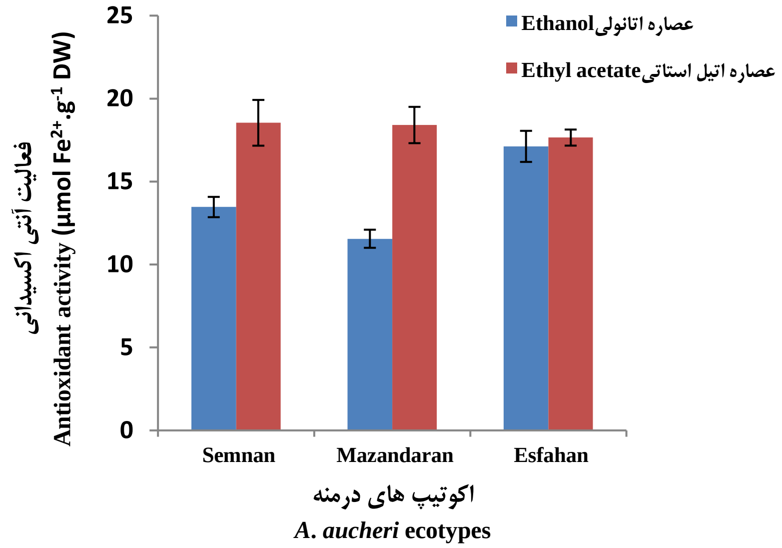
شاخص بالای هر ستون نشان‌دهنده خطای استاندارد (±SE) می‌باشد.

The index above each column indicates the standard error

با توجه به شکل ۱، در روش DPPH عصاره‌گیری توسط اتانول، اکوتیپ سمنان با ۱/۳۱± ۹۵/۱۵ درصد دارای بیشترین درصد بازداری را دارد. اکوتیپ مازندران با ۳/۱۸± ۸۸/۷۳ درصد و اکوتیپ اصفهان ۲/۷۱± ۵۸/۹۹ درصد بازدارندگی داشتند که در مقابل در عصاره‌گیری توسط اتیل استات، اکوتیپ سمنان با ۳/۶۹± ۷۱/۰۴ درصد، اکوتیپ مازندران ۳/۴۷± ۶۴/۵۲ درصد و اکوتیپ اصفهان با ۱/۵۸± ۹/۰۹ درصد به‌ترتیب دارای بیشترین و کمترین مقدار درصد بازدارندگی بودند. درروش FRAP با توجه به شکل ۲، عصاره‌گیری توسط اتیل استات به‌ترتیب، اکوتیپ سمنان با ۱/۳۷± ۱۸/۵۳، اکوتیپ مازندران ۱/۰۹± ۱۸/۴۰ و اکوتیپ اصفهان ۰/۴۸± ۱۷/۶۴ در مقایسه با عصاره‌گیری

توسط اتانول، اکوتیپ اصفهان با ۰/۹۳± ۱۷/۱۱، اکوتیپ سمنان ۰/۶۱± ۱۳/۴۶ و اکوتیپ مازندران با ۰/۵۴± ۱۱/۵۵ فعالیت آنتی‌اکسیدانی بالاتری را نشان می‌دهند.

طبق نتایج حاصل از بررسی فنل و فلاونوئید اکوتیپ‌های *A. aucheri* توسط عصاره قطبی و غیرقطبی در جدول ۴ به شرح زیر می‌باشد.



شکل ۲- ارزیابی پتانسیل آنتی‌اکسیدانی عصاره قطبی و غیرقطبی سه اکوتیپ گونه *A. aucheri* با روش FRAP

Figure 2- Evaluating the antioxidant potential of polar and non-polar extracts of 3 ecotypes of *A. aucheri* by FRAP method

شاخص بالای هر ستون نشان‌دهنده خطای استاندارد(SE±) می‌باشد.

The index above each column indicates the standard error

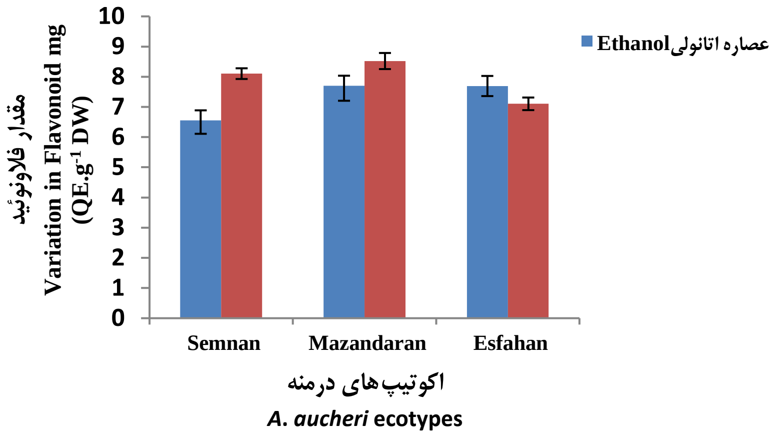
جدول ٤- مقایسه میانگین و انحراف معیار فنل و فلاونوئید عصاره‌های اتانولی و اتیل استاتی گونه‌های درمنه مورد بررسی

Table 4- Comparing the mean and standard deviation of phenol and flavonoids of ethanolic and ethyl acetate extracts of the investigated species

(Code)[B]	**تغییرات فلاونوئید و فنول (میانگین ± انحراف معیار[A]) Variation in Flavonoid & Phenolic (Mean ± SD[A])**							
	فلاونوئید Flavonoid (mg QE.g^{-1} DW)							
	اتانول Ethanol				**اتیل استات Ethyl acetate**			
	1	**2**	**3**	**total**	**1**	**2**	**3**	**total**
	6.55± 0.44	7.70± 0.50	7.69 ±0.33	7.32 ±0.42	8.10± 0.18	**8.52± 0.27	7.10± 0.21	7.91± 0.22
	فنل کل Phenolic (mg GAE.g^{-1} DW)							
	اتانول Ethanol				**اتیل استات Ethyl acetate**			
	1	**2**	**3**	**total**	**1**	**2**	**3**	**total**
	56.63 ±0.38	41.62± 0.11	62.62± 0.11	53.62± 0.20	32.30± 0.35	22.60± 0.21	37.12 ±0.04	30.67± 0.20

[A] انحراف معیار، [B] کد استان، * حداقل مقدار، ** حداکثر مقدار

[A] Standard deviation. [B] Province code. * Minimum. ** Maximum

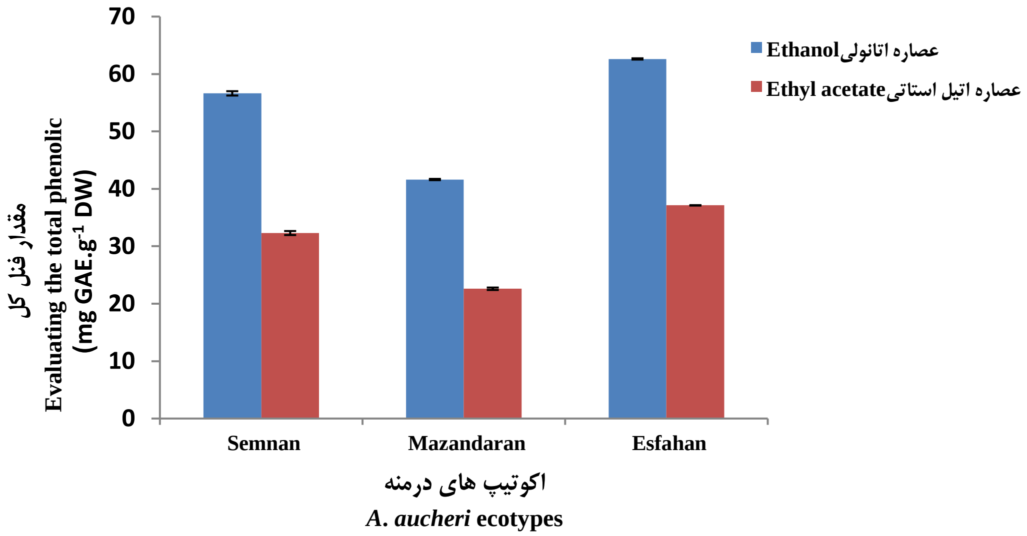


شکل ۳- ارزیابی محتوای فلاونوئیدی عصاره قطبی و غیرقطبی سه اکوتیپ گونه *A. aucheri*

Figure 3- Evaluating the flavonoid content of polar and non-polar extracts of 3 ecotypes of *A. aucheri* species

شاخص بالای هر ستون نشان‌دهنده خطای استاندارد(SE±) می‌باشد.

The index above each column indicates the standard error



شکل ٤- ارزیابی محتوای فنل کل عصاره قطبی و غیرقطبی سه اکوتیپ گونه *A. aucheri*

Figure 4- Evaluating the total phenolic content of polar and non-polar extracts of 3 ecotypes of *A. aucheri* species

شاخص بالای هر ستون نشان‌دهنده خطای استاندارد(SE±) می‌باشد.

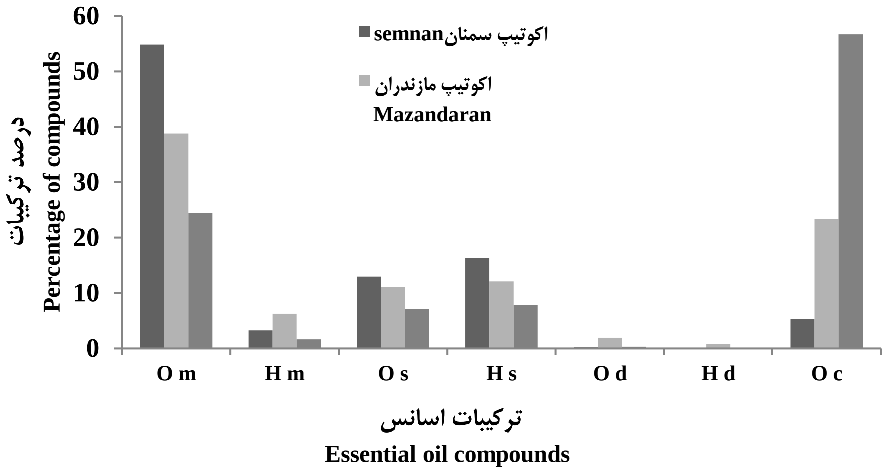
The index above each column indicates the standard error

با توجه به شکل ۳، در عصاره‌گیری توسط اتیل استات، اکوتیپ مازندران با ۰/۲۶± ۸/۵۲ (mg QE/g DW) بیشترین مقدار محتوی فلاونوئیدی را دارد. اکوتیپ سمنان با ۰/۱۷± ۸/۱۰ (mg QE/g DW) و اکوتیپ اصفهان ۰/۲۰± ۷/۱۰ (mg QE/g DW) به‌ترتیب قابل مشاهده بود که در مقابل، در عصاره‌گیری توسط اتانول، اکوتیپ مازندران با ۷/۷۰±۰/۴۹ (mg QE/g DW)، اکوتیپ اصفهان ۰/۳۳± ۷/۶۹ (mg QE/g DW) و اکوتیپ سمنان با ۶/۵۵±۰/۴۴ (mg QE/g DW) به‌ترتیب دارای بیشترین و کمترین مقدار محتوی فلاونوئید بودند. به‌جز اکوتیپ اصفهان بقیه اکوتیپ‌ها دارای بیشترین محتوای فلاونوئیدی در عصاره اتیل استاتی بودند.

در ارزیابی فنل کل با توجه به شکل ۴، عصاره‌گیری توسط اتانول، اکوتیپ اصفهان ۰/۱۱± ۶۲/۶۲ میلی‌گرم معادل اسید گالیک بر گرم وزن خشک، اکوتیپ سمنان ۰/۳۷± ۵۶/۶۲ و اکوتیپ مازندران با ۰/۱۱± ۴۱/۶۲ میلی‌گرم معادل اسید گالیک بر گرم وزن خشک، در مقایسه با عصاره‌گیری توسط اتیل استات به‌ترتیب، اکوتیپ اصفهان با ۰/۰۳± ۳۷/۰۲ میلی‌گرم معادل اسید گالیک بر گرم وزن خشک،

اکوتیپ سمنان ۰/۳۴± ۳۲/۳۰ و اکوتیپ مازندران ۰/۲۱± ۲۲/۵۹ میلی‌گرم معادل اسید گالیک بر گرم وزن خشک عملکرد بهتری را نشان می‌دهند.

در کل، عصاره اتیل استاتی، اکوتیپ مازندران با ۰/۲۶± ۸/۵۲ (mg QE/g DW) بیشترین مقدار محتوی فلاونوئیدی و عصاره اتیل استاتی در سنجش فلاونوئید بهترین عملکرد را داشت. از سوی دیگر، عصاره اتانولی اکوتیپ اصفهان ۰/۱۱± ۶۲/۶۲ میلی‌گرم معادل اسید گالیک بر گرم وزن خشک دارای بیشترین مقدار فنل کل و در مجموع عصاره اتانولی بهترین عملکرد را در سنجش فنل کل داشت.



شکل ۵- ارزیابی محتوای ترکیبات اسانس سه اکوتیپ گونه *A. aucheri*

Figure 5- Evaluating the content of essential oil compounds of 3 ecotypes of *A. aucheri* species

(oh) مونوترپن‌های اکسیژن‌دار، (hm) مونوترپن‌های هیدروکربنی، (os) سزکوئیترپن‌های اکسیژن‌دار، (hs) سزکوئیترپن‌های هیدروکربنی، (od) دی ترپن‌های اکسیژن‌دار، (hd) دی ترپن‌های هیدروکربنی، (oc) دیگر ترکیبات

(oh) Oxygenated monoterpenes, (hm) Hydrocarbon monoterpenes, (os) Oxygenated sesquiterpenes, (hs) Hydrocarbon sesquiterpenes, (od) Oxygenated Diterpenes, (hd) Hydrocarbon Diterpenes, (oc) Other compounds

بررسی ترکیب‌های مختلف اسانس اکوتیپ‌های *A. aucheri* نشان داد (شکل ۵) که بین اجزای سازنده اسانس و میزان آن‌ها تفاوت وجود دارد. در کل، اکوتیپ سمنان با ۴۴ ترکیب دارای بیشترین ترکیب به‌دست آمده و به‌ترتیب اکوتیپ اصفهان با ۴۱ ترکیب و اکوتیپ مازندران با ۲۸ ترکیب کمترین تعداد ترکیب به‌دست آمده از اسانس را نشان دادند. در مجموع، فقط ۱۱ ترکیب مشترک با هم داشتند. به‌ترتیب اکوتیپ مازندران با ۱/۱۰ درصد، اکوتیپ سمنان با ۱/۰۶ درصد و اکوتیپ اصفهان با ۰/۵۲ درصد بیشترین و کمترین درصد اسانس را در ماده خشک گیاهی به خود اختصاص دادند.

از مجموع ترکیبات اسانس، مونوترپن‌های اکسیژن‌دار بیشترین ترکیبات را به خود اختصاص داده‌اند. در اکوتیپ سمنان ۵۴/۸۲ درصد، در اکوتیپ مازندران ۳۸/۸۱ درصد و در اکوتیپ اصفهان ۲۴/۴۱ درصد از ترکیبات را مونوترپن‌های اکسیژن‌دار در برگرفته‌اند.

بحث

در مجموع، در آزمایش FRAP بهترین بازدارندگی متعلق به عصاره اتیل استاتی می‌باشد. در کل، آزمایش DPPH با اختلاف زیادی عصاره اتانولی عملکرد بهتری نشان داد؛ که نتایج به‌دست آمده ممکن است با توجه به اختلاف ارتفاع از سطح دریا و دما باشد. از سوی دیگر، به‌منظور تأثیر بر تجمع این متابولیت‌ها، نور یک عامل ضروری است. می‌توان ترکیب‌های مختلفی از شدت نور و کیفیت نور را عاملی بر این اختلاف پتانسیل آنتی‌اکسیدانی در نظر گرفت (Bahrami *et al*., 2015).

طبق گزارشات توما و همکاران (Thoma *et al*., 2020) اثرات آنتی‌اکسیدانی عصاره‌های اتانولی و متانولی با یکدیگر اختلاف معنی‌داری نداشته، ولی به‌صورت معنی‌دار برتر از عصاره هگزانی بودند و از نظر آماری اختلاف معنی‌داری در قدرت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌های قطبی و غیرقطبی وجود دارد که در پژوهش حاضر در آزمایش DPPH به‌طور واضح قابل مشاهده می‌باشد.

با در نظر گرفتن این مورد که نوع حلال مورداستفاده در عصاره‌گیری بر فعالیت آنتی‌اکسیدانی بسیار مؤثر می‌باشد (Asgari-kafrani *et al*., 2021)، به‌طوری‌که در بسیاری تحقیقات صورت گرفته ظرفیت احیاکنندگی عصاره‌های قطبی و نیمه قطبی بیشتر از عصاره‌های غیرقطبی گزارش‌شده است (Mole & Sabale, 2015).

نتایج این تحقیق همانند نتایج پژوهشی درباره ظرفیت پاکسازی رادیکال آزاد در دو گونه بررسی‌شده، عصاره‌های قطبی (متانولی) و نیمه قطبی (اتیل استاتی) نسبت به عصاره غیرقطبی (هگزانی) فعالیت احیاکنندگی بالاتری را نشان دادند. علت فعالیت بالای عصاره‌های قطبی و نیمه قطبی را می‌توان به‌دلیل توانایی استخراج ترکیبات فعال فنلی، فلاونوئیدی، کارتنوئیدها و بسیاری از ترکیبات فعال دیگر توسط این حلال‌ها دانست (Suzuki *et al.*, 2002). عوامل مختلفی از جمله قطبیت حلال بر بازده استخراج عصاره اثر می‌گذارند، از سوی دیگر باید خصوصیات حلال را نیز در نظر داشت. با توجه به اینکه روش DPPH یک روش آبی است، بنابراین عصاره‌های قطبی‌تر اثر بیش‌تری از خود نشان می‌دهند که کاملاً با یافته‌های پژوهش حاضر مطابقت دارد.

البته در برخی مطالعات انجام شده عصاره‌های غیرقطبی فعالیت بالاتری را نسبت به عصاره‌های قطبی و نیمه قطبی نشان داده‌اند. به‌عنوان‌مثال لیم و همکاران (Lim *et al.*, 2002) فعالیت احیاکنندگی FRAPعصاره غیرقطبی دیکلرومتان گونه *Siliquastrum Sargassum* را قوی‌تر از عصاره متانولی آن گزارش داده‌اند که با نتایج تحقیق حاضر مطابقت دارد. بنابراین می‌توان گفت با توجه به اینکه براساس نوع گونه گیاهی میزان ترکیبات استخراج‌شده توسط حلال‌های عصاره‌گیری شده متفاوت می‌باشد، پس تفاوت اثر آنتی‌اکسیدانی یک حلال از گونه‌های مختلف به‌دلیل تفاوت در ترکیبات استخراج شده توسط آن حلال می‌باشد (Amirmohammadi *et al.*, 2020). به‌طور کلی، فعالیت مهار آنزیم آلفا آمیلازی و آنتی‌اکسیدانی علاوه‌بر نوع گونه گیاهی به نوع حلال و روش سنجش فعالیت آن‌ها نیز بستگی دارد. در پژوهشی که اخیراً محققان گزارش داده‌اند، در گونه *A. lactiflora* میزان فعالیت مهار آنتی‌اکسیدانی در عصاره قطبی بیشتر از عصاره غیرقطبی (اتیل استات) گزارش شده است. این محققان بیان کردند که استخراج توسط عصاره قطبی می‌تواند فیتوکمیکال‌هایی را با بالاترین فعالیت آنتی‌اکسیدانی در میان سایر سیستم‌های حلال به‌دست آورد (Kooltheat *et al.*, 2021). البته این مورد به روش تست آنتی‌اکسیدانی نیز مرتبط می‌باشد. علاوه‌براین، باید توجه داشت که فعالیت آنتی‌اکسیدانی ممکن است به ساختار شیمیایی ترکیبات فنلی و همچنین اثر هم‌افزایی یا آنتاگونیستی ترکیبات موجود در عصاره گیاه مربوط باشد (Aghaee *et al.*, 2022).

یافته‌های این پژوهش می‌تواند با نتایج محققان دیگری (Yavari & Shahgolzari, 2016; Mohammadnejad Ganji *et al.*, 2017) که بیان کردند میزان ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی گیاهان دارویی در مناطق مختلف تحت تأثیر فاکتورهای محیطی از قبیل اختلافات آب‌وهوایی و جغرافیایی مانند ارتفاع قرار دارد، دلایل مشترک داشته باشد. مطالعات انجام شده بیان داشتند که نقش اکوفیزیولوژی ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی را علاوه‌بر یکی از شاخص‌های حساس به تغییرات محیطی، یکی از نشانگرهای بیوشیمیایی دفاعی گیاه در برابر تنش‌های محیطی نشان می‌دهد. ارتفاع از سطح دریا که نقش اساسی در رشد و تولید متابولیت‌های ثانویه گیاهان در اکوسیستم‌ها و رویشگاه-های طبیعی مختلف ایفا می‌نماید با توجه به موقعیت اکوتیپ‌ها، اکوتیپ سمنان با ارتفاع ۲۳۷۷ متر از سطح دریا و میانگین دمای سالیانه ۱۴/۱ درجه سانتی‌گراد و بارش سالیانه ۱۶۱/۱ میلی‌متر دارای بیشترین فعالیت آنتی‌اکسیدانی می‌باشد. اکوتیپ مازندران با ارتفاع ۱۱۷۸ متر از سطح دریا، میانگین دمای سالیانه ۱۷/۶ درجه سانتی‌گراد و میانگین بارندگی ۶۵۶ میلی‌متری دارای بیشترین محتوای فلاونوئیدی و اکوتیپ اصفهان با ارتفاع از سطح دریای ۲۳۱۳ متری، میانگین دمای سالیانه ۱۰/۱ درجه سانتی‌گراد و میانگین بارندگی ۴۰۰ میلی‌متری بیشترین فنل کل را در مجموع نشان دادند. بنابراین، ارتفاع از جمله عوامل مهم و تعیین‌کننده در کمیت و کیفیت گیاهان محسوب می‌شود که دربرگیرنده دما و بارندگی نیز می‌باشد (Mirazadi & Pilehvar, 2013). بنابراین کاملاً مشهود است که شرایط محیطی بر میزان متابولیت‌های درمنه کاملاً تأثیر می‌گذارد، که با نتایج پژوهش کروزیناوسکایت و راودون (Kruzinauskaite & Raudone, 2021) هم‌خوانی دارد.

در پژوهشی، بیشترین محتوای فنلی عصاره قطبی (۱۳۴/۴۷ میلی‌گرم معادل اسید گالیک ۱۰۰ گرم ماده خشک) و بیشترین محتوای فلاونوئید عصاره اتیل استات (۸۷/۰۴ میلی‌گرم کوئرستین معادل ۱۰۰ گرم ماده خشک) در درمنه گزارش گردید (Lee *et al.*, 2013) که با نتایج این تحقیق مطابقت دارد. در پژوهش دیگر، اتانول به‌عنوان بهترین حلال برای استخراج ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی گزارش گردید که به دلیل توانایی اتانول برای تخریب دیواره‌های سلولی غیرقطبی از طریق فعل و انفعالات نیمه قطبی افزایش یافته است که منجر به انتشار فزاینده ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی درون سلولی می‌شود و اتانول بدون توجه به روش استخراج یکی از بهترین حلال‌های استخراج معرفی نمودند (Muflihah *et al.*, 2021).

از طرفی، نتایج این تحقیق نشان داد که بین ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی با فعالیت آنتی‌اکسیدانی ارتباط وجود دارد که با نتایج دیگر محققین (Rezaei *et al.*, 2019; Fang *et al.*, 2009) مطابقت دارد. این نتایج بیانگر این امر است که با افزایش میزان فنل و فلاونوئید فعالیت آنتی‌اکسیدانی نیز در گیاه افزایش می‌یابد. در پژوهشی، میزان فلاونوئید و مخصوصاً فنل در گونه *A. lactiflora* در عصاره‌های قطبی بیشتر از غیرقطبی به‌دست آمد (Kooltheat *et al.*, 2021) که در سنجش فنل با نتایج این پژوهش هم‌خوانی دارد.

با توجه به اینکه اکوتیپ سمنان دارای بیشترین درصد مونوترپن‌های اکسیژن‌دار می‌باشد که این ترکیبات از جمله ترکیبات

ارزشمند گیاهی و ایجادکننده عطر، طعم و رایحه غلیظ در اسانس می‌باشند، از سوی دیگر اکوتیپ مازندران دارای بیشترین درصد اسانس در بین اکوتیپ‌های مورد مطالعه را دارد. ترکیبات اسانس‌ها تحت تأثیر عوامل آب وهوایی، جغرافیایی و فصلی و واریته گیاه تغییر می‌کند (Najafian *et al.*, 2018).

به‌دست آوردن گیاهانی که از نظر یک اجزای اسانس غنی باشند، در صنعت و تولید مواد آرایشی و دارویی بسیار حائز اهمیت می‌باشد. این اختلاف در درصد تشکیل مواد مؤثره اسانس‌ها در نقاط مختلف می‌تواند به‌دلیل تفاوت‌های اقلیمی از جمله میزان رطوبت و میزان تابش نور در اکوسیستم‌های مختلف باشد، زیرا عوامل محیطی می‌توانند باعث کاهش یا افزایش میزان تنفس و فتوسنتز در گیاهان شوند، بنابراین تغییر در نوع و میزان ترکیبات ثانویه تفاوت‌های قابل توجهی را ایجاد می‌نمایند.

نتیجه‌گیری

نتایج بررسی حاضر به‌طور شفاف بیان می‌کند که گونه *A.aucheri* در اکوتیپ‌های مختلف غنی از ترکیبات فنلی، فلاونوئیدی و دارای فعالیت آنتی‌اکسیدانی خوبی می‌باشد. از مجموع نتایج به‌دست آمده می‌توان این استنباط را نمود که قدرت فعالیت آنتی‌اکسیدانی به‌میزان قابل توجهی تحت تأثیر ماهیت حلال، روش استخراج و تعامل این دو بستگی دارد. با این حال، قدرت استخراج حلال، مهم‌ترین فاکتور مؤثر بر ظرفیت آنتی‌اکسیدانی محصول می‌باشد. نتایج این تحقیق نشان داد که نوع حلال و روش استخراج بر میزان استخراج ترکیبات فنولیک اثر می‌گذارند. البته گیاه دارویی *A.aucheri* نیز تحت تأثیر عوامل محیطی بوده، خواص آنتی‌اکسیدانی، درصد اسانس و میزان مواد فنلی گیاه هر منطقه بستگی به پارامترهای زیادی از جمله آب‌وهوا، ارتفاع و نور و حتی غنای خاک دارد؛ بنابراین جهت جمع‌آوری یا اهلی‌سازی گیاه علاوه‌بر گونه، شرایط محیطی ایده‌آل برای تولید متابولیت مورد نظر و مقدار آن از اهمیت ویژه‌ای برخوردار می‌باشد؛ بنابراین با توجه به نوع نیاز و مقدار متابولیت مورد نظر می‌توان از منطقه مناسب جمع‌آوری و یا کشت کرد.

References

1- Aghaee, Z., Alizadeh, A., Honarvar, M., & Babadaei Samani, R. (2022). Phytochemical screening and antimicrobial activity of *Salvia sharifii* Rech. & Esfand from Iran. *Natural Product Research*, *36*(10), 2585-2590. https://doi.org/10.1080/14786419.2021.1906241

2- Amirmohammadi, F., Azizi, M., & Nemati, S.H. (2020). Comparison of phytochemical composition and antioxidant activity of seven *Nepeta* species cultivated in Mashhad. *International Journal of Horticultural Science and Technology*, *21*(1), 23-40. http://dorl.net/dor/20.1001.1.16807154.1399.21.1.5.9

3- Asgari-kafrani, A., Fazilati, M., & Nazem, H. (2021). Evaluation the effect of different solvents and extraction method on phytochemical content and antioxidant activity of *Moringa oleifera* leaf extract. *Food Science and Technology*, *18*(114), 133-145. https://doi.org/10.52547/fsct.18.114.133

4- Bahrami Samani, L., Fooladger, M., & Amjad, L. (2015). The effect of storage time of *Artemisia deserti* on phytochemistry and essential oil and extract yields. *Applied Chemistry*, *10*(35), 111-130(In Persian). https://doi.org/10.22075/chem.2017.715

5- Bahukhandi, A., Rawat, S., Bhatt, I.D., & Rawal, R.S. (2013). Influence of solvent types and source of collection on total phenolic content and antioxidant activities of *Acorus calamus* L. *National Academy Science Letters*, *36*, 93-99. https://doi.org/10.1007/s40009-012-0109-8

6- Benzie, I.F., & Strain, J.J. (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: the FRAP assay. *Analytical Biochemistry*, *239*(1), 70-76. https://doi.org/10.1006/abio.1996.0292

7- Bidgoli, R.D., Pessarakli, M., Heshmati, G.A., Ebrahimabadi, A.H. (2013). Effects of topographic factors of the site on the essential oil compounds of *Artemisia aucheriaerial* parts Grown in a Mountainous region. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, *44*(17), 2618-2624. http://www.tandfonline.com/action/showCitFormats?doi=10.1080/00103624.2013.803570

8- Bora, K.S., Sharma, A. (2011). The genus *Artemisia*: A comprehensive review. *Pharm Biol*, *49*(1), 101-109.

9- Bovicelli, P. (2010). Radical-scavenging polyphenols: new strategies for their synthesis. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, *59*(12), 1703-1710. https://doi.org/10.1211/jpp.59.12.0013

10- Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E., & Berset, C.L.W.T. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food Science and Technology*, *28*(1), 25-30. https://doi.org/10.1016/S0023-6438(95)80008-5

11- Ehsani, A., Ahmdian, M., Rashvand, S., DehghaniTafti, M.A., & Zare, M. (2014). Comparison of phenology of Artemisia aucheri in semi-steppe regions of Iran. *Iranian Journal of Range and Desert Research*, *21*(1), 13-24 (In Persian). https://doi.org/10.22092/ijrdr.2014.8067

12- Fang, Z., Zhang, Y., Lü, Y., Ma, G., Chen, J., Liu, D., & Ye, X. (2009). Phenolic compounds and antioxidant capacities of bayberry juices. *Food Chemistry*, *113*, 884-8. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.07.102

13- Gulcin, İ. (2020). Antioxidants and antioxidant methods: an updated overview. *Archives of Toxicology*, *94*(3), 651-715. https://doi.org/10.1007/s00204-020-02689-3
14- Haider, F., Kumar, N., Banerigee, S., Naqvi, A., & Baggi, G. (2009). Effect of altitude on the essential oil constituents of *Artemisia roxburghiana* Besser Var. *Purpurascens* (Jacq) Hook. *Journal of Essential Oil Research*, 21, 127-33. https://doi.org/10.1080/10412905.2009.9700177
15- Hoareau, L., Dasilva E.J. (1999). Medicinal plants: A reemerging health aid. *Journal of Electronic Biotechnology*, *2*(2), 3-4. http://dx.doi.org/10.4067/S0717-34581999000200002
16- Hosseini, S.Z., Kappas, M., Zare Chahouki, M.A., Gerold, G., Erasmi, S., & Rafiei Emam, A. (2013). Modelling potential habitats for *Artemisia sieberi* and *Artemisia aucheri* in Poshtkouh area, central Iran using the maximum entropy modeland geostatistics. *Ecological Informatics*, 18, 61-68. https://doi.org/10.1016/j.ecoinf.2013.05.002
17- Hosu A., Cristea, V.M., & Cimpoiu, C. (2014). Analysis of total phenolic, flavonoids, anthocyanins and tannins content in Romanian red wines: Prediction of antioxidant activities and classification of wines using artificial neural networks. *Food Chemistry*, *150*, 113–118. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.10.153
18- Judzentiene, A., Tomi, F., & Casanova, J. (2009). Analysis of essential oils of *Artemisia aucheri* L. from Lithuania by CC, GC(RI), GC-MS and 13C NMR. *Natural Product Communications*, *4*(8), 1934578X0900400820. https://doi.org/10.1177/1934578X0900400820
19- Khalili, M., & Ebrahimzadeh, M. (2015). A review on antioxidants and some of their common evaluation methods. *Journal of Mazandaran University of Medical Sciences*, *24*, 188-208. http://jmums.mazums.ac.ir/article-1-4858-en.html
20- Kooltheat, N., Chujit, K., Nuangnong, K., Nokkaew, N., Bunluepuech, K., Yamasaki, K., & Chatatikun, M. (2021). *Artemisia lactiflora* extracts prevent inflammatory responses of human macrophages stimulated with charcoal pyrolysis smoke. *Journal of Evidence-Based Integrative Medicine*, *26*, 2515690X211068837. https://doi.org/10.1177/2515690X211068837
21- Kruzinauskaite, J., & Raudone, L. (2021). Determination of phenolic compounds content and antiradical activity in Artemisia aucheri l. During different vegetation periods. Thesis in Universiteto mokslo publikacijos.
22- Lee, Y.J., Thiruvengadam, M., Chung, I.M., & Nagella, P. (2013). Polyphenol composition and antioxidant activity from the vegetable plant *Artemisia aucheri* L., *Australian Journal of Crop Science*, *7*(12), 1921-1926.
23- Lim, S.N., Cheung, P.C., Ooi, V.E., & Ang, P.O. (2002). Evaluation of antioxidative activity of extracts from a brown seaweed, *Sargassum siliquastrum*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *50*(13), 3862-3866. https://doi.org/10.1021/jf020096b
24- Majdan, M., Kiss, A.K., Hałasa, R., Granica, S., Osińska, E., Czerwińska, M.E. (2020). Inhibition of Neutrophil Functions and Antibacterial Effects of tarragon (*Artemisia dracunculus* L.) infusion-phytochemical characterization. *Frontiers in Pharmacology*, *11*, 947. https://doi.org/10.3389/fphar.2020.00947
25- Mirazadi, Z., & Pilehvar, B. (2013). The effects of some ecological factors on *Myrtus Communis* distribution in Lorestan province. *Iranian Forests Ecology*, *1*(2), 1-11. http://dorl.net/dor/20.1001.1.24237140.1392.1.2.1.9
26- Mohabatkar, H., Nosrati, M., Behbahani, M., & Rahiminejad, M.R. (2016). Antibacterial and mutagenicity activity of different species of *artimisia* spp. and their effect on proliferation of human lymphocytes. *Journal of Mazandaran University of Medical Sciences*, 26(142), 82-95. http://jmums.mazums.ac.ir/article-1-8792-en.html
27- Mohammadnejad Ganji, S.M., Moradi, H., Ghanbari, A., & Akbarzadeh, M. (2017). Quantity and quality of secondary metabolites in lavender plant under the influence of ecological factors. *Nova Biologica Reperta*, *4*, 166-172. https://doi.org/10.21859/acadpub.nbr.4.2.166
28- Mohtashamnia, S. (2012). Evaluation of the most important environmental factors affecting the distribution of the genus Artemisia in Fars province (Case: Steppe grasslands in Fars). *Natural Ecosystems of Iran*, *1*(3), 75-86 (In Persian)
29- Mole, M.N., & Sabale, A. (2015). Antibacterial and antioxidant potential of ulva and ectocarpus. *Indian Journal of Applied Research*, 5, 805-808.
30- Morshedloo, M.R., Salami, S.A., & Nazeri, V., Maggi, F., & Craker, L. (2018). Essential oil profile of oregano (*Origanum vulgare* L.) populations grown under similar soil and climate conditions. *Industrial Crops and Products*, *119*, 183-190. https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.03.049
31- Mozaffarian, V. (2008). Flora (Persian) Iran No. 59: compositae, Research Institute of Forests and Pastures, Tehran, 203 p. (In Persian).
32- Muflihah, Y.M., Gollavelli, G., & Ling, Y.C. (2021). Correlation study of antioxidant activity with phenolic and flavonoid compounds in 12 indonesian indigenous herbs. *Antioxidants*, *10*(10), 1530. https://doi.org/10.3390/antiox10101530
33- Najafian, S., Rowshan, V., & Mirzaee, R. (2018). Seasonal changes of myrtle essential oil composition. *International Journal of Horticultural Science and Technology*, *19*(1), 89-98 (In Persian). http://dorl.net/dor/20.1001.1.16807154.1397.19.1.4.4

34- Nasirpour, M., Yavarmanesh, M., Mohhamadi Sani, A., Nasirpour, M., & Mohamdzade Moghadam., M. (2014). Antibacterial effect of aqueous extract of *Artemisia aucheri*, *Artemisia sieberi* and *Hyssopus officinalis* L. on the food borne pathogenic bacteria. *Food Science and Technology*, *12*(46), 73-84. (In Persian)
35- Rashvand, S., Ehsani, A., Yeganeh, H., & Sanaei, A. (2014). Studying the phenological stages of *Thymus kotschyanus* and *Artemisia aucheri* in Alamot semi-steppe rangelands, Ghazvin. *Journal of Range and Desert Research*, *21*(4), 591-603. (In Persian). https://doi.org/10.22092/ijrdr.2016.13056
36- Rezaei, J., Zare Mehrjerdi, M., Mastali, H., & Yazdani, N. (2019). Morphological and phytochemical evaluation in some populations of *Allium* from Iran. *International Journal of Horticultural Science and Technology*, *20*(3), 337-348. http://dorl.net/dor/20.1001.1.16807154.1398.20.3.3.4
37- Safari, D. (1994). *Pharmacognostic study of Artemisia aucheri and Artemisia sieberi in Isfahan*. pharma D Thesis. Faculty of pharmacy, the University of Medical Science, p. 128.
38- Sapkota, P. (2008). Ethno-ecological observation of Magar of Bukini, Baglung, Western, Nepal. *Dhaulagiri Journal of Sociology and Anthropology*, *2*, 227-252.
39- Suzuki, M., Watanabe, T., Miura, A., Harashima, E., Nakagawa, Y., & Tsuji, K. (2002). An extraction solvent optimum for analyzing polyphenol contents by folin-denis assay. *Japanese Society of Food Science and Technology*, *49*(7), 507-511. https://doi.org/10.3136/nskkk.49.507
40- Taghavizadeh Yazdi, M.E., Darroudi, M., Amiri, M.S., Hosseini, H.A., Nourbakhsh, F., Mashreghi, M., Farjadi, M., Mousavi Kouhi, S.M., & Mousavi, S.H. (2020). Anticancer, antimicrobial, and dye degradation activity of biosynthesised silver nanoparticle using *Artemisia kopetdaghensis*. *Micro and Nano Letters*, *15*(14), 1046-1050. https://doi.org/10.1049/mnl.2020.0387
41- Thoma, F., Somborn-Schulz, A., Schlehuber, D., Keuter, V., & Deerberg, G. (2020). Effects of light on secondary metabolites in selected leafy greens: A review. *Frontiers in Plant Science*, *11*, 497. https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00497
42- Turuspekov, Y., Genievskaya, Y., Baibulatova, A., Zatybekov, A., Kotuhov, Y., Ishmuratova, M., Imanbayeva, A., & Abugalieva, S. (2018). Phylogenetic taxonomy of *Artemisia* L. species from Kazakhstan based on Matk analyses. Proceedings of the Latvian Academy of Sciences. *Section B. Natural, Exact, and Applied Sciences*, *72*(1), 29-37. https://doi.org/10.1515/prolas-2017-0068
43- Yavari, A., & Shahgolzari, S.M. (2016). Effect of some ecological factors on quality and quantity of effective ingredient of *Stachys inflate* at Touyserkan region. *Agroecology Journal*, *12*(1), 77-85.
44- Zhang, X., Zhao, Y., Guo, L., Qiu, Z., Huang, L., & Qu, X. (2017). Differences in chemical constituents of *Artemisia annua* L from different geographical regions in China. *PLoS One*, *12*(9), e0183047. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0183047
45- Zheng, W., & Wan, S.Y. (2001). Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *49*(11), 5165-5170. https://doi.org/10.1021/jf010697n

Journal of Horticultural Science
https://jhs.um.ac.ir

Research Article
Vol. 38, No. 2, Summer 2024, p. 353-366

Investigation on the Effects of Carbon Nanotubes and Kinetin on Growth and Regeneration of *Salvia nemorosa* under *in vitro* Conditions

Y. Pourbeyrami Hir[1*], E. Chamani[2], M. Ahadzadeh[3], S. Shaker[4], R. Nabipour Sanjbod[3]

1, 2, 3 and 4- Associate Professor, Professor, Ph.D. Student and M.Sc., Department of Horticultural Sciences and Landscape Designing. Faculty of Agriculture and Natural Resources, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran, respectively.
(*- Corresponding Author Email: younes_ph62@uma.ac.ir)

Received: 13-10-2023
Revised: 24-01-2024
Accepted: 28-01-2024
Available Online: 28-01-2024

How to cite this article:
Pourbeyrami Hir, Y., Chamani, E., Ahadzadeh, M., Shaker, S., & Nabipour Sanjbod, R. (2024). Investigation on the effects of carbon nanotubes and kinetin on growth and regeneration of *Salvia nemorosa* under *in vitro* conditions. *Journal of Horticultural Science, 38*(2), 353-366. (In Persian with English abstract). https://doi.org/10.22067/jhs.2024.84810.1293

Introduction

The use of medicinal plants has surged in recent times, with a substantial portion of modern medicines derived from botanical sources. This surge in demand underscores the potential of cultivating and producing medicinal plants to not only bolster public health but also significantly contribute to a society's economic well-being.*Salvia nemorosa* is an herbaceous, perennial, and medicinal plant. This valuable plant belongs to the Labiatae family. The aerial parts of the plant, especially the leaves, contain essential oils. Furthermore, *S. nemorosa* contains chemical compositions such as saponin, organic acids, diterpenes, triterpenes, polyphenols, and a bitter substance called picrosalvin. In the plant tissue culture, the preparation of culture medium and formulation compatible with the tissue of the tested plant is vital for efficient regeneration and plant growth. Generally, no specific culture medium can be recommended for the growth of explants, and is necessary to make changes in the culture medium in order to better respond to different types of explants. Carbon nanotubes are nanomaterials that can be added to the culture medium and increase the growth rate of different parts of the plant such as roots, stems, and branches. Cytokines also commonly participate in cell divisions and proliferate shoots by removing terminal dominance. Considering the mentioned importance, this study was conducted to investigate the effect of carbon nanotubes, kinetin, and their interactions on some morphophysiological and phytochemical properties of *S. nemorosa* under *in vitro* conditions.

Materials and Methods

This experiment was carried out in the tissue culture and biotechnology laboratory of the Department of Horticultural Sciences, Faculty of Agriculture, University of Mohaghegh Ardabili. This study was conducted based on factorial design (completely randomized design) with five replications. The treatments included five levels of carbon nanotubes (0, 10, 20, 40, and 80 mg/L CNT) and three levels of kinetin (0, 2, and 4 mg/L CK). The seeds of *S. nemorosa* were sterilized with 70% ethanol for 40 seconds and then 2.5% hypochlorite sodium for 15 minutes (then the seed were washed with deionized water three times 3, 5, and 15 minutes). The sterilized seeds were planted in MS medium containing 30 g/L sucrose and 8 g/L agar, and then transferred to a growth chamber. After 40 days, the obtained seedlings were cut into single nodes by removing leaves and transferred to the main treatment medium. After that, some traits such as fresh weight, number of branches, number of leaves, number of roots, leaf area, root length, seedlings height, viability rate, germination rate, chlorophylls a, b, carotenoid content, phenol content, and flavonoid content were examined. The obtained data related to the experiment were analyzed with

©2024 The author(s). This is an open access article distributed under Creative Commons Attribution 4.0 International License (CC BY 4.0).

https://doi.org/10.22067/jhs.2024.84810.1293

SAS software, the comparison of data means was done with Duncan's test, and the graphs were plotted using Excel software.

Results and Discussion

The results indicated that the interaction effect of carbon nanotubes and kinetin on the indices of fresh weight, number of branches, number of leaves, number of roots, leaf area, root length, seedling height, survival percentage, germination percentage, pigment content photosynthesis was not significant. On the contrary, the interaction effect of two treatments on the content of total flavonoid and total phenol showed a significant difference. The highest phenol content was obtained in the treatment combination of 80 mg/L of carbon nanotubes and 4 mg/L of kinetin. On the other hand, increasing the concentration of carbon nanotubes up to 80 mg/L, the average shoot production, number of leaves, leaf area, plant height, root number, root length, chlorophyll a, b, carotenoid, phenol and flavonoid content. increased significantly. Also, by increasing the concentration of kinetin (4 mg/liter), the number of branches, the content of chlorophyll a and b increased significantly.

Conclusion

The characteristics of the *S. nemorosa* plant, except for fresh weight, significantly increased under the influence of carbon nanotube treatments. However, under the influence of kinetin treatment, only the number of branches, chlorophyll a, b, phenol content, and flavonoid content showed a significant increase. Based on the results of this study, carbon nanotubes can be used for proliferation and increasing the secondary metabolites of *S. nemorosa*. Despite the results of this study, it is still possible to use higher concentrations of carbon nanotubes in future research in order to increase the phytochemical properties and productivity of other medicinal plants.

Keywords: Chlorophyll, Cytokinin, Nanoparticles, Tissue culture

نشریه علوم باغبانی
https://jhs.um.ac.ir

مقاله پژوهشی
جلد ۳۸، شماره ۲، تابستان ۱۴۰۳، ص. ۳۶۶-۳۵۳

بررسی تأثیر نانو لوله‌های کربن و کینتین بر رشد و باززایی مریم گلی (*Salvia nemorosa*) تحت شرایط درون شیشه‌ای

یونس پوربیرامی هیر[۱*] - اسماعیل چمنی[۲] - مهسا احدزاده[۳] - شبنم شاکر[۴] - رقیه نبی پور سنجبد[۳]

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۷/۲۱
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۱۱/۰۸

چکیده

گونه *Salvia nemorosa* گیاهی دارویی، علفی و چند ساله از خانواده نعناعیان است. نانو لوله‌های کربن نوعی دگرشکلی[۶] از اتم‌های کربن هستند که به‌دلیل خاصیت آب‌دوستی موجب افزایش جذب آب و رشد قسمت‌های مختلف گیاهان می‌شوند. سایتوکنین‌ها نیز معمولاً در تقسیمات سلولی شرکت می‌کنند و با حذف غالبیت انتهایی باعث پرآوری شاخه‌ها می‌شوند. با توجه به اهمیت‌های ذکر شده، این پژوهش به‌منظور بررسی تأثیر نانو لوله‌های کربن، کینتین و همچنین، اثرات متقابل آن‌ها بر خصوصیات مورفولوژیکی و فیزیولوژیکی مریم گلی تحت شرایط درون شیشه‌ای انجام شد. بعد از کشت بذر در محیط کشت MS، گیاهان حاصل با حذف برگ‌ها به‌صورت تک گره برش داده شده و به محیط تیمار اصلی نانو لوله‌های کربن (صفر، ۱۰، ۲۰، ۴۰ و ۸۰ میلی‌گرم بر لیتر) و کینتین (صفر، دو و چهار میلی‌گرم بر لیتر) منتقل شدند. پس از گذشت ۴۰ روز برخی شاخص‌های مورفوفیزیولوژیکی و فیتوشیمیایی مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که اثر متقابل نانو لوله‌های کربن × کینتین بر شاخص‌های وزن تر، تعداد شاخه، تعداد برگ، تعداد ریشه، سطح برگ، طول ریشه، ارتفاع گیاهچه، درصد زنده‌مانی، درصد جوانه‌زنی، محتوای رنگیزه‌های فتوسنتزی معنی‌دار نبود. در مقابل، اثر متقابل دو تیمار بر محتوای فلاونوئید و فنل کل اختلاف معنی‌دار را نشان داد. بیشترین محتوای فنل در ترکیب تیماری ۸۰ میلی‌گرم بر لیتر نانو لوله کربن و چهار میلی‌گرم بر لیتر کینتین به‌دست آمد. از طرف دیگر، افزایش غلظت نانو لوله‌های کربن تا ۸۰ میلی‌گرم بر لیتر، میانگین تولید شاخساره، تعداد برگ، سطح برگ، ارتفاع گیاه، تعداد ریشه، طول ریشه، محتوای کلروفیل a، b، کارتنوئید، محتوای فنل و فلاونوئید را به‌طور معنی‌داری افزایش داد. همچنین با افزایش غلظت کینتین (چهار میلی‌گرم بر لیتر)، تعداد شاخه، محتوای کلروفیل a و b به‌طور معنی‌داری افزایش یافت. براساس نتایج حاصل از این پژوهش می‌توان از نانو لوله‌های کربن (۸۰ میلی‌گرم بر لیتر) به‌منظور پرآوری و افزایش متابولیت‌های گیاه مریم گلی استفاده نمود.

واژه‌های کلیدی: سایتوکینین، کشت بافت، کلروفیل، نانوذرات

مقدمه

گیاهان دارویی یکی از ارزشمندترین منابع طبیعی هر کشوری هستند که در صورت شناخت علمی، کشت، توسعه و بهره‌برداری صحیح می‌توانند نقش مهمی در سلامت جامعه، صادرات غیرنفتی و اشتغال‌زایی داشته باشند (Govil & Singh, 2010). گونه *Salvia nemorosa* گیاهی علفی و چند ساله، به‌علت داشتن کرک‌های ترشحی که سرشار از روغن‌های اتری و اسانس می‌باشد، به‌عنوان گیاه زینتی، دارویی، معطر و مغذی کاربرد دارد. وجود انواع ترپن‌ها در این گونه، آن‌را به‌عنوان یک گیاه دارویی مفید مجزا ساخته است. ترکیبات ترپنی شناسایی شده در این گونه شامل مونوترپن‌ها و سسکویی‌ترپن‌ها و ترکیبات غیرفرار ترپنی ازجمله دی‌ترپن‌ها و تری‌ترپن‌ها می‌باشند. همچنین در این گیاهان ترکیباتی مانند پلی‌فنول‌ها و فنول‌هایی مانند فلاونوئیدها و

۱، ۲، ۳ و ۴- به‌ترتیب دانشیار، استاد، دانشجوی دکتری و کارشناسی ارشد، گروه علوم باغبانی و فضای سبز، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران
(*- نویسندهٔ مسئول: Email: younes_ph62@uma.ac.ir)

https://doi.org/10.22067/jhs.2024.84810.1293

6- Allotropy

همچنین مشتقات کافئیک اسید نیز یافت شده است (Ulubelen, 1994). فعالیت‌های بیولوژیکی مریم گلی ناشی از وجود رزماریک اسید و مشتقات آن است. این ترکیبات دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانی، ضدالتهابی، ضد تومور، ضد موتاسیون، ضدقارچ، ضد ویروس و باکتری می‌باشند (Salimpour *et al.*, 2014).

نانو مولکول‌ها موادی هستند که اخیراً از طریق نانو فناوری ایجاد شده‌اند. توسط این ساختارها، امکان دست‌کاری‌ها در سطح نانو و تنظیم و کاتالیز واکنش‌های شیمیایی وجود دارد. در این میان، نانو لوله‌های کربنی نوعی دگرشکلی از اتم‌های کربن هستند که در سال‌های اخیر شناسایی شده‌اند (Ke *et al.*, 2011). یکی از ویژگی‌های مهم نانو لوله‌های کربنی این است که می‌توان آن‌ها را به حالت محلول در آب درآورد و با توجه به خاصیت آب‌دوستی در زمینه‌های شیمیایی و بیولوژیکی مورد استفاده قرار داد (Dobranszki *et al.*, 2005). نانو لوله‌های کربنی محلول در آب به روش‌های مختلفی نظیر، استفاده در محیط کشت سلول گیاهی، بذر یا گیاهچه (Wang *et al.*, 2012)، استفاده در آب آبیاری گیاهان و یا به‌صورت ترکیب با خاک رشدی گیاه مورد استفاده قرار می‌گیرند (Khodakovskaya *et al.*, 2012) و باعث افزایش میزان رشد در قسمت‌های مختلف گیاهان نظیر ریشه، ساقه و شاخه‌ها می‌شوند (Tripathi *et al.*, 2011). کاربرد نانو لوله های کربنی در کشاورزی اغلب در زمینه سموم گیاهی، انتقال ژن، بهبود مقاومت در برابر بیماری‌های گیاهی، استفاده در مواد مغذی کارآمد و افزایش رشد گیاهان می‌باشد (Wang *et al.*, 2012). توانایی این مواد در افزایش رشد گیاهان اغلب به‌دلیل ساختار و ویژگی‌های فیزیکی آن‌ها می‌باشد. علاوه‌براین، توانایی افزایش رشد گیاه توسط نانو لوله‌های کربنی به انواع آن‌ها (تک لایه یا چند لایه بودن) و همچنین وجود گروه‌های عاملی بر روی سطح آن‌ها نسبت داده شده است (Lacerda *et al.*, 2012).

انتخاب محیط کشت و تهیه فرمولاسیون سازگار با بافت گیاه مورد آزمایش، برای موفقیت در کشت بافت ضروری است. هیچ محیط کشت مشخصی را نمی‌توان برای رشد انواع مختلف ریزنمونه توصیه کرد و در اغلب موارد لازم است که تغییراتی در محیط کشت به‌منظور پاسخدهی بهتر انواع مختلف ریزنمونه صورت پذیرد (Smith, 2000). تنظیم کننده‌های رشد گیاهی به‌ویژه سایتوکنین‌ها کاربرد بسیار فراوانی در کشت بافت گیاهان دارند و باعث تنظیم رشدونمو اندام‌ها در محیط درون شیشه‌ای می‌گردند. همچنین این ترکیبات، در تولید جنین در کشت سوسپانسیون سلولی اهمیت بسیار زیادی دارند (Bhojwani & Dantu, 2013). در کشت شاخساره که فعالیت مریستم‌ها توسط هورمون‌ها کنترل می‌شود، به‌طور معمول از سایتوکنین استفاده می‌گردد. سایتوکنین‌ها معمولاً در تقسیمات سلولی و تمایزیابی شاخه‌های نابجا از کالوس و بافت‌های گیاهی شرکت می‌کنند. این ترکیبات به‌طور معمول با حذف غالبیت انتهایی باعث پرآوری شاخه‌ها می‌شوند (Bagheri *et al.*, 2013).

پاسخ‌های متنوعی در زمینه کاربرد نانو لوله‌های کربنی بر رشد و فیزیولوژی گیاهان مشاهده شده است که این تنوع به نوع نانو لوله‌های مورد استفاده و گونه گیاهی وابسته است. در پژوهشی گزارش شد که این ترکیبات تأثیر مثبتی بر افزایش طول ریشه خیار و پیاز داشته، رشد ریشه گوجه‌فرنگی را کاهش داده و بر رشد ریشه هویج و کلم تأثیر نداشته است (Cañas *et al.*, 2008). در مطالعه دیگری، نانو لوله‌های کربنی سبب افزایش درصد و سرعت جوانه‌زنی، افزایش طول ساقه و همچنین افزایش ۲/۵ برابری وزن دانهال در بذور گوجه‌فرنگی شد، ولی بر طول ریشه دانهال‌ها تأثیری نداشت (Khodakovskaya *et al.*, 2009). در تحقیق دیگری روی گوجه‌فرنگی مشخص شد که نانو لوله های کربن سبب افزایش دو برابری زیست‌توده این گیاه شده و بر سایر ویژگی‌های رشدی آن تأثیر نداشته است (Alimohammadi *et al.*, 2011).

در سال‌های اخیر، نحوه تأثیر نانوذرات بر روی رشدونمو گیاهان مورد توجه قرار گرفته است، بااین‌حال، هنوز خلأهایی در رابطه با تأثیر نانومواد بر رشد گیاهان دارویی وجود دارد. با وجود مطالعات بسیاری که بر روی مریم گلی صورت گرفته است، هنوز اطلاعاتی در مورد تأثیر نانو لوله‌های کربنی به همراه تنظیم کننده‌های رشد گیاهی به‌ویژه کینتین بر ویژگی‌های رشدی و فیتوشیمیایی مریم گلی در دسترس نیست. ازاین‌رو، در این مطالعه غلظت‌های مختلف این دو فاکتور بر شاخص‌های متعددی بررسی خواهد شد تا غلظت‌های بهینه به‌دست آید.

مواد و روش‌ها

مطالعه حاضر در محل آزمایشگاه کشت بافت و بیوتکنولوژی گروه علوم باغبانی و فضای سبز دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه محقق اردبیلی انجام گرفت. این پژوهش به‌صورت آزمایش فاکتوریل بر پایه طرح کاملاً تصادفی و با پنج تکرار انجام شد. تیمارهای آزمایشی مورد استفاده شامل کینتین در سه سطح صفر (شاهد)، دو و چهار میلی‌گرم بر لیتر و همچنین نانو لوله‌های کربن (US Research Nanomaterials, Inc.) در پنج سطح صفر (شاهد)، ۱۰، ۲۰، ۴۰ و ۸۰ میلی‌گرم بر لیتر بوده است. ویژگی‌های نانو لوله‌های کربنی به شرح جدول ۱ بود:

جدول ۱- مشخصات نانولوله‌های کربنی
Table 1- Characteristics of carbon nanotubes

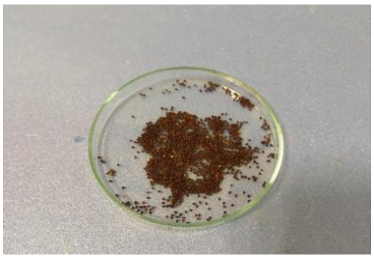
Single-walled carbon nanotubes (SWNTs, SWCNTs) نانولوله‌های کربنی تک جداره	
خلوص Purity	بیش از ۹۰ درصد وزنی Single-walled nanotubes > 90 wt%
قطر خارجی OD	۱-۲ نانومتر 1-2 nm
قطر داخلی ID	۰/۸ – ۱/۶ نانومتر 0.8-1.6 nm
قطر متوسط Average diameter	۱/۱ نانومتر 1.1 nm
طول Length	۵-۳۰ میکرومتر (میکروسکوپ الکترونی عبوری) 5-30 um (TEM)
مساحت سطح ویژه SSA	بیش از ۳۸۰ متر مربع بر گرم > 380 $m^2.g^{-1}$
خاکستر Ash	کمتر از ۱/۵ درصد وزنی < 1.5 wt%
چگالی ظاهری Tap density	۰/۱۴ گرم بر سانتی‌متر مکعب 0.14 $g.cm^{-3}$
چگالی حقیقی True density	تقریبا ۲/۱ گرم بر سانتی‌متر مکعب ~2.1 $g.cm^{-3}$
رسانایی الکتریکی Electric conductivity	بیش از ۱۰۰ زیمنس بر سانتی‌متر > 100 $S.cm^{-1}$
رسانایی حرارتی Thermal conductivity	۵۰-۲۰۰ وات بر متر کلوین 50-200 $W.m^{-1}.K^{-1}$
رنگ Color	مشکی Black
روش ساخت نانولوله‌های کربنی تک جداره Single-walled Carbon Nanotubes (SWNTs, SWCNTs) Manufacturing Method	رسوب‌دهی بخار شیمیایی CVD

به‌منظور پراکندگی[1] نانو لوله‌های کربنی، مقادیر مناسبی (براساس غلظت‌های مورد آزمایش) از آن‌ها در آب دیونیزه شده به‌شکل سوسپانسیون حل شدند. سپس به‌مدت ۳۰ دقیقه (شش بار به‌مدت پنج دقیقه) تحت اولتراسونیک کاملاً همگن شدند. هر پنج دقیقه یک بار دستگاه متوقف شد تا از بروز گرما و تولید کف جلوگیری شود. پس از اولتراسونیک، مایع همگن با دور ۲۰۰۰ دور در دقیقه به‌مدت ۳۰ دقیقه سانتریفیوژ شد تا ذرات حل نشده حذف شود. این مایع حاصل تا بیش از شش ماه می‌تواند پایدار باشد.

برای انجام این پژوهش بذرهای مریم گلی (*Salvia nemorosa*) (شکل ۱) ابتدا به‌مدت ۴۰ ثانیه در الکل اتانول ۷۰ درجه به‌صورت سطحی ضدعفونی شدند. سپس به‌مدت ۱۵ دقیقه در هیپوکلریت سدیم ۲/۵ درصد قرار گرفتند و پس از آن سه بار (۳، ۵ و ۱۵ دقیقه) با آب دیونیزه شسته شدند. بذور ضدعفونی شده در شیشه مربایی حاوی محیط کشت MS با ۳۰ گرم ساکارز و هشت گرم آگار کشت شدند. بذرهای کشت شده سپس به اتاقک رشد با دمای ۲۴ درجه سانتی گراد و لامپ های فلورسنت با شدت نور ۲۰۰۰ لوکس (۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی) انتقال یافتند. پس از مدت ۴۰ روز گیاهان حاصل از رشد بذرها بعد از حذف برگ‌ها به‌صورت تک گره برش داده شده و در محیط تیمار اصلی کشت شدند. پس از ۶۰ روز، گیاهان از نظر شاخص های متعددی مورد بررسی قرار گرفتند.

پس از خارج کردن گیاهچه‌ها از محیط کشت، ابتدا محیط کشت اطراف آن‌ها به‌صورت کامل تمیز شده و سپس با استفاده از ترازو، وزن‌تر اندازه‌گیری شد. تعداد سرشاخه و برگ و ریشه شمارش گردید. اندازه گیری سطح برگ با استفاده از دستگاه سطح برگ سنج (مدل دلتا تی انگلستان) اندازه‌گیری شد. طول ریشه و ارتفاع گیاهچه نیز با استفاده از خط‌کش اندازه‌گیری گردید. درصد زنده‌مانی و جوانه‌زنی گیاهچه‌ها پس از خروج از محیط کشت محاسبه شد.

1- Disperse



شکل ۱- بذر گیاه مریم گلی گونه *Salvia nemorosa*

Figure 1- The seeds of *Salvia nemorosa* species

به‌منظور اندازه‌گیری کلروفیل a، b و کارتنوئید از روش لیختن تالر (Lichtenthaler, 1987) استفاده شد. عصاره به‌دست آمده در دستگاه اسپکتوفتومتر در طول موجهای ۶۴۵، ۶۶۳ و ۴۷۰ نانومتر قرائت شد. غلظت نهایی کلروفیل a و b و کارتنوئید با استفاده از معادله‌های زیر محاسبه شد:

Chlorophyll a = (19.3 * A663 - 0.86 * A645) V/100W
Chlorophyll b = (19.3 * A645 - 3.6 * A663) V/100W
Carotenoides = 1000(A470) - 3.27(mg chl. a) - 104(mg chl. b)/2

میزان ترکیبات فنلی موجود در عصاره گیاه براساس روش اسلینکارد و سینگلتون (Slinkard & Singleton, 1977)، با کمی تغییر و با استفاده از معرف فولین سیوکالتیو اندازه‌گیری شد، سپس میزان جذب رنگ در طول موج ۷۶۵ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر قرائت شد.

اندازه‌گیری فلاونوئید به‌روش رنگ‌سنجی آلومینیوم کلرید و با روش کومار و شرما (Kumar & Sharma, 2015)، انجام شد. جذب مخلوط در طول موج ۴۱۵ نانومتر خوانده شد.

در مطالعه حاضر پنج تکرار و در هر واحد آزمایشی چهار گیاهچه در نظر گرفته شد. داده‌های بدست آمده مربوط به آزمایش با نرم‌افزار SAS مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت و مقایسه میانگین‌ها نیز با آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال پنج درصد انجام گرفت. نمودارها با استفاده از نرم‌افزار Excel رسم گردید.

نتایج و بحث

تعداد شاخه پرآوری شده

تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که اثر متقابل نانو لوله‌های کربن و کینتین بر تعداد شاخه پرآوری شده معنی‌دار نبود. بااین‌حال، غلظت های مختلف نانو لوله‌های کربن و کینتین به‌تنهایی بر تعداد شاخه پرآوری شده مریم گلی در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود (جدول ۲). مقایسه میانگین داده‌ها نیز نشان داد که بیشترین تعداد شاخه پرآوری شده (چهار عدد) مربوط به غلظت ۸۰ میلی‌گرم بر لیتر نانو لوله‌های کربن بود که با شاهد اختلاف معنی‌دار داشت (شکل ۲-الف). از طرف دیگر، مقایسه میانگین داده‌ها نیز نشان داد که بیشترین تعداد شاخه پرآوری شده (سه عدد) مربوط به غلظت چهار میلی‌گرم بر لیتر کینتین و کمترین آن (دو عدد) مربوط شاهد بوده است (شکل ۲-ب). در پژوهشی دیگر، تأثیر نانو لوله‌های کربن چند جداره بر باززایی درون شیشه‌ای گیاه سیب زمینی مورد مطالعه قرار گرفت. در این پژوهش، در غلظت ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر نانو لوله کربنی افزایش شاخه‌زایی و باززایی مشاهده شد. در پژوهشی دیگر، استفاده از غلظت ۲۰۰ میلی‌گرم بر لیتر نانو لوله کربنی به همراه دو میلی‌گرم بر لیتر بنزیل آدنین منجر به بیشترین شاخه‌زایی و باززایی در پسته گردید (Aghasi *et al*., 2018).

تعداد برگ و سطح برگ

نتایج حاصل از تجزیه واریانس نشان داد که اثر متقابل دو فاکتور بر شاخص تعداد برگ و سطح برگ معنی‌دار نبود. بااین‌حال، غلظت‌های مختلف نانو لوله‌های کربن به‌طور معنی‌داری (در سطح احتمال یک درصد) این شاخص‌ها را تحت تأثیر قرار دادند (جدول ۲). مقایسه میانگین تأثیر این ماده بر شاخص تعداد برگ نشان داد که با افزایش غلظت نانو لوله کربن تعداد برگ تولید شده نیز افزایش یافت، به‌طوری که غلظت ۸۰ میلی‌گرم بر لیتر بیشترین تعداد برگ (۱۷ عدد) را تولید کرد. کمترین برگ نیز (هشت عدد) از شاهد به‌دست آمد (شکل ۳-الف). همچنین مقایسه میانگین تأثیر نانو لوله‌های کربن بر شاخص سطح برگ نشان داد که بیشترین سطح برگ (شش سانتی‌متر مربع) مربوط به تیمار ۸۰ میلی‌گرم بر لیتر نانو لوله کربن و کمترین (۱/۴ سانتی‌متر مربع) در شاهد به‌دست آمد که اختلاف معنی‌داری داشتند (شکل ۳- ب). در پژوهشی تأثیر غلظت‌های مختلف نانو لوله‌های کربنی در گوجه‌فرنگی مورد بررسی قرار گرفت که در آن بیشترین سطح برگ و تعداد برگ (۴۲ عدد) در غلظت ۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر گزارش شد (Khodakovskaya, 2013). در پژوهش دیگری که روی گیاه نخود صورت گرفت، استفاده از نانو لوله‌های کربنی تک جداره با غلظت ۶۰ میلی‌گرم بر لیتر منجر به افزایش تعداد شاخه، برگ و همچنین سطح برگ گردید. در واقع، نانو لوله‌های کربنی تک جداره منجر به جذب بهتر آب می‌شوند و در نتیجه رشد قسمت‌های مختلف گیاه افزایش می‌یابد (Tripathi *et al*., 2011).

جدول ۲- تجزیه واریانس (میانگین مربعات) تأثیر نانو لوله‌های کربن و سایتوکنین بر برخی صفات گیاه مریم گلی

Table 2- ANOVA (mean squares) for the effect of carbon nanotubes and cytokine on the some traits of *Salvia nemorosa*

منابع تغییرات S.O.V	درجه آزادی df	وزن تر Fresh weight	تعداد شاخه پرآوری شده Number of branch	تعداد برگ Number of leaves	تعداد ریشه Number of roots	سطح برگ leaf area	طول ریشه Root length	ارتفاع گیاهچه Seedling height	درصد زنده مانی Survival percentage	درصد جوانه‌زنی Germination percentage
نانو لوله‌های کربن Carbon nanotubes	4	0.0280 ns	08239**	3.5114**	2.6798**	3.3563**	6.3546*	19718**	1.3830ns	0.9945ns
سایتوکنین Cytokine	2	0.0043 ns	08532**	09024ns	0.6103ns	0.4837ns	4.0080ns	0.3753ns	0.4602ns	0.2935ns
نانو لوله × سایتوکنین Carbon nanotube × cytokine	8	0.0158 ns	0.1992ns	0.8741ns	0.7082ns	0.1183ns	2.2804ns	0.0815ns	4.8010ns	4.1790ns
خطا Error	60	0.012	0.164	0.83	0.658	0.232	2.28	0.126	7.08	6.52
ضریب تغییرات CV		11.57	22.14	26.48	43.74	24.24	50.82	21.92	32.79	31.02

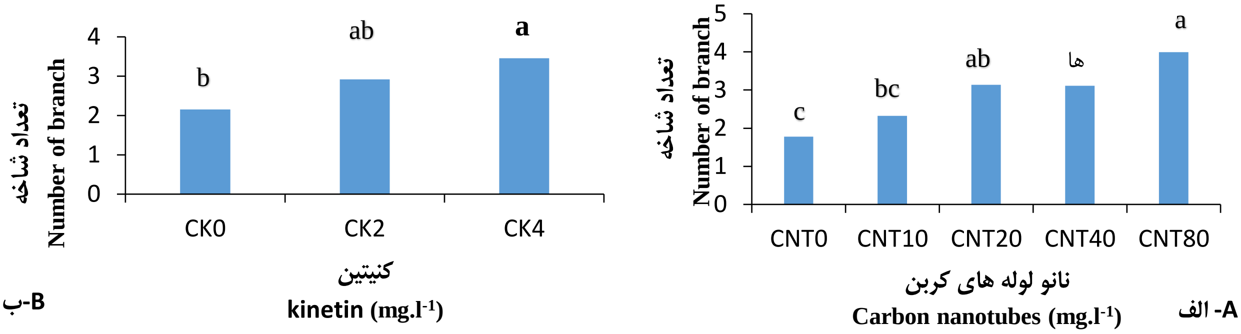
ادامه جدول ۲- تجزیه واریانس (میانگین مربعات) تأثیر نانو لوله‌های کربن و سایتوکنین بر برخی صفات گیاه مریم گلی

Table 2 Continued- ANOVA (mean squares) for the effect of carbon nanotubes and cytokine on the some traits of *Salvia nemorosa*

منابع تغییرات S.O.V	درجه آزادی df	کلروفیل a Chlorophyll a	کلروفیل b Chlorophyll b	کارتنوئیدها Carotenoids	فلاونوئید کل Total flavonoid	فنل کل Total phenol
نانو لوله‌های کربن Carbon nanotubes	4	0.096**	0.103**	0.29**	0.238**	6.484**
سایتوکنین Cytokine	2	0.013*	0.014*	0.013ns	3.548**	103.59**
نانو لوله × سایتوکنین Carbon nanotube × cytokine	8	0.003ns	0.0043ns	0.008ns	0.018*	0.236**
خطا Error	60	0.004	0.0043	0.008	0.104	0.0034
ضریب تغییرات CV		34.69	34.00	34.12	4.80	5.44

ns، ** و * به‌ترتیب عدم معنی‌داری و معنی‌داری در سطح احتمال ۱ و ۵ درصد.

ns, * and **: Non-significant, and significant at 5% and 1% of probability levels, respectively.

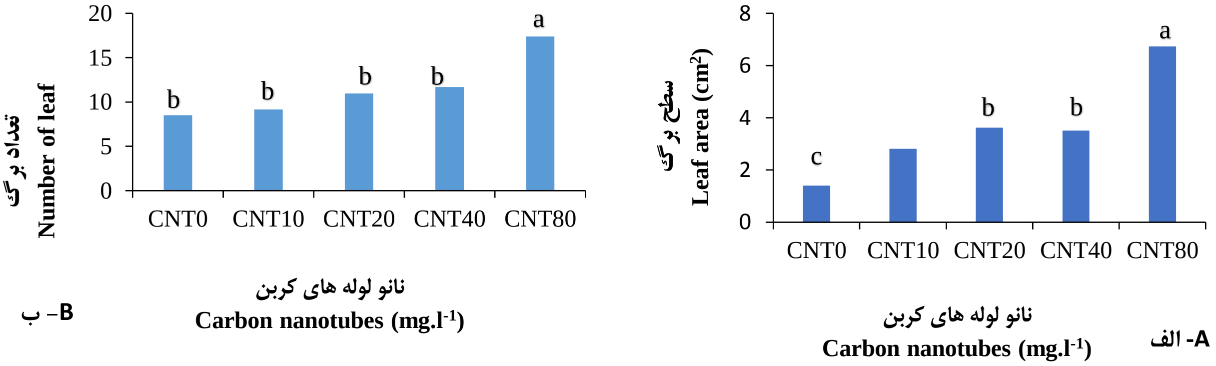


شکل ۲- تأثیر نانو لوله‌های کربن (الف) و کینتین (ب) بر تعداد شاخه پرآوری شده مریم گلی

Figure 2- The effect of carbon nanotubes (A) and kinetin (B) on the number of branches in *Salvia nemorosa*

CNT0: شاهد، CNT10: ۱۰ میلی‌گرم بر لیتر نانو لوله‌های کربنی، CNT20: ۲۰ میلی‌گرم بر لیتر نانو لوله‌های کربنی، CNT40: ۴۰ میلی‌گرم بر لیتر نانو لوله‌های کربنی، CNT80: ۸۰ میلی‌گرم بر لیتر نانو لوله‌های کربنی، CK0: شاهد، CK2: دو میلی‌گرم بر لیتر کینتین، CK4: چهار میلی‌گرم بر لیتر کینتین

CNT0: control, CNT10: 10 $mg.l^{-1}$ of carbon nanotubes, CNT20: 20 $mg.l^{-1}$ of carbon nanotubes, CNT40: 40 $mg.l^{-1}$ of carbon nanotubes, CNT80: 80 $mg.l^{-1}$ of carbon nanotubes, CK0: control, CK2: 2 $mg.l^{-1}$ kinetin, CK4: 4 $mg.l^{-1}$ of kinetin (DMRT, $p\leq 0.05$).



شکل ۳- تأثیر نانو لوله‌های کربن بر تعداد برگ (الف) و سطح برگ (ب) گیاه مریم گلی

Figure 3- The effect of carbon nanotubes on the number of leaves (A) and leaf area (B) in *Salvia nemorosa*

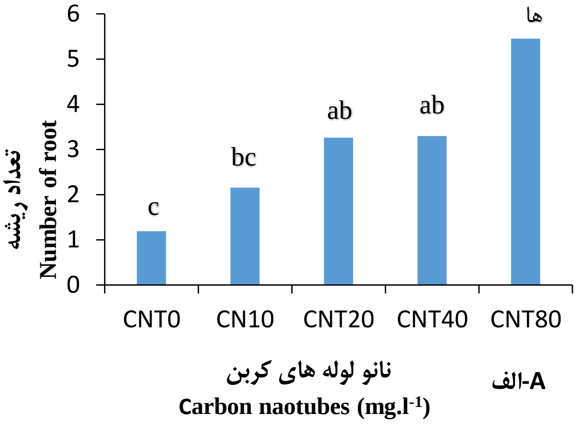
CNT0: شاهد، CNT10: ۱۰ میلی‌گرم بر لیتر نانو لوله‌های کربنی، CNT20: ۲۰ میلی‌گرم بر لیتر نانو لوله‌های کربنی، CNT40: ۴۰ میلی‌گرم بر لیتر نانو لوله‌های کربنی، CNT80: ۸۰ میلی‌گرم بر لیتر نانو لوله‌های کربنی

CNT0: control, CNT10: 10 $mg.l^{-1}$ of carbon nanotubes, CNT20: 20 $mg.l^{-1}$ of carbon nanotubes, CNT40: 40 $mg.l^{-1}$ of carbon nanotubes, CNT80: 80 $mg.l^{-1}$ of carbon nanotubes (DMRT, $p\leq 0.05$).

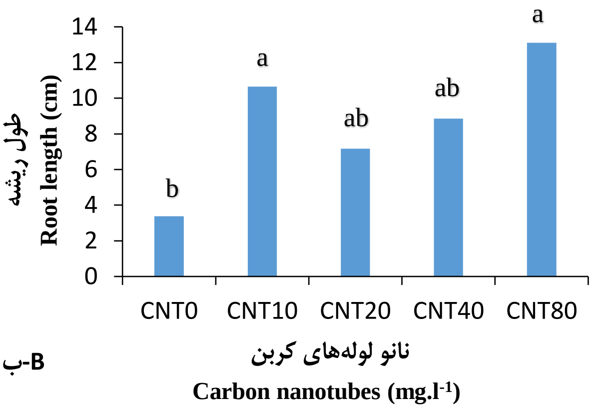
تعداد ریشه و طول ریشه

شاخص تعداد ریشه و طول ریشه به‌طور معنی‌داری تحت تأثیر اثر متقابل دو تیمار قرار نگرفت. بااین‌حال، بررسی تجزیه واریانس داده‌های مربوط به شاخص‌های تعداد ریشه و طول ریشه مشخص گردید که تأثیر نانو لوله‌های کربن بر این شاخص‌ها به‌ترتیب در سطح احتمال یک درصد و پنج درصد معنی‌دار است (جدول ۲). همچنین مقایسه میانگین تأثیر این ماده بر شاخص تعداد ریشه نیز نشان داد که با افزایش غلظت نانو لوله کربن تعداد ریشه تولید شده افزایش یافته، به‌طوری‌که کمترین ریشه تولید شده در شاهد (یک عدد) و بیش‌ترین در غلظت ۸۰ میلی‌گرم بر لیتر نانو لوله کربنی (پنج عدد) به‌دست آمد (شکل ۴- الف). همچنین مقایسه میانگین تأثیر نانو لوله‌های کربن بر طول ریشه نشان داد که بلندترین طول ریشه (۱۳ سانتی‌متر) مربوط به غلظت ۸۰ میلی‌گرم بر لیتر نانو لوله کربن و کوتاه‌ترین (سه سانتی‌متر) مربوط به شاهد بوده است (شکل ۴- ب). نانو لوله‌های کربنی با توجه به تنش محیطی که ایجاد می‌کنند، گیاهان تحت تیمار را وادار به گسترش اندام‌های زیر زمینی خود می‌کنند و بدین ترتیب، گیاه شرایط تنش را

تحمل می‌کند (Falahi *et al.*, 2009). عبادی و همکاران (Ebadi *et al.*, 2012)گزارش کردند که در گیاه مریم گلی سهندی تحت تأثیر تیمار نانو لوله‌های کربن (۲۰۰ میلی‌گرم بر لیتر)، طول ریشه‌چه افزایش یافته است.



A-الف



B-ب

شکل ٤- تأثیر نانو لوله‌های کربن بر تعداد ریشه (الف) و طول ریشه (ب) گیاه مریم گلی

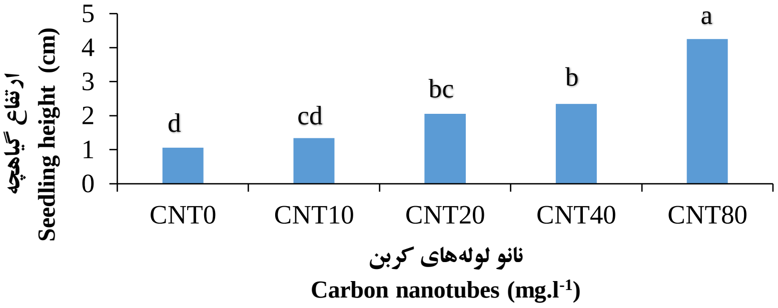
Figure 4- The effect of carbon nanotubes on the number of roots (A) and root length (B) in *Salvia nemorosa*

CNT0: شاهد، CNT10: ۱۰ میلی‌گرم بر لیتر نانو لوله‌های کربنی، CNT20: ۲۰ میلی‌گرم بر لیتر نانو لوله‌های کربنی، CNT40: ۴۰ میلی‌گرم بر لیتر نانو لوله‌های کربنی، CNT80: ۸۰ میلی‌گرم بر لیتر نانو لوله‌های کربنی

CNT0: control, CNT10: 10 mg.l^{-1} of carbon nanotubes, CNT20: 20 mg.l^{-1} of carbon nanotubes, CNT40: 40 mg.l^{-1} of carbon nanotubes, CNT80: 80 mg.l^{-1} of carbon nanotubes (DMRT, $p \leq 0.05$).

ارتفاع گیاهچه

در رابطه با شاخص ارتفاع گیاهچه مشاهده شد که غلظت‌های مختلف نانو لوله‌های کربن به‌طور معنی‌داری (سطح احتمال یک درصد) طول گیاهچه را تحت تأثیر قرار داده‌اند، ولی اثر متقابل نانو لوله‌های کربن و کینتین معنی‌دار نشد (جدول ۲). بلندترین طول گیاهچه (چهار سانتی‌متر) مربوط به تیمار ۸۰ میلی‌گرم بر لیتر نانو لوله کربن و کوتاه‌ترین آن (یک سانتی‌متر) مربوط به شاهد اندازه‌گیری شده است که اختلاف معنی‌داری را با هم نشان دادند (شکل ۵). کاربرد ریز لوله‌های کربنی چند جداره کربوکسیله سبب افزایش درصد و سرعت جوانه‌زنی بذر و همچنین وزن تر و خشک ریشه و ساقه، تعداد و اندازه برگ، طول ریشه و ساقه در سه گیاه سویا، جو و ذرت شده است (Lahiani *et al.*, 2013).



شکل ٥- تأثیر نانو لوله‌های کربن بر ارتفاع گیاهچه مریم گلی

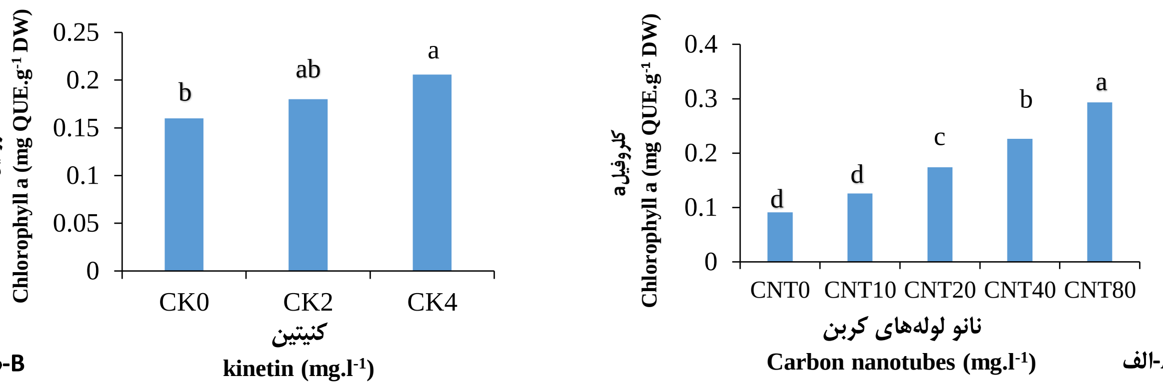
Figure 5- The effect of carbon nanotubes on the seedling height in *Salvia nemorosa*

CNT0: شاهد، CNT10: ۱۰ میلی‌گرم بر لیتر نانو لوله‌های کربنی، CNT20: ۲۰ میلی‌گرم بر لیتر نانو لوله‌های کربنی، CNT40: ۴۰ میلی‌گرم بر لیتر نانو لوله‌های کربنی، CNT80: ۸۰ میلی‌گرم بر لیتر نانو لوله‌های کربنی

CNT0: control, CNT10: 10 mg.l^{-1} of carbon nanotubes, CNT20: 20 mg.l^{-1} of carbon nanotubes, CNT40: 40 mg.l^{-1} of carbon nanotubes, CNT80: 80 mg.l^{-1} of carbon nanotubes.

کلروفیل a

با استفاده از تجزیه واریانس داده‌ها مشاهده گردید که تأثیر نانو لوله‌های کربن بر میزان کلروفیل a در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بوده است. درصورتی‌که، اثر متقابل دو فاکتور مورد آزمایش بر شاخص کلروفیل a معنی‌دار نبود (جدول ۲). به عبارت دیگر، میزان کلروفیل a به‌موازات افزایش نانو لوله‌های کربن، افزایش یافته است. بیش‌ترین میزان کلروفیل a (۰/۲۹۳ میلی‌گرم) مربوط به تیمار ۸۰ میلی‌گرم بر لیتر نانو لوله کربن و کمترین آن (۰/۰۹۱ میلی‌گرم) در شاهد مشاهده گردید که با سایر تیمارها اختلاف معنی‌داری داشتند (شکل ۶- الف). همچنین تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که غلظت‌های مختلف کینتین به‌طور معنی‌داری (سطح احتمال پنج درصد) میزان کلروفیل a را افزایش داده است (جدول ۲). بعد از مقایسه میانگین داده‌ها مشخص شد که همزمان با افزایش غلظت کینتین، میزان کلروفیل a نیز افزایش یافته است. بیش‌ترین میزان کلروفیل a (۰/۲۰۶ میلی‌گرم) مربوط به تیمار چهار میلی‌گرم بر لیتر کینتین و کمترین میزان کلروفیل a (۰/۱۶ میلی‌گرم) در شاهد مشاهده شد (شکل ۶- ب).



ب-B الف-A

شکل ٦- تأثیر نانو لوله‌های کربن (الف) و کینتین (ب) بر میزان کلروفیل a در گیاه مریم گلی

Figure 6- Effect of carbon nanotubes (A) and kinetin (B) on chlorophyll a content in *Salvia nemorosa*

CNT0: شاهد، CNT10: ۱۰ میلی‌گرم بر لیتر نانو لوله‌های کربنی، CNT20: ۲۰ میلی‌گرم بر لیتر نانو لوله‌های کربنی، CNT40: ۴۰ میلی‌گرم بر لیتر نانو لوله‌های کربنی، CNT80: ۸۰ میلی‌گرم بر لیتر نانو لوله‌های کربنی، CK0: شاهد، CK2: دو میلی‌گرم بر لیتر کینتین، CK4: چهار میلی‌گرم بر لیتر کینتین

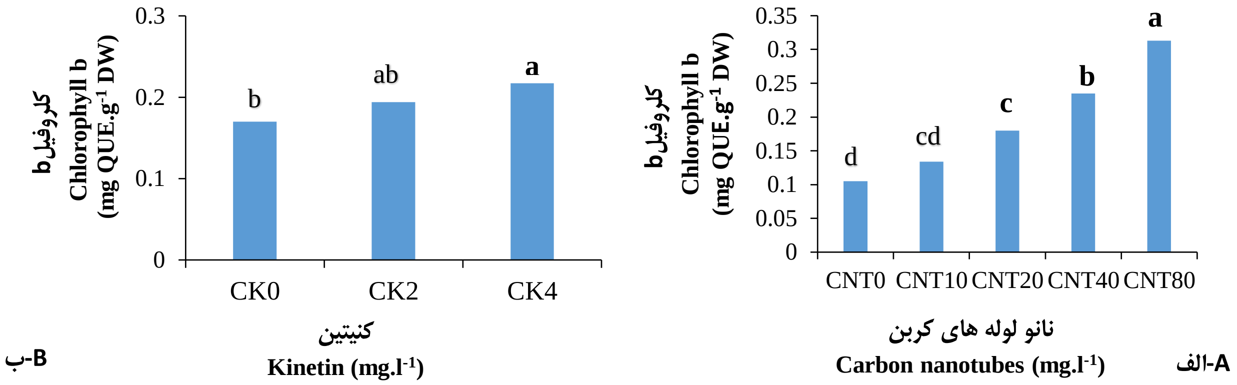
CNT0: control, CNT10: 10 $mg.l^{-1}$ of carbon nanotubes, CNT20: 20 $mg.l^{-1}$ of carbon nanotubes, CNT40: 40 $mg.l^{-1}$ of carbon nanotubes, CNT80: 80 $mg.l^{-1}$ of carbon nanotubes, CK0: control, CK2: 2 $mg.l^{-1}$kinetin, CK4: 4 $mg.l^{-1}$ of kinetin (DMRT, $p \leq 0.05$).

کلروفیل b

در رابطه با کلروفیل b، ترکیب تیماری نانو لوله‌های کربن و کینتین تأثیر معنی‌داری را نشان ندادند. در مقابل، غلظت‌های مختلف نانو لوله های کربن به‌طور معنی‌داری (سطح احتمال یک درصد) محتوای کلروفیل b را تحت تأثیر قرار داده است (جدول ۲). طوری‌که به‌موازات افزایش غلظت نانو لوله‌های کربن میزان کلروفیل b نیز افزایش یافته است. بیش‌ترین میزان کلروفیل b (۰/۳۱۳ میلی‌گرم) مربوط به تیمار ۸۰ میلی‌گرم بر لیتر نانو لوله کربن بوده و کمترین میزان (۰/۱۰۵ میلی‌گرم) در شاهد ثبت گردید. (شکل ۷- الف). با توجه به نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده‌ها، تأثیر غلظت‌های مختلف کینتین بر میزان کلروفیل b در سطح احتمال پنج درصد معنی‌دار بود (جدول ۲). در واقع، همزمان با افزایش غلظت کینتین، میزان کلروفیل b نیز افزایش یافته است. بیش‌ترین میزان کلروفیل b (۰/۲۱۷ میلی‌گرم) مربوط به تیمار چهار میلی‌گرم بر لیتر کینتین و کمترین میزان کلروفیل b (۰/۱۷ میلی‌گرم) در شاهد مشاهده شد که با هم اختلاف معنی‌داری داشتند (شکل ۷- ب).

کارتنوئید

محتوای کارتنوئید به‌طور معنی‌داری تحت تأثیر اثر متقابل دو تیمار مورد آزمایش قرار نگرفت. از سوی دیگر، تأثیر نانو لوله‌های کربن بر محتوای کارتنوئید در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود (جدول ۲). همچنین مقایسه میانگین تأثیر نانو لوله‌های کربن بر شاخص کارتنوئید نیز بیانگر این مطلب است که همزمان با افزایش غلظت نانو لوله‌های کربن میزان کارتنوئید نیز افزایش یافته است. بیش‌ترین میزان کارتنوئید (۰/۴۸۸ میلی‌گرم) مربوط به غلظت ۸۰ میلی‌گرم بر لیتر و کمترین میزان آن (۰/۱۳۳ میلی‌گرم) مربوط به شاهد بوده است (شکل ۸).

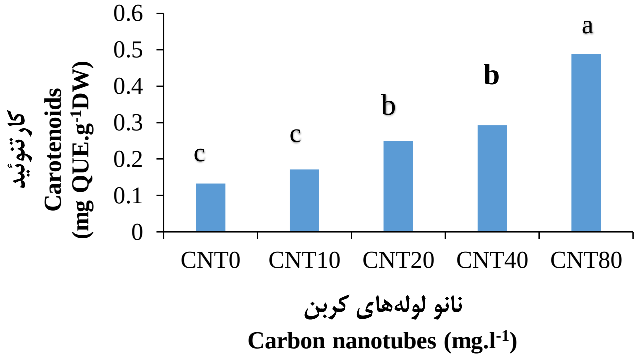


شکل ۷- تأثیر نانو لوله‌های کربن (الف) و کینتین (ب) بر میزان کلروفیل b در گیاه مریم گلی

Figure 7- The effect of carbon nanotubes (A) and kinetin (B) on chlorophyll b content in *Salvia nemorosa*

CNT0: شاهد، CNT10: ۱۰ میلی‌گرم بر لیتر نانو لوله‌های کربنی، CNT20: ۲۰ میلی‌گرم بر لیتر نانو لوله‌های کربنی، **CNT40**: ۴۰ میلی‌گرم بر لیتر نانو لوله‌های کربنی، CNT80: ۸۰ میلی‌گرم بر لیتر نانو لوله‌های کربنی، CK0: شاهد، CK2: دو میلی‌گرم بر لیتر کینتین، CK4: چهار میلی‌گرم بر لیتر کینتین

CNT0: control, CNT10: 10 $mg.l^{-1}$ of carbon nanotubes, CNT20: 20 $mg.l^{-1}$ of carbon nanotubes, CNT40: 40 $mg.l^{-1}$ of carbon nanotubes, CNT80: 80 $mg.l^{-1}$ of carbon nanotubes, CK0: control, CK2: 2 $mg.l^{-1}$ kinetin, CK4: 4 $mg.l^{-1}$ of kinetin (DMRT, $p \leq 0.05$).



شکل ۸- تأثیر نانو لوله‌های کربن بر میزان کارتنوئید در گیاه مریم گلی

Figure 8- The effect of carbon nanotubes on the carotenoid content in *Salvia nemorosa*

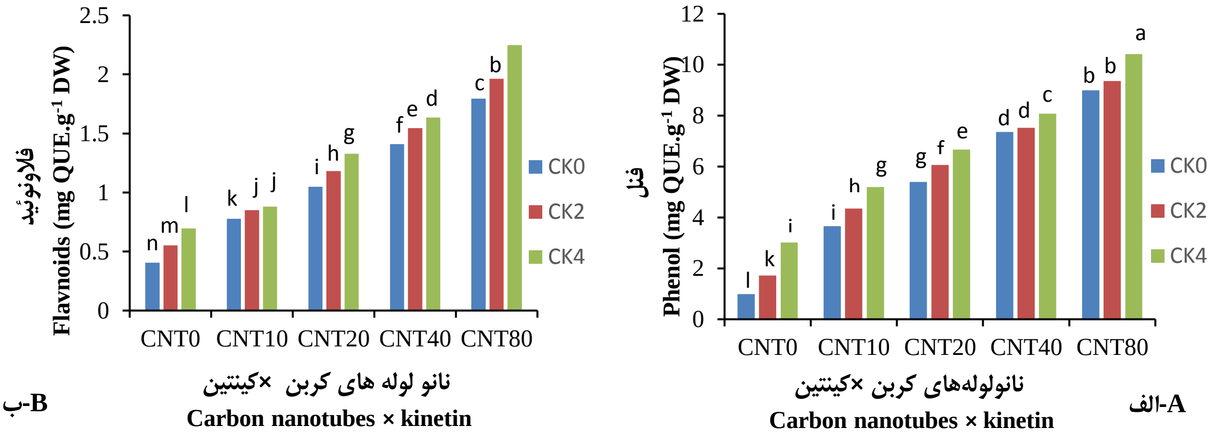
CNT0: شاهد، CNT10: ۱۰ میلی‌گرم بر لیتر نانو لوله‌های کربنی، CNT20: ۲۰ میلی‌گرم بر لیتر نانو لوله‌های کربنی، CNT40: ۴۰ میلی‌گرم بر لیتر نانو لوله‌های کربنی، CNT80: ۸۰ میلی‌گرم بر لیتر نانو لوله‌های کربنی

CNT0: control, CNT10: $mg.l^{-1}$ of carbon nanotubes, CNT20: 20 $mg.l^{-1}$ of carbon nanotubes, CNT40: 40 $mg.l^{-1}$ of carbon nanotubes, CNT80: 80 $mg.l^{-1}$ of carbon nanotubes (DMRT, $p \leq 0.05$).

فنل و فلاونوئید

مطابق با جدول تجزیه واریانس (جدول ۲)، اثر متقابل تیمارهای نانو لوله‌های کربن و کینتین بر محتوای فلاونوئید کل در سطح احتمال پنج درصد معنی‌دار بود. مقایسه میانگین داده‌ها (شکل ۹- الف) نشان داد که با افزایش غلظت‌های نانو لوله‌های کربن و کینتین، محتوای فلاونوئید کل به‌طور مثبتی افزایش یافته است. بر این اساس، بیشترین محتوای فلاونوئید کل تحت تیمارهای ۸۰ میلی‌گرم بر لیتر نانو لوله کربن و چهار میلی‌گرم بر لیتر کینتین به‌دست آمد. همچنین کمترین محتوای فلاونوئید کل در تیمار شاهد ثبت شد.

بررسی محتوای فنل کل تحت ترکیب تیماری نانو لوله‌های کربن و کینتین بیانگر تأثیر معنی‌دار این دو عامل در سطح احتمال یک درصد بود (جدول ۱). مشابه با محتوای فلاونوئید کل، افزایش غلظت‌های نانو لوله‌های کربن به همراه کینتین موجب تولید بیشترین محتوای فنل کل شد. بیشترین محتوای فنل کل در ترکیب تیماری ۸۰ میلی‌گرم بر لیتر نانوله کربن و چهار میلی‌گرم بر لیتر کینتین مشاهده شد. علاوه‌براین ، کمترین محتوای فنل کل در ترکیب تیماری شاهد به‌دست آمد (شکل ۹- ب). کاربرد غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر نانو لوله‌های کربنی چند جداره در کشت کالوس مرزه خوزستانی سبب افزایش بیش از دو برابری در میزان تولید رزمارینیک اسید، سینامیک اسید، فنول کل و فلاونوئید کل و همچنین میزان وزن تر و خشک کالوس شده است (Ghorbanpour, 2015).



شکل ۹- اثر متقابل نانو لوله‌های کربن × کینتین بر شاخص‌های فنل (الف) و فلاونوئید (ب) مریم گلی

Figure 9- The interaction effect of carbon nanotubes ×kinetin on phenol (A) and flavonoid (B) content in *Salvia nemorosa*

CNT0: شاهد، CNT10: ۱۰ میلی‌گرم بر لیتر نانو لوله‌های کربنی، CNT20: ۲۰ میلی‌گرم بر لیتر نانو لوله‌های کربنی، CNT40: ۴۰ میلی‌گرم بر لیتر نانو لوله‌های کربنی، CNT80: ۸۰ میلی‌گرم بر لیتر نانو لوله‌های کربنی، CK0: شاهد، CK2: دو میلی‌گرم بر لیتر کینتین، CK4: چهار میلی‌گرم بر لیتر کینتین

CNT0: control, CNT10: 10 $mg.l^{-1}$ of carbon nanotubes, CNT20: 20 $mg.l^{-1}$ of carbon nanotubes, CNT40: 40 $mg.l^{-1}$ of carbon nanotubes, CNT80: 80 $mg.l^{-1}$ of carbon nanotubes, CK0: control, CK2: 2 $mg.l^{-1}$ kinetin, CK4: 4 $mg.l^{-1}$ of kinetin (DMRT, $p \leq 0.05$).

نتیجه‌گیری

در مطالعه حاضر، اثر متقابل نانو لوله‌های کربن و کینتین بر رشد و باززایی و خواص فیتوشیمیایی مریم گلی مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که برخی خصوصیات رشدی از جمله، وزن تر، تعداد شاخه، تعداد برگ، تعداد ریشه، سطح برگ، طول ریشه، ارتفاع گیاهچه، درصد زنده‌مانی، درصد جوانه‌زنی، محتوای رنگیزه‌های فتوسنتزی تحت تأثیر اثر متقابل دو فاکتور قرار نگرفتند. در مقابل، ویژگی‌های فیتوشیمیایی مریم گلی از جمله محتوای فلاونوئید کل و فنل کل تحت تأثیر اثرات مثبت ترکیب تیماری نانو لوله‌های کربن و کینتین (۸۰ میلی‌گرم بر لیتر نانو لوله کربن و چهار میلی‌گرم بر لیتر کینتین) افزایش یافتند که این غلظت به‌منظور افزایش ترکیبات فنلی قابل توصیه است. همچنین برخی ویژگی‌های رشدی در غلظت ۸۰ میلی‌گرم بر لیتر نانو لوله‌های کربن و چهار میلی‌گرم بر لیتر کینتین بیشترین مقدار را تولید کردند. با وجود نتایج حاصل از این مطالعه، همچنان می‌توان در تحقیقات آینده از غلظت‌های بالاتر نانو لوله‌های کربن به‌منظور افزایش خواص فیتوشیمیایی و بهره‌وری سایر گیاهان دارویی استفاده نمود.

References

1- Aghasi Kermani, S.H., Hokmabadi, H., Ghanbari Jahromi, M., & Nezami, S.R. (2018). *Investigating the effect of nano compounds in the stages of establishment and in vitro processing of pistachio P. integrima x Pistacia atlantica vegetative base*. Iranian Pistachio National Conference, Iran.

2- Alimohammadi, M., Xu, Y., Wang, D., Biris, A.S., & Khodakovskaya, M.V. (2011). Physiological responses induced in tomato plants by a two-componenet nanostructural system composed of carbon nanotubes conjugated with quantum dots and its *in vivo* multimodal detection. *Nanotechnology*, *22*(1), 112-118. https://doi.org/10.1088/0957-4484/22/29/295101

3- Bagheri, A., Moshiri, S., & Khosravinia, S. (2013). Investigating the reaction of explants and growth regulators on callus formation, root formation and *in vitro* regeneration of Iranian black cumin. *Scientific-Research Journal of Crop Plant Biotechnology*, *3*(8), 53-61. (In Persian).

4- Bhat, S., Maheshwari, P., & Kumar, A. (2002). *Mentha* species: *In vitro* regeneration and genetic transformation. *Molecular Biology Today*, *3*, 11-23.

5- Bhojwani, S.S., & Dantu, P.K. (2013). Plant tissue culture: an introductory text. Springer Science & Business Media, New Delhi, 309.

6- Cañas, J.E., Long, M., Nations, S., Vadan, R., Dai, L., Luo, M., Ambikapathi, R., Lee, E.H. & Olszyk, D. (2008). Effects of functionalized and nonfunctionalized single-walled carbon nanotubes on root elongation of select crop species. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*, *27*(9), 1922-1931. https://doi.org/10.1897/08-117.1

7- Dobranszki, J., Jambor-Benczur, E., Magyar-Tabori, K., & Hudak, I. (2005). Model experiments for establishment of in vitro culture by micrografting in apple. *International journal of Horticultural Science*, *11*(1), 47-49. https://doi.org/10.31421/IJHS/11/1/557
8- Ebadi, M., Farzaneh, A., Ebadi, E., & Nemati, S.H. (2012). Evaluation of some germination factors of *Salvia sahendica* Boiss & Buhse in drought and salt stresses conditions. *Iranian Journal of Field Crops Research*, *10*(4), 764-773. (In Persian with English abstract). https://doi.org/10.22067/GSC.V10I4.20387
9- Fallahi, J., Ebadi, M.T., & Ghorbani, R. (2009). The effects of salinity and drought stresses on germination and seedling growth of clary (*Salvia sclarea*). *Environmental Stresses in Crop Sciences*, *1*(1), 57-67. (In Persian with English abstract). https://doi.org/10.22077/escs.2009.7
10- Farshadfar, M., & Bakhshi Khaniki, R. (2014). Basics of biotechnology and plant tissue culture first edition. Payam Noor University Publications, Tehran, p. 249.
11- Ghorbanpour, M. (2015). Major essential oil constituents, total phenolics and flavonoids content and antioxidant activity of Salvia officinalis plant in response to nano-titanium dioxide. *Indian Journal of Plant Physioligy*, *20*(1), 249-256. (In Persian). https://doi.org/10.1007/s40502-015-0170-7
12- Govil, J.N., & Singh, V.K. (2010). Recent progress in medicinal plant. Vol 1. Studium Press, Texas, 485.
13- Jafarnia, S., Khosroshahi, S., Safayi, M., Madah yazdi, V., & Zahmatkeshan, A. (2009). Aromatic and medicinal plants. First Edition. Publications of Iran's Green Agriculture Education Complex, Tehran, p. 168.
14- Ke, P.C., Lin, S., Reppert, J., Rao, A.M., & Lou, H. (2011). Uptake of carbon-based nanoparticles by mammalian cells and plants. In: Sattler KD (ed) Handbook of nanophysics: nanomedicine and nanorobotics. CRC Press, New York, p. 30.
15- Khodakovskaya, M.V., de Silva, K., Biris, A.S., Dervishi, E., & Villagarcia, H. (2012). Carbon nanotubes induce growth enhancement of tobacco cells. *American Chemical Society Nano*, *6*(3), 2128-2135. https://doi.org/10.1021/nn204643g
16- Khodakovskaya, M.V., Kim, B.S., Kim, J.N., Alimohammadi, M., Dervishi, E., Mustafa, T., & Cerniglа, C.E. (2013). Carbon nanotubes as plant growth regulators: Effects on tomato growth, reproductive system and soil microbial community. *Small*, *9*(1), 115-123.
17- Kumar, S., Kanwar J.K., & Sharma, D.R. (2015). *In vitro* propagation of *Lilium*: Review paper. *Advances in Horticultural Science*, *20*, 181-188. https://doi.org/10.1400/53266
18- Lacerda, L., Russier, J., Pastorin, G., Herrero, M.A., Venturelli, E., Dumortier, H., Al-Jamal, K.T., Prato, M., Kostarelos, K., & Bianco, A. (2012). Translocation mechanisms of chemically functionalized carbon nanotubes across plasma membranes. *Biomaterials*, *33*(1), 3334-3343. https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2012.01.024
19- Lahiani, M.H., Dervishi, E., Chen, J., Nima, Z., Gaume, A., Biris, A.S., & Khodakovskaya, M.V. (2013). Impact of carbon nanotubes exposure to seeds of valuable crops. *American Chemical Society Applied Materials and Interfaces*, *5*(2), 7965-7973. https://doi.org/10.1021/am402052x
20- Lichtenthaler, H.K. (1987). Chlorophylls and cartenoides: Pigments of photosynthetic bio-membranes. In: Methods in Enzymol. (Eds. S.P. Colowick, N.O. Kaplan,). Academic press. New York, *48*(1), 350-382.
21- Mostallino, M.C., Mascia, M.P., Pisu, M.G., Busonero, F., Talani, G., & Biggio, G. (2004). Inhibition by miltirone of up-regulation of GABAA receptor α4 subunit mRNA by ethanol withdrawal in hippocampal neurons. *European Journal of Pharmacology*, *494*, 83-90.
22- Omidbeygi, R. (2005). Production and processing of medicinal plants. First Edition. Tehran: Publications of Astan Ghods Razavi, Tehran, p. 348.
23- Rai, M., & Ingle, A. (2012). Role of nanotechnology in agriculture with special reference to management of insect pests. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *94*(2), 287-293. https://doi.org/10.1007/s00253-012-3969-4
24- Salimpour, F., Mazooji, A., Mazhar, F., & Barzin, G. (2014). Comparative study of antibacterial properties of four species of *Salvia* L. as a medicinal plant. *Journal of Research In Medical Sciences*, *37*(4), 205-210. (In Persian with English abstract)
25- Slinkard, K., & Singleton, V.L. (1977). Total phenol analysis: automation and comparison with manual methods. *American Journal of Enology and Viticulture*, *28*(1), 49-55. https://doi.org/10.5344/ajev.1977.28.1.49
26- Smith, R.H. (2000). *Plant Tissue Culture*: Techniques and Expriments. Academic Press, United States, 231.
27- Tripathi, S., Sonkar, S.K., & Sarkar, S. (2011). Growth stimulation og gram (*Cicer arietinum*) plant by water soluble carbon nanotubes. *Nanoscale*, *3*(3), 1176-1181. https://doi.org/10.1039/C0NR00722F

28- Ulubelen, A., Topcu, G., Sönmez, U. & Eris, C. (1994). Terpenoids from Salvia nemorosa. *Phytochemistry*, *35*(4), 1065-1067. https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)90672-1

29- Wang, X., Han, H., Liu, X., Gu, X., Chen, K., & Lu, D. (2012). Multi-walled carbon nanotubes can enhance root elongation of wheat (*Triticum aestivum*) plants. *Journal of Nanoparticle Research*, *14*(6), 1-10. https://doi.org/10.1007/s11051-012-0841-5

Journal of Horticultural Science
https://jhs.um.ac.ir

Research Article
Vol. 38, No. 2, Summer 2024, p. 367-380

Investigating Growth and Biochemical Responses of Marjoram (*Origanum majorana*) to Cadmium and Lead

M.B. Razavinia[1], N. Pourghasemiani[2*], F. Najafi[3]

1 and 3- Master Graduate and Assistant Professor, Department of Agriculture, Medicinal Plants and Drugs Research Institute, Shahid Beheshti, Tehran, Iran
2- Associate Professor, Department of Plant Productions, Agricultural Faculty of Bardsir, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran
(*- Corresponding Author Email: n.pourghasemian@uk.ac.ir)

Received:	18-10-2023	**How to cite this article:**
Revised:	24-01-2024	Razavinia, M.B., Pourghasemiani, N., & Najafi, F. (2024). Investigating growth and biochemical responses of marjoram (*Origanum majorana*) to cadmium and lead.
Accepted:	13-02-2024	*Journal of Horticultural Science, 38*(2), 367-380. (In Persian with English abstract).
Available Online:	13-02-2024	https://doi.org/10.22067/jhs.2024.84918.1296

Introduction

Heavy metals, like cadmium, lead, and arsenic, harm air, soil, agriculture, and human health. Plants suffer from reduced growth, chlorophyll production, and enzyme activity due to heavy metal exposure. Reactive oxygen species are produced, damaging biological molecules. However, plants have developed resistance mechanisms, including antioxidant stimulation. Flavonoids, complex compounds in plants, enhance resistance to heavy metals. Medicinal plants, rich in secondary metabolites like flavonoids, phenolic compounds, and alkaloids, show resistance to heavy metals. *Origanum majorana* as a medicinal plant, contains compounds that contribute to its heavy metal resistance. Based on limited studies, medicinal plants, particularly marjoram, have shown greater resistance to environmental stresses due to their secondary metabolites and the ability to produce uncontaminated essential oils in response to heavy metals like cadmium and lead. This study aimed to investigate the biochemical responses and growth of marjoram plants when exposed simultaneously to cadmium and lead, as well as the mutual effects of these two elements on marjoram behavior.

Materials and Methods

A factorial randomized complete block design experiment with four replications was used to study the effect of Cd in four concentrations (0, 6, 12 and 24 $mg.kg^{-1}$ soil) as well as Pb in four concentrations (0, 150 300 and 450 mg. Kg^{-1} soil). The concentrations were determined based on previous reports and a preliminary experiment. Soil was prepared with appropriate amounts of cadmium chloride and lead chloride were added according to the desired concentrations. The contaminated soil was then incubated at field capacity moisture for two months. Seeds have been sown in germination trays. Seedlings at the three to four leaf stage were transferred to pots containing the contaminated soil. Plant harvest took place 42 to 52 days after the transfer to pots, specifically when the plants had just entered the flowering stage. The aboveground parts of the plants were harvested separately, and the roots were carefully removed from the soil. Half of the plants were dried at 105 °C for 24 h to determine the dry weight, Pb and Cd concentrations. The other half of the plants were used to measure biochemical traits including flavonoids, anthocyanins, malondialdehyde, protein, proline and some enzymatic antioxidants. The data was analyzed using a two-way analysis of variance (ANOVA), and the means were compared using the LSD test. A significance level of 95% was applied using SAS 9.2.

Results and Discussion

In this study, various parameters were measured including the dry weight of aerial parts and roots,

©2024 The author(s). This is an open access article distributed under Creative Commons Attribution 4.0 International License (CC BY 4.0).

https://doi.org/10.22067/jhs.2024.84918.1296

concentrations of lead and cadmium in the aerial parts and roots, lipid peroxidation (MDA), flavonoids, anthocyanins, total phenols, proline, protein, and antioxidant enzymes including guaiacol peroxidase (GPX), ascorbate peroxidase (APX), and catalase (CAT). The results of the analysis of variance showed that all the mentioned traits were influenced by the individual effects of lead and cadmium. However, there was no significant interaction between cadmium and lead on proline, protein, GPX, polyphenols, flavonoids, and anthocyanins. The dry weight of aerial parts and roots decreased in the presence of cadmium and lead, while the concentrations of lead and cadmium increased. However, this damage was more pronounced in the presence of cadmium compared to lead. The presence of cadmium in a lead-containing environment had an inhibitory effect on lead uptake by the plant, and vice versa. The highest level of MDA was reported in the combination of lead and cadmium concentrations of 450 and 24 mg/kg, respectively. The analysis of enzyme activity showed that the maximum catalase activity was observed in the combination of 6 and 450 mg/kg of cadmium and lead, respectively, while the minimum activity was found in the control group. Similarly, the highest APX activity was reported in the combination of 24 mg/kg of cadmium and zero lead, while the lowest activity was observed in the control group. The use of cadmium and lead at the highest consumption level compared to the control group resulted in a 204% and 40% increase in GPX activity, respectively. In the analysis of total phenols, flavonoids, anthocyanins, and protein, an increase in cadmium concentration from zero to 24 mg/kg led to a decrease of 52%, 42%, 208%, and 81%, respectively, while protein decreased by 39%. These traits showed an increase of 14%, 14%, 58%, and 40%, respectively, with an increase in lead concentration from zero to 450 mg/kg, while protein decreased by 24%. Based on the results, it appears that the increase in secondary metabolites with the increase in heavy metals has accompanied the plant's response to the prevailing conditions.

Conclusion

The study found that both cadmium and lead negatively affect the dry weight of plants, with cadmium having a greater impact. This reduction is particularly noticeable in photosynthesis, pigments, electron transport chain, and energy production. The highest concentrations of lead and cadmium (24-450 mg/kg) show the maximum decrease. As the concentrations of these elements increase in the growth medium, their concentration in the plants also increases. Lead has lower mobility and tends to accumulate in the roots compared to cadmium. Interestingly, the presence of cadmium inhibits the uptake of lead by the plant, and vice versa. This leads to an average inhibition of 39% for lead uptake by cadmium and 35% for cadmium uptake by lead in the aerial parts. The study also observed an increase in secondary metabolites, which act as antioxidants and help the plant cope with the stresses caused by cadmium and lead. These metabolites may also contribute to osmotic regulation along with the increase in proline. Based on these findings, it seems that these plants can be used in green spaces contaminated with moderate to low levels of cadmium and lead, particularly in mining areas.

Keywords: Antioxidant, Antocyanin, Flavonoid, Phenol, Proline

نشریه علوم باغبانی
https://jhs.um.ac.ir

مقاله پژوهشی

جلد ۳۸، شماره ۲، تابستان ۱۴۰۳، ص. ۳۸۰-۳۶۷

بررسی واکنش‌های رشدی و بیوشیمیایی گیاه دارویی مرزنجوش (*Origanum majorana*) به فلزات سنگین کادمیم و سرب

محمد باقر رضوی نیا[1]- نسیبه پورقاسمیان[2]*- فرزاد نجفی[3]

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۷/۲۶
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۱۱/۲۴

چکیده

آلودگی به فلزات سنگین یکی از معضلات اصلی زیست‌محیطی و کشاورزی در دهه‌های اخیر است. مطالعه حاضر به بررسی پاسخ‌های رشدی و بیوشیمیایی گیاه دارویی مرزنجوش بستانی (*Origanom marjoram*) در برابر تنش عناصر سنگین کادمیوم و سرب پرداخته است. این مطالعه در طرح فاکتوریل و در قالب بلوک کامل تصادفی با چهار تکرار در گلخانه دانشگاه شهید باهنر مرکز آموزش عالی کشاورزی بردسیر در سال ۱۴۰۰ انجام شد. فاکتور اول شامل کادمیوم در چهار سطح (صفر، ۶، ۱۲ و ۲۴ میلی‌گرم در کیلوگرم خاک) و فاکتور دوم شامل سرب در چهار سطح (صفر، ۱۵۰، ۳۰۰ و ۴۵۰ میلی‌گرم در کیلوگرم خاک) در نظر گرفته شد. وزن خشک اندام هوایی و ریشه، غلظت سرب و کادمیوم در اندام هوایی و ریشه، پراکسیداسیون لیپیدها (MDA)، فلاونوئید، آنتوسیانین، فنول کل، پرولین، پروتئین، آنتی‌اکسیدانت‌های آنزیمی شامل، گایاکول پراکسیداز (GPX)، آسکوربات پراکسیداز (APX) و کاتالاز (CAT) اندازه‌گیری شدند. نتایج تجزیه واریانس نشان داد که کلیه صفات مذکور تحت تأثیر اثرات ساده سرب و کادمیوم قرار گرفتند. اثر متقابل کادمیوم × سرب روی پرولین، پروتئین، GPX، پلی فنل، فلاونوئید و آنتوسیانین معنی‌دار نبود. وزن خشک اندام هوایی و ریشه در حضور کادمیوم و سرب کاهش و غلظت عناصر سرب و کادمیوم، افزایش پیدا کرده است، بااین‌حال، این آسیب در حضور کادمیوم بیشتر از سرب بود. حضور کادمیوم در محیط حاوی سرب اثر بازدارندگی در جذب سرب توسط گیاه داشت و بالعکس. بیشترین میزان MDA در ترکیب غلظت سرب ۴۵۰ و کادمیوم ۲۴ میلی‌گرم بر کیلوگرم گزارش شد. بررسی فعالیت سه آنزیم نشان داد که حداکثر فعالیت آنزیم کاتالاز در ترکیب کادمیوم ۶ و سرب ۴۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم به‌میزان ۰/۰۶۶ و کمترین آن در شاهد ۰/۲۷ واحد جذب بر گرم وزن تر بود. همچنین، بیشترین فعالیت APX در ترکیب غلظت ۲۴ کادمیوم و صفر سرب ۳/۲۱ و کمترین آن در شاهد ۰/۹۷ واحد جذب بر گرم وزن تر گیاه گزارش شد. استفاده از کادمیوم و سرب در بالاترین سطح مصرفی نسبت به شاهد، به‌ترتیب سبب افزایش فعالیت GPX به‌میزان ۲۰۴ و ۴۰ درصد گردید. در بررسی فنول کل، فلاونوئید و آنتوسیانین و پروتئین، با افزایش غلظت کادمیوم از صفر به ۲۴ میلی‌گرم بر کیلوگرم، به‌ترتیب ۵۲، ۴۲، ۲۰۸ و ۸۱ درصد و برای پروتئین ۳۹ درصد کاهش نشان داد. این صفات با افزایش سرب از صفر به ۴۵۰، به‌ترتیب، ۱۴، ۱۴، ۵۸ و ۴۰ درصد افزایش و برای پروتئین ۲۴ درصد کاهش نشان داد. با توجه به نتایج موجود به نظر می‌رسد که با افزایش عناصر سنگین متابولیت‌های ثانویه افزایش یافته و به دنبال آن مقاومت به فلز سنگین نیز افزایش می‌یابد.

واژه‌های کلیدی: آنتوسیانین، آنتی‌اکسیدان، پرولین، فلاونوئید، فنل

مقدمه

بسیاری از کشورهای جهان به‌دلیل رشد جمعیت و به دنبال آن افزایش رشد صنعت، با مشکلات عدیده آلودگی‌های زیست‌محیطی رو به‌رو هستند. آلودگی‌های شیمیایی از خطرناک‌ترین نوع آلودگی‌هاست، این آلودگی‌ها اثرات بسیار زیادی بر سلامت انسان دارند (Rashid *et al*., 2023).

عناصر سنگین عناصری هستند که وزن اتمی آن‌ها بین ۵۴۶/۶۳ تا ۵۹۰/۲۰۰ دالتون بوده و جرم مخصوص آن‌ها بزرگ‌تر از پنج گرم بر سانتی‌متر مکعب است. در بین فلزات سنگین برخی از آن‌ها جزء فلزات

۱ و ۳- دانش آموخته کارشناسی ارشد و استادیار، گروه گیاهان دارویی، دانشکده گیاهان و مواد اولیه دارویی، دانشگاه شهید بهشتی تهران، تهران، ایران
۲- دانشیار، گروه تولیدات گیاهی، دانشکده کشاورزی بردسیر، دانشگاه شهید باهنر کرمان، کرمان، ایران
(*- نویسندهٔ مسئول: Email: n.pourghasemian@uk.ac.ir)

https://doi.org/10.22067/jhs.2024.84918.1296

ضروری محسوب می‌شوند. فلزاتی مانند مس، روی و کبالت در این گروه قرار دارند، درحالی‌که برخی از آن‌ها یا مضر هستند و یا ضرورتشان به اثبات نرسیده است که کادمیوم و سرب و آرسنیک در این گروه قرار گرفته‌اند (Rashid *et al.*, 2023).

گیاهان در زمان تجربه تنش آلودگی به فلزات سنگین، درجات مختلفی از مسمومیت ظاهری را نشان می‌دهند. مسمومیت حاصله ناشی از تعداد بی‌شماری از فرایندهای بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی در داخل گیاه است. از مجموعه اثراتی که عناصر سنگین سرب و کادمیوم می‌توانند بر گیاه داشته باشند، تغییرات در ساختار مورفولوژی و فیزیولوژی گیاه است که شامل کاهش جوانه‌زنی، کاهش طول ریشه و رشد گیاهچه، کاهش تنفس، تولیدات کلروفیل، محتوی آب و پروتئین می‌باشد (Pourrut *et al.*, 2011). همچنین عناصر فوق سبب کاهش فعالیت برخی آنزیم‌های مهم مانند آنزیم‌های چرخه کالوین می‌شود. با توجه به اینکه بسیاری از کوفکتورهای آنزیمی برای فعالیت نیاز به یک فلز دارند که اگر این فلز با فلز دیگر جابه‌جا شود منتج به کاهش شدید فعالیت آن‌ها شده که این اتفاق را در حضور عناصر سنگین در در گیاه می‌توان مشاهده کرد (Nieboer & Richardson, 1980).

همچنین حضور سرب و کادمیوم به‌دلیل اختلال در همئوستازی سلول منجر به افزایش پراکسید هیدروژن (H_2O_2) در سلول گیاهی می‌شود. دیگر گونه‌های فعال اکسیژن شامل رادیکال سوپراکسید (O_2)، رادیکال هیدروکسیل (OH) و ... که قادرند به مولکول‌های بیولوژیک نظیر DNA، پروتئین‌ها، اسید آمینه‌های آزاد، لیپیدها و کربوهیدرات‌ها آسیب وارد کنند، در هنگام رویارویی با فلزات سنگین از جمله کادمیوم و سرب تولید می‌شوند (Sharma *et al.*, 2012).

مکانیسم‌های متفاوتی برای مقاومت و سمیت‌زدایی فلزات سنگین در گیاهان مشاهده شده است. یکی از ایم مکانیسم‌ها، تحریک فعالیت آنتی‌اکسیدانت‌هاست. آنتی‌اکسیدانت‌ها به دو گروه محلول در آب و چربی تقسیم می‌شوند. آنتی‌اکسیدانت‌های محلول در آب شامل ویتامین C، آنتو سیانین‌ها که در گروه فلاونوئیدهای پلی فنول قرار دارند. آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانتی مانند سوپر اکسید دسموتاز، کاتالاز، گلوتاتیون پراکسیداز و پراکسیداز و ... و محلول در چربی شامل کارتنوئید، ویتامین E، ویتامین A، و برخی فلاونوئیدها و... می‌باشد (Chen *et al.*, 2019).

افزایش فلاونوئید در گیاه آرابیدوپسیس *Arabidopsis thaliana* منجر به افزایش مقاومت نسبت به عناصر سنگین کادمیوم و سرب شد (Keilig *et al.*, 2009). فلاونوئید به‌عنوان یک ترکیب پیچیده در گیاه شناخته می‌شود که این فاکتور در زمان حضور عناصر سنگین منجر به بروز حالت دفاعی در گیاه می‌شود (Chen *et al.*, 2019).

در پژوهش سئونگ و همکاران (Seung *et al.*, 2012) که روی آرابیدوپسیس انجام داده و بررسی میزان رنگیزه‌ها را تحت تیمار سرب در غلظت ۰، ۱۰۰، ۲۰۰، ۳۰۰، ۴۰۰، ۵۰۰، ۶۰۰ و ۷۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم انجام داده، این‌گونه گزارش کرد که حضور عناصر سنگین سرب و کادمیوم در گیاه منجر به افزایش محتوای آنتوسیانین با یک شیب مشخص شده، ولی در غلظت ۵۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم با شیب بیشتری افزایش یافته است.

متأسفانه بسیاری از گیاهان اثرات مضر عناصر سنگین را می‌پذیرند مثلا تجمع بیش از حد عناصر، منجر به رشد کم و در نهایت، منجر به چرخه پالایش با مدت زمان بیشتری می‌شود (Glick *et al.*, 2010). از بین تمامی گونه‌های شناخته شده گیاهان فقط ۰/۲ درصد گیاهان توانایی مقاومت در چنین شرایطی را دارند (Baker *et al.*, 1989). در گیاهان دارویی به‌دلیل سازگاری بیوشیمیایی جهت حفاظت و پیشگیری از بیماری‌ها و مقاومت یا سازگاری به شرایط خاص اکولوژیکی، ادافیکی و یا اقلیمی در نیچ خاصی، میزان زیادی متابولیت ثانویه مانند فلاونوئید، مواد فنلیکی، تانن‌ها، ساپونین‌ها، کارتنوئید، آنتوسیانین و بسیاری دیگر تولید می‌شود که منجر به ایجاد مقاومت در برابر تنش‌های محیطی می‌شود. مثلاً گیاه علف لیمو *Cymbopogon citratus* حاوی فلاونوئید و تانن و آلکالوئیدهای متفاوتی است که اثرگذاری در میزان مقاومت به تنش عناصر سنگین دارد (Ghada, 2017).

مرزنجوش بستانی *Origanum majorana* گیاهی دارویی، یک ساله و در برخی شرایط دو ساله است. مهم‌ترین اجزای اسانس گیاهی آن کارواکرول و یا تیمول است. همچنین ترکیبات شیمیایی دیگر از جمله گاما ترپینن، پاراسیمن، متیل اترهای تیمول و کارواکرول، استات های تیمول و کارواکرول، و نیز ترکیبات دیگری از جمله سزکوئی ترپن-هایی مثل بتاکاریوفیلن، بتابیسابولن، بتابوربونن، ژرماکرن- دی، بی سیکلو ژرماکرن، آلفا هومولن، آلفا مورولن، گاما مورولن، گاما کادینن، آللوآرمادندرون، آلفا کوبن، الفا کوپائن، آلفا کادینول، بتاکاریوفیلن اکساید و ژرماکرن- دی- ۴- اول نیز در اسانس این گیاه وجود دارند (Azizi *et al.*, 2015).

بنابراین، با توجه به اینکه از یک طرف مطالعات در زمینه اثر فلزات سنگین سرب و کادمیوم بر گیاه دارویی مرزنجوش محدود است و از طرف دیگر، بسیاری از گیاهان دارویی به‌واسطه متابولیت‌های ثانویه خود می‌توانند در شرایط آلودگی به فلزات سنگین رشد کنند، مطالعه حاضر با هدف بررسی پاسخ‌های بیوشیمیایی و میزان رشد گیاه مرزنجوش در رویارویی همزمان با دو فلز کادمیوم و سرب و بررسی اثر متقابل دو عنصر فوق در چگونگی واکنش مرزنجوش صورت گرفت.

مواد و روش‌ها

این آزمایش به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی با چهار تکرار به گونه‌ای که عامل بلوک‌بندی شدت نور بوده،

در گلخانه تحقیقاتی مرکز آموزش عالی کشاورزی بردسیر انجام شد. شرایط دما قابل کنترل بود و همه تیمارها از دمای کسانی برخوردار بودند. فاکتورها شامل کادمیم در چهار سطح صفر، ۶، ۱۲ و ۲۴ (میلی گرم بر کیلوگرم خاک) و سرب در چهار سطح صفر، ۱۵۰، ۳۰۰ و ۴۵۰ (میلی‌گرم بر کیلوگرم خاک)، در نظر گرفته شدند. لازم به ذکر است که تعیین غلظت‌ها با توجه به گزارش‌ها و انجام یک پیش آزمایش صورت گرفته است.

ابتدا خاک را با خاک برگ و کود به نسبت ۱/۴ مخلوط کرده و سپس میزان کلرید کادمیوم و کلرید سرب لازم با توجه به غلظت‌های تعیین شده، به خاک اضافه شد. لازم به ذکر است که خاک آلوده با حفظ رطوبت در حد ظرفیت زراعی (FC) به‌مدت دو ماه انکوبه گردید. بذرها (تهیه شده از شرکت سیکاس) در محلول یک درصد هایپوکلریت سدیم به‌مدت ۱۰ دقیقه ضدعفونی شدند و در سینی نشاء کشت گردیدند. گیاهچه‌ها در مرحله سه تا چهار برگی به گلدان‌های حاوی خاک آلوده انتقال داده شدند. آبیاری گلدان‌ها تا نقطه FC صورت گرفته و همچنین به‌منظور جلوگیری از شسته شدن فلزات سنگین و کاهش غلظت آن‌ها در محیط رشد ریشه در زیر هر گلدان یک زیرگلدانی قرار داده تا از خروج زه‌آب جلوگیری شود.

برداشت گیاهان بعد از گذشت ۴۲ تا ۵۲ روز از تاریخ انتقال به گلدان صورت گرفته، به گونه‌ای که گیاه، تازه وارد مرحله گل‌دهی شده باشد. اندام هوایی گیاه جداگانه بریده شده و سپس ریشه‌ها با دقت از خاک بیرون آورده شد. نمونه‌هایی که برای تعیین صفات مرتبط با وزن خشک مورد نیاز بودند، در آون با دمای ۱۰۸ درجه سلسیوس و به‌مدت ۴۸ ساعت خشک شدند.

اندازه‌گیری میزان عناصر در اندام هوایی و ریشه با استفاده از دستگاه جذب اتمی شعله‌دار (SpectraA 55B, varian) صورت گرفت. لازم به ذکر است که نمونه‌های گیاهی، با استفاده از بلوک‌های حرارتی به کمک اسید نیتریک هضم تر گردید (Bermejo., 1999)

غلظت مالون‌دی‌آلدهید نیز به‌روش هیت و پاکر (Heath and Packer, 1968) اندازه‌گیری شد. طبق این روش عصاره گیاهی با ۰/۲ گرم از بافت تازه برگی در هاون چینی حاوی پنج میلی‌لیتر تری کلرواستیک اسید (TCA) ۰/۱ درصد حاصل شد. عصاره به‌دست آمده در محلول واکنش ریخته شد و برای حذف اثر ترکیبات اضافی، جذب نمونه‌ها در طول موج ۶۰۰ نانومتر از جذب نمونه‌ها در طول موج ۵۳۵ نانومتر کسر شد. برای محاسبه غلظت مالون دی آلدهید از ضریب خاموشی معادل ۱۵۵ میلی‌مولار بر سانتی‌متر استفاده گردید و نتایج حاصل از اندازه‌گیری برحسب وزن تر طبق معادله ۱ محاسبه و ارائه شد.

MDA :[(A532-A600)]×DF×X×1000×F.W×ε (۱)

در این معادله، A: مقدار جذب در یک طول موج مشخص، DF: Dilution Factor یا فاکتور رقت (در اینجا=۵)، X: درصدی از TCA که برای استخراج استفاده می‌شود، ε: ضریب خاموشی معادل ۱۵۵ mM-1cm- و F.W: وزن نمونه تر گیاه می‌باشند.

اندازه‌گیری پروتئین‌های محلول به‌روش بردفورد (Bradford, 1974) اندازه‌گیری شدند. میزان جذب نمونه‌ها در طول موج ۵۹۵ نانومتر در دستگاه اسپکترفتومتر (Spekol 2000) قرائت شد. میزان پروتئین با قرار دادن نتایج در معادله ۲ به‌دست آمد.

0062/0067X-0/Y=0 (۲)

در این معادله، Y: جذب در طول موج ۵۹۵ نانومتر و X: غلظت پروتئین برحسب میلی گرم بر گرم وزن تر می‌باشد.

محتوای پلی فنل کل براساس روش گائو و همکاران (Gao *et al.*, 2000) با استفاده از معرف فولین اندازه‌گیری شد. نمونه‌های تهیه شده در طول موج ۷۶۵ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر (Spekol 2000- Germany) اندازه‌گیری شد.

اندازه‌گیری فلاونوئیدها به‌روش اسپکتروفتومتری با استفاده از روش وانگر (Wanger, 1979) انجام گرفت. شدت جذب در طول موج‌های ۲۷۰، ۳۰۰ و ۳۳۰ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر (Spekol 2000) خوانده شد. نتایج برحسب درصد جذب گزارش گردید.

جهت اندازه‌گیری مقدار آنتوسیانین‌های اندام هوایی از روش وانگر (Wanger, 1979) استفاده شد. جذب عصاره گیاهی در طول موج ۵۵۰ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر (Spekol 2000) اندازه‌گیری شد. محاسبه غلظت در معادله ۳ با استفاده از ضریب خاموشی $33000\ M^{-1}Cm^{-1}$ انجام و نتایج برحسب میکرومول بر گرم وزن تر ارائه گردید.

A= εbc (۳)

در این معادله، A: جذب در ۵۵۰ نانومتر، B: ۱، C: میزان فعالیت آنزیم/ ε: ضریب خاموشی، در واحد میکروگرم بر گرم وزن تر می‌باشد.

جهت اندازه‌گیری آنتی‌اکسیدانت‌های آنزیمی شامل APX ،CAT و GRX عصاره آنزیمی با روش لاوری و همکاران (Lowery *et al.*, 1951). تهیه شد و سپس برای اندازه‌گیری آنزیم کاتالاز از روش ابی و همکاران (Aebi *et al.*, 1984) استفاده شد. ضریب خاموشی برای کاتالاز ۳۹/۴ میلی‌مول بر سانتی‌متر گزارش شده است. فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز براساس روش (Pandey *et al.*, 1984) در یک میلی‌لیتر بافر واکنش اندازه‌گیری شد. ضریب خاموشی برای آنزیم آسکوربات برابر ۲/۸ میلی‌مولار بر سانتی‌متر است.

فعالیت گایاکول پراکسیداز پس از تهیه مخلوط واکنش افزایش جذب در طول موج ۴۲۰ نانومتر ثبت گردید. ضریب خاموشی مولی این

آنزیم، برابر ۲۶/۶ میلی‌مول بر سانتی‌متر در معادله ۴ جاگذاری شده و فعالیت آنزیمی برحسب واحد در گرم وزن تر بیان شد.

$$A= \varepsilon bc \qquad (۴)$$

در این معادله، A: جذب، B: ۱، C: میزان فعالیت آنزیم، ε: ضریب خاموشی، واحد فعالیت آنزیم برحسب $unit / g\ Fw^{-1}$ می‌باشد.

تجزیه واریانس داده‌ها با برنامه SAS (۹،۱) صورت گرفت و مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون حداقل تفاوت معنی‌دار (LSD) انجام شد.

نتایج و بحث

وزن خشک ریشه و اندام هوایی

نتایج تجزیه واریانس (جدول ۱) نشان داد که وزن خشک اندام هوایی و ریشه گیاه مرزنجوش تحت تأثیر اثر ساده و متقابل کادمیوم و سرب قرار گرفت ($P>0.01$).

نتایج مقایسه میانگین اثر متقابل سرب و کادمیوم نشان داد که وزن خشک ریشه و اندام هوایی گیاه، به تبعیت از افزایش میزان غلظت عناصر سنگین، کاهش یافته است، به گونه‌ای که با افزایش غلظت دو فلز در محیط کشت مرزنجوش، کاهش ۹۱ درصدی در وزن خشک ریشه از شاهد تا حضور حداکثری عناصر (۴۵۰ سرب و ۲۴ کادمیوم) مشاهده شده است (جدول ۲). همچنین ، کاهش ۸۷ درصد ناشی از حضور حداکثری عناصر نسبت به شاهد در اندام هوایی گزارش شده است.

جدول ۱- نتایج تجزیه واریانس وزن خشک ریشه و اندام هوایی، غلظت سرب و کادمیوم در اندام هوایی و ریشه و غلظت مالون دی آلدهید در گیاه مرزنجوش تحت تیمار سرب و کادمیوم

Table 1- The ANOVA results for the root and shoot dry weight, lead and cadmium concentration in shoot and root and malondialdehyde concentration in *Origanum majorana* under lead and cadmium treatment

منابع تغییرات S.O.V	درجه آزادی df	وزن خشک ریشه Root dry weight	وزن خشک اندام هوایی Shoot dry weight	غلظت سرب اندام هوایی Pb shoot concentration	غلظت سرب ریشه Pb root concentration	غلظت کادمیوم اندام هوایی Cd shoot concentration	غلظت کادمیوم ریشه Cd root concentration	غلظت مالون دی آلدهید MDA
تکرار R	2	^{ns}0.051	^{ns}0.039	^{ns}262.11	^{ns}2.98	^{ns}1.93	ns0.17	ns28.47
Cd کادمیوم	3	28.47**	84.32**	13655.62**	405.76**	**5475.31	**923.21	**2566.46
Pb سرب	3	6.08**	20.33**	351671.51**	7076.39**	**215.69	**61.27	**543.16
Cd × Pb	9	0.039**	1.07**	2123.14**	113.54**	**30.28	**11.54	*19.66
Total error خطای کل	60	0.013	0.19	300.03	14.12	3.63	1.04	6.44

*و**به‌ترتیب معنی‌دار در سطح احتمال ۵ و ۱ درصد و ^{ns} غیر معنی‌دار

*and** : significant at the 5 and 1% of probability levels, respectively,and ^{ns}: non-significant.

با افزایش کادمیوم، از غلظت صفر در محیط، تا غلظت ۲۴ میلی‌گرم بر کیلوگرم خاک، وزن خشک ریشه و اندام هوایی، به‌ترتیب ۸۰ درصد و ۷۳ درصد کاهش پیدا کرد. همچنین با افزایش سرب از غلظت صفر تا غلظت ۴۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم خاک، وزن خشک ریشه و اندام هوایی به‌ترتیب ۴۷ درصد و ۴۳ درصد کاهش پیدا کرد (جدول ۲). به نظر می‌رسد که کاهش بیشتر وزن خشک ریشه و اندام هوایی توسط کادمیوم، به‌دلیل تحرک بالاتر و سمیت بیشتر این عنصر شیمیایی بوده است (Rashid *et al.*, 2023).

از دیدگاه فیزیولوژیکی می‌توان این‌گونه بیان نمود که به‌دلیل تحرک بیشتر کادمیوم نسبت به سرب؛ همراه آب و شیره گیاهی، کادمیوم بیشتر از سرب به اندام‌های گیاهی فرستاده می‌شود، در نتیجه مسمومیت بیشتری نسبت به سرب در اندام هوایی ایجاد می‌کند (Abdel-Salam *et al.*, 2015).

جدول ۲- اثر متقابل سرب × کادمیوم بر وزن خشک ریشه و اندام هوایی، غلظت کادمیوم و سرب در ریشه و اندام هوایی و غلظت مالون دی‌آلدهید گیاه مرزنجوش

Table 2- The interaction effect of Cd×Pb on the dry weight of root and shoot (g.pot^{-1}), concentration of cadmium and lead in root and shoot and concentration of malondialdehyde)

منابع تغییرات S.O.V	وزن خشک ریشه Root dry weight (g.pot^{-1})	وزن خشک اندام هوایی Shoot dry weight (g.pot^{-1})	غلظت کادمیوم اندام هوایی Cd shoot concentration (μg.g^{-1} DW)	غلظت کادمیوم ریشه Cd root concentration (μg.g^{-1} DW)	غلظت سرب اندام هوایی Pb shoot concentration (μg.g^{-1} DW)	غلظت سرب ریشه Pb root concentration (μg.g^{-1} DW)	غلظت مالون دی آلدهید MDA (μMol.g^{-1}FW)
Cd0 × pb0	4.99 ^{a}	9.32 ^{a}	1.20 ^{j}	2.20 ^{l}	3.10 ^{i}	4.30 ^{g}	26.30 ^{i}
Cd0 × pb150	4.58 ^{b}	9.11 ^{ab}	1.50 ^{j}	2.20 ^{l}	19.20 ^{gf}	1.1 ^{e}	26.84 ^{i}
Cd0 × pb300	4.28 ^{c}	8.01 ^{c}	1.50 ^{j}	1.98 ^{l}	37.20 ^{d}	256 ^{bc}	30.78 ^{gh}
Cd0 × pb450	3.46 ^{d}	6.08 ^{de}	1.29 ^{j}	1.94 ^{l}	68.20 ^{a}	312 ^{a}	38.79 ^{f}
Cd6 × pb0	4.54 ^{b}	8.66 ^{abc}	9.35 ^{g}	22.36 ^{i}	3 ^{i}	4.30 ^{g}	27.51 ^{hi}
Cd6 × pb150	4.49 ^{b}	8.49 ^{bc}	8.01 ^{gh}	19.32 ^{ij}	17.36 ^{fgh}	97 ^{ef}	28.32 ^{hi}
Cd6 × pb300	3.25 ^{e}	6.70 ^{d}	7.15 ^{hi}	16.33 ^{j}	33.98 ^{de}	249 ^{c}	32.30 ^{g}
Cd6 × pb450	2.04 ^{h}	4.44 ^{g}	5.66 ^{i}	14.02 ^{kj}	60.28 ^{b}	299 ^{a}	47.50 ^{de}
Cd12 × pb0	2.75 ^{f}	5.51 ^{ef}	19.54 ^{c}	38.91 ^{e}	3 ^{i}	4.10 ^{g}	39.80 ^{f}
Cd12 × pb150	2.50 ^{g}	4.99 ^{fg}	17.33 ^{d}	35.11 ^{f}	15.20 ^{gh}	86 ^{ef}	44.50 ^{e}
Cd12 × pb300	2.16 ^{h}	4.40 ^{g}	14.22 ^{e}	31.11 ^{g}	29.77 ^{e}	221 ^{d}	47.10 ^{de}
Cd12 × pb450	1.32 ^{i}	3.55 ^{h}	12.05 ^{f}	25.50 ^{h}	49.30 ^{c}	274 ^{b}	50.30 ^{cd}
Cd24 × pb0	1.44 ^{i}	3.57 ^{h}	27.01 ^{a}	61.32 ^{a}	2.6 ^{i}	3.70 ^{g}	51.80 ^{bc}
Cd24 × pb150	0.95 ^{j}	2.39 ^{i}	21.54 ^{b}	54.17 ^{b}	12.35 ^{h}	78 ^{f}	55.40 ^{b}
Cd24 × pb300	0.58 ^{k}	1.61 ^{j}	19.41 ^{c}	50.19 ^{c}	21.47 ^{f}	201 ^{d}	59.71 ^{a}
Cd24 × pb450	0.42 ^{k}	1.21 ^{j}	16.88 ^{d}	43.28 ^{d}	38.11 ^{d}	252 ^{c}	61.20 ^{a}

در هر ستون و برای هر صفت، میانگین‌هایی که حداقل دارای یک حرف مشترک هستند، براساس آزمون LSD در سطح احتمال ۵ درصد اختلاف معنی‌داری ندارند.

In each column and for each attribute, the means that have at least one letter in common are not significantly different based on LSD test at the 5% of probability level.

تأثیر فلزات سنگین بر کاهش وزن خشک گیاه، عبارتند از کاهش جذب مواد معدنی و آب توسط ریشه، ایجاد حالت نکروزه و کلروزه در برگ کرده که در نهایت، به کاهش رشد ریشه منجر می‌شود که این امر خود سبب کاهش فتوسنتز از طریق چرخه الکترون شده و منتج به کاهش وزن تر و خشک گیاه می‌گردد (Abdel-Salam *et al.*, 2015).

غلظت کادمیوم و سرب در اندام هوایی و ریشه

نتایج تجزیه واریانس نشان داد که غلظت کادمیوم و سرب در اندام هوایی و ریشه گیاه مرزنجوش تحت اثر ساده کادمیوم و اثر ساده سرب و اثر متقابل کادمیوم و سرب در سطح یک درصد قرار گرفت (جدول ۱).

با افزایش غلظت عناصر در خاک، غلظت فلز در گیاه نیز بالا می‌رود، همچنین افزایش غلظت عناصر در گیاه بستگی به شرایط خاک، نوع گیاه و اسیدیته خاک دارد (Gonzaga *et al.*, 2006). البته می‌توان به این موارد، مواردی دیگر مثل وجود رابطه سینرژیستی یا آنتاگونیستی بین عناصر را نیز اضافه کرد (Dotaniya *et al.*, 2017).

اثر متقابل دو عنصر نشان داد که حداکثر غلظت کادمیوم ریشه و بخش هوایی، در زمان عدم حضور سرب در محیط و حضور حداکثری کادمیوم (۲۴ میلی‌گرم بر کیلوگرم) بوده و کمترین آن در غلظت شش میلی‌گرم بر کیلوگرم کادمیوم و ۴۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم سرب مشاهده شد که حکایت از اثر بازدارندگی سرب از جذب کادمیوم در مرزنجوش داشت (جدول ۲). به نظر می‌رسد که اثر بازدارندگی سرب از جذب کادمیوم در گیاه، در سطوح پایین و بالای سرب به یک میزان است. همچنین اثر بازدارندگی سرب در جذب کادمیوم در سطوح بالاتر کادمیوم (۱۲ و ۲۴ میلی‌گرم بر کیلوگرم) بیش از سطح پایین آن (شش میلی‌گرم بر کیلوگرم) بود (جدول ۲).

بازدارندگی آرسنیک از جذب کادمیوم در گیاه برنج (*Oryza sativa*) نشان داده شده است به گونه‌ای که در حضور کادمیوم و آرسنیک با غلظت ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم خاک ، غلظت کادمیوم در ریشه گیاه ۳۰۳ میکروگرم بر گرم ماده خشک گیاه بوده و در زمان حضور کادمیوم ۵۰ و آرسنیک ۲۵۰، غلظت کادمیوم در ریشه گیاه ۸۸ میکروگرم بر گرم ماده خشک گیاه بوده که نشان از بازدارندگی جذب در بین عناصر دارد (Zhao & Wang, 2020). در مطالعه دیگری، (Liu *et al.*, 2011) رابطه آنتاگونیستی بین کادمیوم و سرب در برخی گیاهان زینتی به اثبات رسید، بااین‌حال میزان این اثر در گیاهان مختلف متفاوت است. شاید بتوان این تفاوت را به ترشحات ریشه‌ها در گیاهان مختلف، نسبت داد. این تفاوت باعث به‌وجود آمدن یکسری تغییرات

شیمیایی و فیزیکی در خاک شده که در تجمع و جذب کادمیوم و سرب مؤثر است (Peter *et al.*, 2011).

همچنین حداکثر غلظت سرب در ریشه و بخش هوایی مرزنجوش در زمان عدم حضور کادمیوم در محیط و حضور حداکثری سرب (۴۵۰ میلی‌گرم در کیلوگرم) بوده و کمترین آن در غلظت ۲۴ میلی‌گرم در کیلوگرم کادمیوم و ۱۵۰ میلی‌گرم در کیلوگرم سرب مشاهده شد. به نظر می‌رسد اثر بازدارندگی کادمیوم در جذب سرب در اندام هوایی و ریشه در سطح بالاتر کادمیوم بیشتر است. در سطح بالای سرب (۴۵۰ میلی‌گرم بر کیلو گرم)، کادمیوم از همان غلظت شش میلی‌گرم بر کیلوگرم گیاه را به‌سمت جذب کمتر سرب هدایت کرده است. درحالی‌که در سطح پایین سرب (۱۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم)، بین غلظت‌های ۶ و ۱۲ و ۲۴ کادمیوم، تفاوت معنی‌داری به لحاظ غلظت سرب در بخش هوایی و ریشه گیاه، وجود نداشت (جدول ۲). همچنین نتایج مطالعه جدید نشان داد که تجمع کادمیوم و سرب در ریشه نسبت به اندام هوایی بیشتر بود (جدول ۲).

برخی از بررسی‌ها نشان داده که توزیع کادمیوم در اندام‌های گیاهی در گیاهان با یکدیگر متفاوت است. به‌عنوان مثال، نتایج پژوهشی نشان داد که غلظت کادمیوم در گیاه گوجه‌فرنگی *Solanum lycopersicum* ، فلفل سبز *Capsicum annuum* و نعناع فلفلی *Mentha piperita* در ریشه بیشتر از اندام هوایی بود، درحالی‌که تجمع کادمیوم در اندام هوایی کلم چینی بیشتر از ریشه گزارش شد (Liu *et al.*, 2011). بنابراین، وجود مکانیسم‌های متفاوت فیزیولوژیکی در گیاهان، از جمله وجود فیتوکلاتین‌ها و یا سوبرین لاملا در ریشه برخی گیاهان می‌تواند در توجیه این تفاوت‌ها مؤثر باشد (pourghasemian *et al.*, 2019).

مالون دی آلدهید

میزان مالون دی آلدهید به‌عنوان شاخصی از پراکسیداسیون لیپیدها، تحت تأثیر اثر ساده کادمیوم و سرب (۱ درصد) و اثر متقابل کادمیوم و سرب (۵ درصد) قرار گرفت (جدول ۱).

میزان مالون دی آلدهید مشخص‌کننده آسیب به غشاهای سلولی است که با افزایش آلدهیدها و کتون‌های سمی در گیاه همراه است (Morales & Munné-Bosch, 2019). گرچه فرایندهای تولید ROS در شرایط نرمال آهسته است، امّا سرب و کادمیوم سبب افزایش تولید آن‌ها می‌شود. لذا گونه‌های فعال اکسیژن سبب القای تنش اکسیداتیو و پراکسیداسیون لیپیدی در گیاه می‌شوند (Kaur *et al.*, 2012).

در بررسی اثرات متقابل عناصر بر فاکتور MDA، افزایش میزان مالون دی آلدهید در ترکیب حداکثر غلظت عناصر با مقدار ۷۶ میکرومول بر گرم وزن تر مشاهده شد. کمترین میزان MDA نیز مربوط به شاهد با مقدار ۲۷/۰۱ میکرومول بر گرم وزن تر بوده است (جدول ۴)

بررسی اثر متقابل سیلیسیوم و کادمیوم بر گیاه چغندر *Beta vulgaris* نشان داد، درصورتی‌که در محیطی دو عنصر با هم قرار گیرند، اثر بازدارنده در بحث جذب بر روی هم داشته‌اند. همچنین سیلیسیم می‌تواند اثرهای منفی کادمیوم بر روی صفات بیوشیمیایی گیاه چغندر، مثل مالون دی آلدهید، پرولین و فعالیت آنزیمی و صفات فیزیولوژیکی مثل شاخص فتوسنتز و رنگیزه کلروفیل گیاه را کمرنگ کند (Behtash *et al.*, 2011). این نتیجه با نتایج حاصل از مطالعه حاضر به‌طور کامل هماهنگ نبود. به گونه‌ای که در بررسی اثر متقابل کادمیوم و سرب بر گیاه مرزنجوش اثر بازدارندگی در جذب بین دو عنصر مشاهده شد، ولی این بازدارندگی نتیجه مثبتی روی صفات فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی نداشت. در محیط‌هایی که بیشترین غلظت از هر دو فلز وجود داشت بیشترین میزان MDA نیز مشاهده شد که مسئله حکایت از آسیب‌پذیری گیاه از حضور حداکثری دو عنصر در محیط کشت داشت.

میزان پرولین و پروتئین

میزان پرولین و پروتئین، تحت تأثیر اثرات ساده کادمیوم و سرب (۱ درصد) قرار گرفتند، درحالی‌که اثرات متقابل کادمیوم و سرب بر صفات مذکور تأثیری نداشت (جدول ۱).

در تنش کادمیوم و سرب، میزان پرولین، با افزایش غلظت کادمیوم در محیط، از شاهد تا ۲۴ میلی‌گرم بر کیلوگرم خاک، ۸۱ درصد و با افزایش غلظت سرب در محیط از شاهد تا ۴۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم خاک، ۴۰ درصد افزایش یافت (جدول ۴). کادمیوم و سرب بر میزان پروتئین تأثیر عکس گذاشتند و به‌ترتیب باعث کاهش ۳۹ و ۲۴ درصدی در میزان پروتین شدند (جدول ۴). بنابراین، به‌نظر می‌رسد سطوح بالای کادمیوم، بیش از سطوح بالای سرب، برای گیاه مخرب بوده است.

با افزایش غلظت عناصر، میزان پرولین گیاه مرزنجوش افزایش یافته این افزایش می‌تواند در ایجاد مقاومت از طریق تنظیم اسمزی مؤثر واقع شود (Siddique *et al.*, 2018). محققین نتیجه گرفته‌اند که افزایش تجمع پرولین در تنش سرب و کادمیوم ممکن است به‌دلیل افزایش سنتز و یا کاهش تجزیه پرولین و یا هر دو باشد (Naderi *et al.*, 2013). پرولین در بهبود تنش‌های محیطی، از جمله تنش فلزات سنگین در گیاهان و ریزجانداران نقش مهمی ایفا می‌کند. در سلول‌های تحت تنش، نقش آنتی‌اکسیدانتی دارد و به‌عنوان جاروب‌کننده گونه‌های اکسیژن واکنشگر و یک محافظ مولکولی شناخته می‌شود (Siddique *et al.*, 2018).

جدول ۳- نتایج تجزیه واریانس محتوی پرولین، پروتئین، فنل، فلاونوئید، آنتوسیانین و آنزیم‌های CAT، APX و GPX در گیاه مرزنجوش تحت تیمار سرب و کادمیوم

Table 3-The ANOVA results for the proline, protein, phenol, flavonoid, anthocyanin and CAT, APX and GPX enzymes contents in marjoram plant under lead and cadmium treatment

منابع تغییرات S.O.V	درجه آزادی df	پرولین proline	پروتئین Protein	فنل Phenol	فلاونوئید Flavonoid	آنتوسیانین Anthocyanin	آنزیم کاتالاز CAT	آنزیم آسکوربات پراکسیداز APX	آنزیم گایاکول پراکسیداز GPX
تکرار R	2	ns1.58	ns0.066	0.054 ns	0.010 ns	0.05 ns	0.04 ns	0.0204 ns	ns0.0004
کادمیوم Cd	3	765.0**	106.79**	103.67**	1.5**	0.209**	0.00013**	5.8**	0.141**
سرب Pb	3	252.9**	32.23**	12.43**	0.199**	0.038**	0.00078**	0.14**	0.012**
Cd × Pb	9	4.98 ns	1.79 ns	3.04 ns	0.0008 ns	0.001 ns	0.00036**	0.6**	0.0007 ns
Total error خطای کل	60	3.70	1.32	1.61	0.004	0.000001	0.00001	0.01	0.0004

*و**به‌ترتیب معنی‌دار در سطح احتمال ۵ و ۱ درصد و nsغیر معنی‌دار

*and** : significant at the 5 and 1% of probability levels, respectively,and ns: non-significant

دلیل کاهش پروتئین در گیاه می‌تواند مربوط به تغییر در بیان ژن مربوطه، افزایش فعالیت ریبونوکلئاز و پروتئاز و تخریب متابولیسم نیتروژن و در نتیجه، کاهش محتوی آمینو اسید آزاد در گیاه باشد (Chen *et al.*, 2019). حضور سرب و کادمیوم به‌دلیل اختلال در هموستازی سلول منجر به افزایش H_2O_2 در سلول گیاهی می‌شود هیدروژن پراکسید تولید شده می‌تواند منجر به تخریب غشا و پروتئین در گیاه شده، همچنین کادمیوم می‌تواند از طریق ترکیب با گروه تیول پروتئین‌ها منجر به کاهش فعالیت و یا تخریب ساختار پروتئین شود (Mishra *et al.*, 2006).

از طرفی، برخی مطالعات گزارش کرده‌اند که تنش عناصر سنگین می‌تواند منجر به افزایش پروتئین در گیاه شود (Mishra *et al.*, 2006). پیش از این در مطالعات تامالی و همکاران (Taamalli *et al.*, 2015) مشخص شده است که عناصر سنگین خصوصا کادمیوم، باعث جلوگیری از سنتز ATP در میتوکندری و چرخه کربس، قبل از سیترات، شده که به عنوانی عامل سوخت گلوتامات را افزایش داده تا آنابولیسم گلوتاتیون را به همراه داشته باشد.

فنل و فلاونوئید

کادمیوم و سرب اثر معنی‌داری (۱ درصد) بر محتوای فنل و فلاونوئید گیاه مرزنجوش داشتند، درحالی‌که، اثر متقابل این دو عنصر تأثیر معنی‌داری بر صفات مذکور نداشتند (جدول ۱).

فنل‌ها به‌عنوان متابولیت‌های ثانویه در گیاهان و آنتی‌اکسیدانت می‌توانند با اهدای الکترون به گایاکول، آن را تبدیل به آنزیم گایاکول پراکسیداز کنند تا بتواند در فعالیت آنتی‌اکسیدانتی و پاکسازی گیاه از رادیکال‌های آزاد شرکت کند (Sakihama *et al.*, 2002).

طبق نظر هرناندز و همکاران (Hernandez *et al.*, 2009)، هر ترکیبی که برای اکسید شدن، ساده و آسان باشد می‌تواند یک آنتی‌اکسیدانت خوب در نظر گرفته شود. فلاونوئیدها این توانایی را دارند که با گرفتن الکترون از یون‌های رادیکال آزاد، با استفاده از هیدروژن فنولی خود، به‌عنوان یک آنتی‌اکسیدانت عمل کرده و گیاه را از اثرات نامطلوب تنش‌های غیرزنده، مثل عناصر سنگین حفظ کند. همچنین نقش فنل و فلاونوئید در کلاته کردن عناصر فلزی به اثبات رسیده است. فنل‌ها از میزان یون آزاد در محیط کاهش داده و آن‌ها را در واکوئل ذخیره می‌کنند.

بااین‌حال میزان فعالیت فنول و میزان محفوظ ماندن گیاه از آسیب فلز سنگین، بستگی به شرایط محیطی، شرایط گیاه، نوع فلز سنگین و شدت تنش دارد (Márquez *et al.*, 2009). به‌طوری‌که در مطالعه حاضر افزایش کادمیوم از صفر به ۲۴ میلی‌گرم بر کیلوگرم خاک محتوی فنل گیاه را ۵۲ درصد افزایش داده است. این افزایش در حضور سرب در محیط به‌میزان ۱۴ درصد از شاهد تا ۴۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم سرب گزارش شده است. با این وجود، تغییر معنی‌داری بین غلظت ۱۵۰ و ۳۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم سرب با شاهد وجود نداشت (جدول ۲).

با افزودن غلظت‌های ۶، ۱۲ و ۲۴ میلی‌گرم کادمیوم به محیط کشت، محتوای فلاونوئید گیاه مرزنجوش، به‌میزان ۶ درصد و ۲۴ درصد و ۴۲ درصد نسبت به شاهد افزایش یافت. همچنین با افزودن ۴۵۰، ۳۰۰ و ۱۵۰ میلی‌گرم سرب به محیط کشت، محتوای فلاونوئید، به‌میزان ۳ درصد و ۷ درصد و ۱۴ درصد نسبت به شاهد افزایش نشان داد (جدول ۲). بنابراین، کادمیوم بیش از سرب در تحریک تولید فنل‌ها و فلاونوئیدها نقش داشته است.

جدول ٤- اثر کاربرد کادمیوم و سرب بر محتوی پرولین، پروتئین، فنل و فلاونوئید، آنتوسیانین و آنزیم گایاکول پراکسیداز گیاه مرزنجوش

Table 4- The effect of Cd and Pb on the proline, protein , phenol and flavonoid, anthocyanin and Guaiacol peroxidase enzyme contents in marjoram plant

تیمارها Treatment	پرولین Proline (μM.g^{-1} FW)	پروتئین Protein (mg.g^{-1} FW)	فنل Phenol (mg.g^{-1} FW)	فلاونوئید Flavonoid (mg.g^{-1} FW)	آنتوسیانین Anthocyanin (mg.g^{-1} FW)	آنزیم گایاکول پراکسیداز GPX (unit.g^{-1} FW)
کادمیوم Cd (mg.kg^{-1})						
0	17.44 ^{a}	22.03 ^{d}	13.44 ^{c}	1.87 ^{d}	0.145 ^{d}	0.124 ^{d}
6	14.56 ^{b}	25.69 ^{c}	15.84 ^{b}	2.00 ^{c}	0.265 ^{c}	0.192 ^{c}
12	12.29 ^{c}	33.09 ^{b}	16.53 ^{b}	2.32 ^{b}	0.375 ^{b}	0.269 ^{b}
24	10.54 ^{d}	39.99 ^{a}	20.52 ^{a}	2.66 ^{a}	0.447 ^{a}	0.377 ^{a}
سرب Pb (mg.kg^{-1})						
0	15.28 ^{a}	25.83 ^{d}	15.64 ^{b}	2.08 ^{d}	0.24 ^{d}	0.20 ^{d}
150	14.68 ^{b}	27.82 ^{c}	16.04 ^{b}	2.15 ^{c}	0.28 ^{c}	0.22 ^{c}
300	13.27 ^{c}	30.76 ^{b}	16.68 ^{b}	2.24 ^{b}	0.31 ^{b}	0.24 ^{b}
450	11.59 ^{d}	36.38 ^{a}	17.97 ^{a}	2.38 ^{a}	0.38 ^{a}	0.28 ^{a}

در هر ستون و برای هر صفت، میانگین‌هایی که حداقل دارای یک حرف مشترک هستند، براساس آزمون LSD در سطح احتمال ۵ درصد اختلاف معنی‌داری ندارند.

In each column and for each attribute, the means that have at least one letter in common are not significantly different based on LSD test at the 5% of probability level.

در پژوهشی بر روی گیاه بابونه مشخص شد که در تنش حضور یون سرب در محیط گیاه، فنول افزایش یافته که خود منجر به افزایش فنیل آلانین آمونیوم لیاز (*PAL*) در گیاه شده است. از طرف دیگر، افزایش کادمیوم در ریشه گیاه بابونه *Matricaria chamomilla*، منجر به تولید پلی فنول اکسیداز شده که فنول را تجزیه کرده و سبب و کاهش محتوی فنول در بابونه شد (Kovacik *et al.*, 2009). بنابراین، به نظر می‌رسد گیاهان دارویی مختلف در استفاده از این آنتی‌اکسیدانت و متابولیت‌های ثانویه به‌عنوان سیستم دفاعی، یکسان عمل نمی‌کنند.

آنتوسیانین

محتوای آنتوسیانین نیز تحت تأثیر اثر ساده کادمیوم و سرب در سطح ۱ درصد قرار گرفت. این در حالی است که اثر متقابل دو عنصر کادمیوم و سرب بر میزان آنتوسیانین گیاه مرزنجوش معنی‌دار گزارش نشده است (جدول ۱).

میزان آنتوسیانین متناظر با افزودن کادمیوم به محیط، در غلظت ۶، ۱۲و ۲۴ میلی‌گرم بر کیلوگرم خاک به‌ترتیب ۸۲ درصد، ۱۵۲ درصد و ۲۰۸ درصد افزایش نسبت به شاهد نشان داده است. همچنین در افزودن سرب به محیط، با افزایش غلظت به‌۱۵۰، ۳۰۰ و ۴۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم خاک، آنتوسیانین به‌ترتیب ۱۶ درصد، ۲۹ درصد و ۵۸ درصد افزایش نسبت به شاهد نشان داد (جدول ۴).

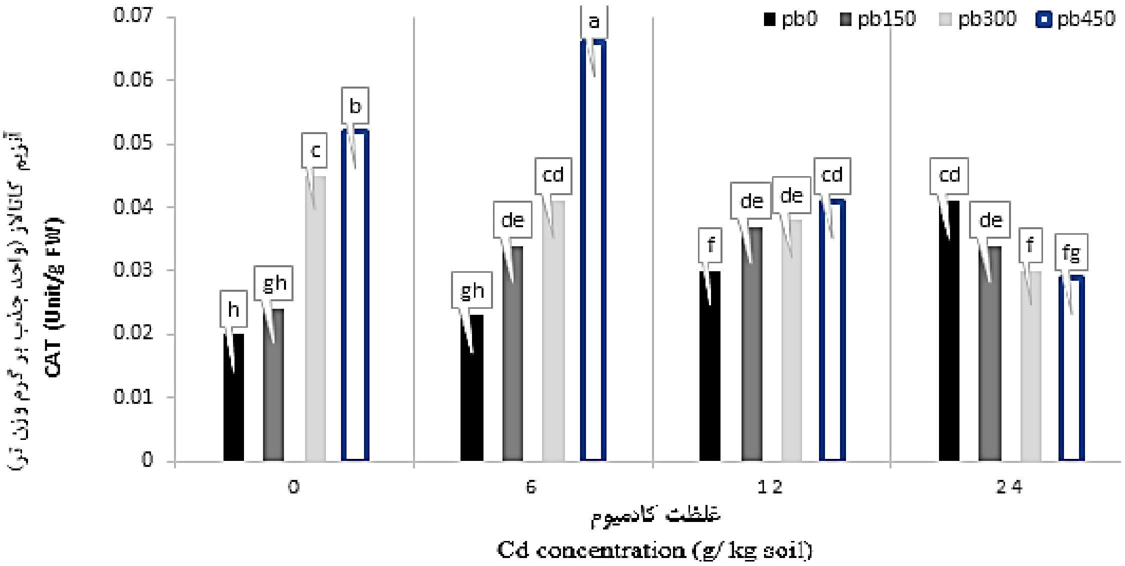
آنتوسیانین‌ها به‌عنوان آنتی‌اکسیدانت و رنگیزه‌های گیاهی، در واکوئل ذخیره می‌شوند تا در زمان وقوع تنش اکسیداتیو وارد عمل شوند (Castañeda-Ovando *et al.*, 2009). برخی پژوهشگران اثرات آنتی‌اکسیدانتی آنتوسیانین را مانند ویتامین E و C می‌پندارند (Castañeda-Ovando *et al.*, 2009). به عبارتی، نوع تأثیر یون فلزی بر میزان رنگیزه‌های گیاهی، به نوع یون فلزی و غلظت آن، نوع گیاه و مدت زمان تنش بستگی دارد (John *et al.*, 2009).

در پژوهشی که بر روی گیاه اسفناج تحت تیمار اثر متقابل کادمیوم و سرب انجام شد، افزایش محتوای آنتوسیانین گزارش شده است (Ghorbani *et al.*, 2016,). درحالی‌که علیپور و همکاران (Alipour *et al.*, 2009) به کاهش آنتوسیانین در حضور کادمیوم و روی اشاره کردند.

آنزیم‌ها

طبق نتایج جدول تجزیه واریانس، آنزیم کاتالاز و گایاکول پراکسیداز و آسکوربات پراکسیداز در سطوح مختلف اثر ساده کادمیوم و سرب، در سطح ۱ درصد، تغییرات معنی‌داری را نشان داده است.

همچنین، کاتالاز و آسکوربات پراکسیداز تحت تأثیر اثر متقابل دو عنصر در سطح ۱ درصد قرار گرفت، درحالی‌که از اثر متقابل دو عنصر تأثیری بر آنزیم گایاکول پراکسیداز گزارش نشد (جدول ۳).



شکل ۱- اثر متقابل کادمیوم × سرب بر فعالیت آنزیم کاتالاز گیاه مرزنجوش

Figure 1- The interaction effect of cadmium × lead on the catalase enzyme activity of marjoram plant (LSD, $p\leq 0.05$).

کاتالاز و آسکوربات پراکسیداز APX و گایاکول پراکسیداز GPX

همان‌طور که در شکل ۱ ترسیم شده است، فعالیت آنزیم کاتالاز تا ترکیب غلظت ۶ کادمیوم و ۴۵۰ سرب روند افزایشی داشته است، به گونه‌ای که بیشترین مقدار ثبت شده در همین تیمار بوده است. این روند افزایشی فعالیت کاتالاز در گروه کادمیوم ۲۴ به روند کاهشی تبدیل شده، به‌طوری‌که با افزایش غلظت سرب تا۴۵۰ میلی‌گرم در محیط حاوی کادمیوم ۲۴ میلی‌گرم، کمترین فعالیت این آنزیم مشاهده شد. به عبارتی، به نظر می‌رسد که در افزایش غلظت عناصر سنگین با آسیبی که بر سیستم آنتی‌اکسیدانتی گیاه وارد می‌شود، کاهش فعالیت آنزیمی را سبب می‌شود.

کاهش فعالیت آنزیم کاتالاز در غلظت‌های بالا احتمالاً به‌دلیل غیرفعال شدن آنزیم توسط ROS و کاهش سنتز آنزیم و یا تغییر در اجتماع زیرواحدهای آنزیم می‌باشد. از طرفی، ممکن است فعال شدن پروتئازهای پراکسیزومی دلیل دیگری برای کاهش فعالیت آنزیمی باشد. همچنین کاتالاز آنزیمی است که حاوی آهن است. سرب و کادمیوم سبب کاهش جذب آهن هم می‌شود و ازاین‌رو فعالیت کاتالاز در غلظت بالا کاهش می‌یابد (Mishra *et al*., 2006).

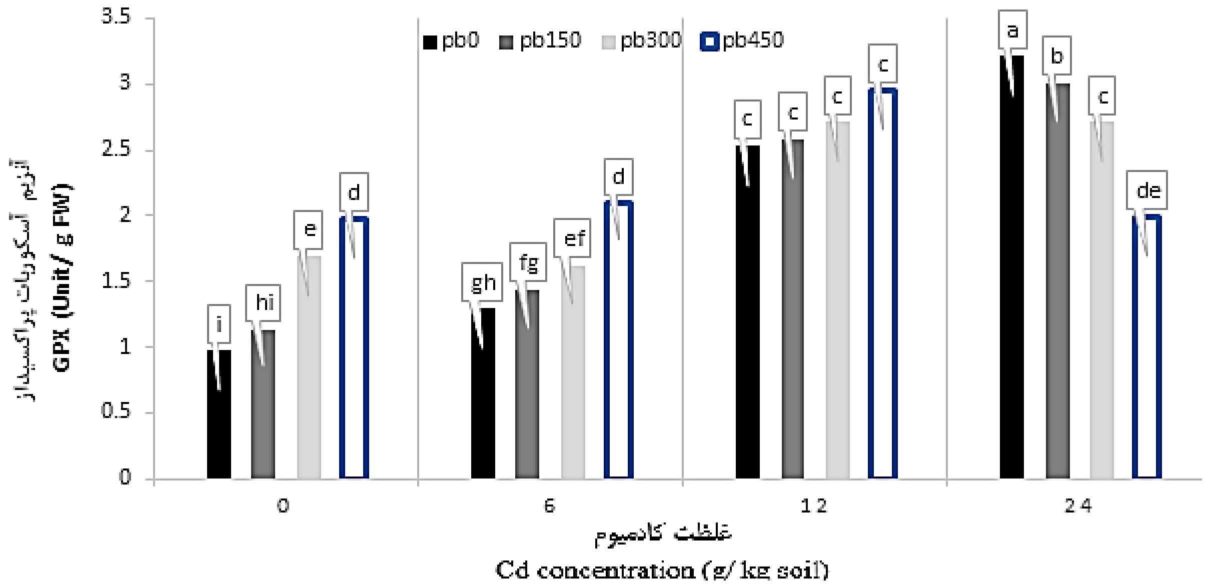
در مطالعه حاضر، با افزایش غلظت کادمیوم و سرب، فعالیت آنزیم GPX افزایش نشان داد. با افزودن ۲۴ میلی‌گرم بر کیلوگرم به محیط رشد گیاه فعالیت آنزیم GPX نسبت به شاهد ۲۰۴ درصد افزایش نشان داد. افزایش سرب از صفر تا ۴۵۰ سبب افزایش فعالیت آنزیم مذکور به ۴۰ درصد شده است (جدول ۴).

کاتالاز ممکن است در فرآیندهای سیگنالینگ سلولی از طریق کنترل هیدروژن پراکسید نقش داشته باشد و وقتی که فعالیت کاتالاز کاهش یابد، فعالیت آنزیم‌های دیگر حذف‌کننده ROS از طریق یک مسیر جبرانی افزایش می‌یابد. در این شرایط که میزان تولید هیدروژن پراکسید افزایش می‌یابد، گایاکول پراکسیداز نقش بسیار مهم‌تری از کاتالاز درحذف هیدروژن پراکسید دارد. ازاین‌رو، فعالیت گایاکول پراکسیداز نسبت به کاتالاز در غلظت بالای کادمیوم و سرب افزایش می‌یابد (Malecka *et al*., 2012).

مرزنجوش به‌عنوان یک گیاه دارویی با تولید ترکیبات فنلی هم در شرایط عادی و هم در شرایط تنش (جدول ۴) می‌تواند به تولید بیشتر گایاکول پراکسیداز کمک کرده و از این آنزیم به‌عنوان یک آنتی‌اکسیدانت در جهت کاهش اثرات منفی کادمیوم و سرب استفاده نماید. بااین‌حال، در مطالعه حاضر کادمیوم در ایجاد فعالیت این آنزیم بیش از سرب تأثیر داشته که این مسئله با سایر نتایج هماهنگ است. به عبارتی، سمیت بیشتر کادمیوم نسبت به سرب گیاه را در ایجاد پاسخ های دفاعی نیز مجهزتر می‌کند. هر چند باوجود فعال شدن بیشتر سیستم‌های دفاعی، گیاه همچنان از کادمیوم بیش از سرب آسیب دیده است (جدول ۲).

اثر متقابل کادمیوم و سرب بر میزان فعالیت آنزیم APX نشان داد که با افزایش غلظت عناصر، فعالیت آنزیم APX زیاد می‌شود. به‌طوری که بیشترین مقدار ثبت شده در تیمار ۲۴ کادمیوم و صفر سرب است؛ امّا بعد از این تیمار و با افزایش میزان سرب، فعالیت انزیم مذکور روند کاهشی را نشان داد. این کاهش به ۳۸ درصد در تیمار ۲۴ کادمیوم و ۴۵۰ سرب رسید (شکل ۲). به دیدگاه دزی و همکاران (Dezi *et al.*, 2009) می‌توان از آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانتی به‌عنوان یک نشانگر زیستی در محیط استفاده کرد که میزان آلودگی عناصر سنگین را بیان کند.

بااین‌حال میزان فعالیت آنزیم‌های CAT، APX و GPX وابسته به شدت، مدت و نوع تنش و نوع گیاهان تحت تنش است (Sharma *et al.*, 2012). به‌عنوان مثال، گزارش شده است که در گیاه تاجریزی *Solanum nigrum* با افزایش کادمیوم (۱۵ میکرومولار) در مرحله‌ی جوانه‌زنی فعالیت APX زیاد شده، ولی CAT کاهش می‌یابد (Fidalgo *et al.*, 2011). درحالی‌که در پژوهشی که بر روی غدی سیب‌زمینی انجام شد، متوجه شدند که در القای تنش عناصر سنگین، باافزایش کادمیوم، APX کاهش یافته، ولی فعالیت CAT افزایش می یابد (Stroinski & Kozlowska, 1997).



شکل ۲- اثر متقابل کادمیوم × سرب بر فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز گیاه مرزنجوش

Figure 2- The interaction effect of cadmium ×lead on ascorbate peroxidase enzyme of marjoram plant (LSD, $p \leq 0.05$)

نتیجه‌گیری

بررسی‌های انجام شده در مطالعه حاضر نشان داد که وزن خشک اندام هوایی و ریشه گیاه در حضور کادمیوم و سرب کاهش پیدا می‌کند، در کادمیوم با اثر منفی بیشتر نسبت به سرب، که بر قسمت فتوسنتز، رنگیزه‌ها، زنجیره انتقال الکترون و تولید انرژی گیاه می‌گذارد کاهش وزن بیشتری مشاهده شده است. همچنین این کاهش در اثر متقابل حداکثر غلظت‌های سرب و کادمیوم (۲۴-۴۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم)، بیشترین بود. با افزایش غلظت کادمیوم و سرب در محیط کشت غلظت هر دو عنصر در گیاه مورد مطالعه افزایش یافت. همچنین سرب تحرک بسیار کمتری نسبت به کادمیوم و تمایل بیشتری به حضور در ریشه داشته است.

حضور کادمیوم در محیط حاوی سرب، اثر بازدارندگی در جذب سرب توسط گیاه داشته و بالعکس، به گونه‌ای که بازدارندگی سرب از جذب کادمیوم در اندام هوایی به‌طور متوسط ۳۹ درصد و بازدارندگی کادمیوم از جذب سرب به‌طور متوسط ۳۵ درصد است.

افزایش متابولیت‌های ثانویه مورد بررسی در این مطالعه به موازات افزایش کادمیوم و سرب، حکایت از نقش آن‌ها به‌عنوان آنتی‌اکسیدان در کمک به گیاه در مقابل تنش‌های مذکور دارد. همچنین می‌توانند به همراه افزایش پرولین در تنظیم اسمزی گیاه نقش ایفا کنند.

به نظر می‌رسد که می‌توان از این گیاه در شرایط آلوده به سطوح متوسط و پایین کادمیوم و سرب در فضای سبز معادن استفاده کرد.

References

1- Abdel-Salam, A.A., Salem, H.M., & Seleiman, M.F. (2015). *Phytochemical Removal of Heavy Metal-Contaminated Soils. Heavy Metal Contamination of Soils*,Chapter 16, pp. 299-309. https://doi.org/10.1007/978-3-319-14526-6_16

2- Aebi, M., Furter, R., & Prand, F. (1984). Structure and function of the TRP3 gene of *Saccharomyces cerevisiae*: Analysis of transcription, promoter sequence, and sequence coding for a glutamine amidotransferase. *Current Genetics*, *8*, 165-172. https://doi.org/10.1007/BF00417812

3- Alipour Darvari, H., Zare Mayvan, H., & Sharifi, M. (2009). Peroxidase activity in *Raphanus sativus* and its

4- relationship to the amount of heavy metals in soil. *Journal of Science*, *1*, 35-37.

5- Azizi, M., Tafreshi, G., Mirmistafaei, S. (2015). *Breeding of medicinal plants*. Publication, Nakhost. pp. 401. (In Persian)

6- Behtash, F., Tabatabaie, S.J., Malakoti, M.H., & Ostan, S. (2015). The effect of Co and Cd on growth, chlorophyll content, photosynthesis, and cadmium concentration in sugar beet. *Iranian Journal of Soil Research*, *24*(1), 32-41.

7- Bermejo, B.A. (1999). Study of illicit cocaine seizure classification by pattern recognition techniques applied to matal data. *Journal of Forensic Science*, *44*(2), 270-274.

8- Chen, S., Wang, Q., Lu, H., Li, J., Yang, D., Liu, J., & Yan, C. (2019). Phenolic metabolism and related heavy metal tolerance mechanism in *Kandelia Obovat* under Cd and Zn stress. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, *169*, 134-143. https://doi.org/:10.1016/j.econv.2018.11.004

9- Castañeda-Ovando, A., Lourdes Pacheco-Hernández, M., Páez-Hernández, M.E., Rodríguez, J.A., & Galán-Vidal, C.A. (2009). Chemical studies of anthocyanins: A review. *Food Chemistry*, *113*, 859–871.

10- Dezi, F., Carbonari, S., & Leoni, G. (2009). A model for the 3D kinematic interaction analysis of pile groups in layered soils. *Earthquake Engineering & Structural Dynamics*, *38*(11),1281-1305

11- Dotaniya, M.L., Rajendiran, S., Coumar, V., Meena, V.D., Saha, J.K., Kundu, S., Kumar, A., & Patra, A.K. (2017). Interactive effect of cadmium and zinc on chromium uptake in spinach grown in Vertisol of Central India. *International Journal of Environmental Science and Technology*, *15*(1), 341-352. https://doi.org/:10.1007/s13762-017-1396-x

12- Fidalgo, F., Freitas, R., Ferreira, R., Pessoa, A.M., & Teixeira, J. (2011). *Solanum nigrum L.* antioxidant defense system isozymes are regulated transcriptionally and post-translationally in Cd-induced stress. *Environmental and Experimental Botany*, 72, 312-319. https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2011.04.007

13- Gao, J.Z., Gray, D.B., Motheram, R., & Hussain, M.A. (2000). Importance of inlet air velocity in fluid bed drying of a granulation prepared in a high shear granulator. *The AAPS Journal*, 1

14- Ghada, M. (2017). Efficacy of some Sudanese medicinal plants extracts to remove heavy metals from water. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*, *11*(3), 51-55.

15- Glick, B.R. (2010). Using soil bacteria to facilitate phytoremediation. *Biotechnology Advances*, *28*(3), 367-374. https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2010.02.001

16- Gonzaga, M.I.S., Santos, J.A.G., & Ma, L.Q. (2006). Arsenic phytoextraction and hyperaccumulation by fern species. *Scientia Agricola*, *63*, 90-101. https://doi.org/10.1590/S0103-90162006000100015

17- Ghorbani, H., Heydari, M., & Ghafari, M. (2016). The effect of different levels of salinity and heavy metals lead and cadmium on the growth of photosynthetic pigments and the amounts of sodium and potassium in spinach. *Soil andPlant Interaction*, *7*(24), 15-23. (In Persian)

18- Heath, R.L., & Packer, L. (1968). Photoperoxidation in isolated chloroplasts. I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, *125*, 189–198. https://doi.org/10.1016/0003-9861(68)90654-1

19- Hernandez, I., Alegre, L., Breusegem, F.V., & Munne-Bosch, S. (2009). How relevant are flavonoids as antioxidants in plants? *Trends in Plant Science*, *14*, 125–132. https://doi.org/10.1016/j.tplants.2008.12.003

20- John, R., Ahmad, P., Gadgil, K., & Sharma, S. (2009). Heavy metal toxicity: Effect on plant growth, biochemical parameters metal accumulation by *Brassica juncea* L. *International Journal of Plant Production*, *3*(3), 65-76.

21- Kaur, J., Yadav, S., & Singh, Z. (2012). Orbital dimensions - A direct measurement study using dry skulls. *Journal of Academic and Industrial Research*, *1*(6), 293-295.

22- Keilig, K., & Ludwig-Müller, J. (2009). Effect of flavonoids on heavy metal tolerance in *Arabidopsis thaliana* seedlings. *Botanical Studies*, *50*(3), 311.

23- Kováčik, J., Klejdus, B., Hedbavny, J., Štork, F., & Bačkor, M. (2009). Comparison of cadmium and copper effect on phenolic metabolism, mineral nutrients and stress-related parameters in *Matricaria chamomilla* plants. *Plant and Soil*, 320-231. https://doi.org/10.1007/s11104-009-9889-0

24- Liu, X., Yang, C., Zhang, L., Li, L., Liu, S., Yu, J., You, L., Zhou, D., Xia, C., Zhao, J., & Wu, H. (2011). Metabolic profiling of cadmium-induced effects in one pioneer intertidal halophyte *Suaeda salsa* by NMR-based metabolomics. *Ecotoxicology*, *20*, 1422-1431. https://doi.org/10.1007/s10646-011-0699-9

25- Malecka, A., Piechalak, A., Mensinger, A., Hanc, D., Baralkiewicz, D., & Tomaszewska, B. (2012). Antioxidative defense system in *Pisum sativum* roots exposed to heavy metals (Pb, Cu, Cd, and Zn). *Polish Journal of Environmental Studies*, *21*(6), 1721-1730.

26- Márquez-García, B., Fernández, M.Á., & Córdoba, F. (2009). Phenolics composition in *Erica* sp. differentially exposed to metal pollution in the Iberian Southwestern Pyritic Belt. *Bioresource Technology*, *100*(1), 446-451. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2008.04.070
27- McGrath, S.P., Chaudri, A.M., & Giller, K.E. (1995). Long-term effects of metals in sewage sludge on soils, microorganisms, and plants. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, *14*(2), 94-104. https://doi.org/10.1007/BF01569890
28- Mishra, S., Srivastava, S., Tripathi, R.D., Kumar, R., Seth, C.S., & Gupta, D.K. (2006). Lead detoxification by coontail (*Ceratophyllum demersum L.*) involves induction of phytochelatins and antioxidant system in response to its accumulation. *Chemosphere*, *65*, 1027-1039. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2006.03.033
29- Morales, M., & Munné-Bosch, S. (2019). Malondialdehyde: Facts and artifacts. *Plant Physiology*, *180*(3), 1246–1250. https://doi.org/10.1104/pp.19.00405
30- Naderi, N., Mirzamasoumzadeh, B., & Aghaei, A. (2013). Effects of different levels of Lead (Pb) on physiological characteristics of sugar beet. *International Journal of Agriculture and Crop Sciences*, *5*(10), 1154-1157.
31- Nieboer, E., & Richardson, D.H.S. (1980). The replacement of the nondescript term "heavy metals" by a biologically and chemically significant classification of metal ions. *Environmental Pollution*, *1*, 3-26. https://doi.org/10.1016/0143-148X(80)90017-8
32- Pandey, R.K., Herrera, W.A.T., Pendleton, J.W., & Villegas. A.N. (1984). Drought response of grain legumes under irrigation gradient. *Agronomy Journal*, *76*, 557-560.
33- Peter, E., & Gbadegesin, A. (2011). Spatial relationships of urban land use, soils and heavy metal concentrations in Lagos Mainland area. *Journal of Applied Science and Environmental Management*, *15*(2), 391–399. https://doi.org/10.4314/jasem.v15i2.68533
34- Pourghasemian, N., Landberg, T., Ehsanzadeh, P., & Gregerb, M. (2019). Different response to Cd stress in domesticated and wild safflower (*Carthamus* spp.). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, *171*, 321–328. https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.12.052
35- Pourrut, B., Shahid, M., Dumat, C., Winterton, P., & Pinelli, E. (2011). Lead uptake, toxicity, and detoxification in plants. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, *213*, 113-136.
36- Rashid, A., Schutte, J., Ulery, A., Deyholos, M.K., Sanogo, S., Lehnhoff, E., & Beck, L. (2023) .Heavy metal contamination in agricultural soil: Environmental pollutants affecting crop health. *Agronomy* https://doi.org/10.3390/13061521
37- Sakihama, Y., Cohen, M.F., Grace, S.C., & Yamasaki, H. (2002). Plant phenolic antioxidant and prooxidant activities: Phenolics-induced oxidative damage mediated by metals in plants. *Toxicology*, *177*(1), 67-80. https://doi.org/10.1016/S0300-483X(02)00196-8
38- Seung, A.B, Taejun, H, Soon-Kil, A., Hara, K, Myung, R., Suk-Chan, L., & Kyung-Hoan, I. (2012). Effects of heavy metals on plant growths and pigment contents in *Arabidopsis thaliana .Plant Pathology of Journal*, *28*(4), 446-452.
39- Sharma, P., Jha, A.B., Dubey, R.S., & Pessarakli, M. (2012). Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidant defence mechanism in plants under stressful conditions. *Journal of Botany*, 217037. https://doi.org/10.1155/2012/217037
40- Siddique, M.N.I., & Wahid, Z.A. (2018). Achievements and perspectives of anaerobic co-digestion: A review. *Journal of Cleaner Production*, *194*, 359-371. https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2018.05.155
41- Stroinski A, & Kozlowska M. (1997). Cadmium-induced oxidative stress in potato tuber. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae*, 66, 189–195.
42- Taamalli, M., D'Alessandro, A., Marrocco, C., Gevi, F., Timperio, A.M., & Zolla, L. (2015). Proteomic and metabolic profiles of *Cakile maritima* Scop. Sea rocket grown in the presence of cadmium. *Molocloar BioSystem*, *11*, 1096-1109.
43- Wanger, G.J. (1979) Content and vacuole/extra vacuole distribution of neutral sugars, free amino acids, and anthocyanins in protoplast. *Plant Physiology*, *64*, 88-93.
44- Zhao, F.J., & Wang, P. (2020). Arsenic and cadmium accumulation in rice and mitigation strategies. *Plant Soil*, *446*, 1–21. https://doi.org/10.1007/s11104-019-04374-6

Journal of Horticultural Science
https://jhs.um.ac.ir

Research Article
Vol. 38, No. 2, Summer 2024, p. 381-392

Effect of Foliar Spray with Ferulic Acid and Nano-chitosan on some Quality Attributes, Phytochemical Compounds of Apple Fruit cv Red Delicious

S. Mostafayi[1*], M.R. Asghari[2]

1 and 2– Ph.D. Student and Professor, Horticulture Science Departement, Faculty of Agriculture, Urmia Uversity, Urmia, Iran, respectively.
(*- Corresponding Author Email: sajjad.m8597@gmail.com)

Received:	22-10-2023	**How to cite this article:**
Revised:	25-02-2024	Mostafayi, S., & Asghari, M.R. (2024). Effect of foliar spray with ferulic acid and nano-chitosan on some quality attributes, phytochemical compounds of apple fruit cv Red Delicious. *Journal of Horticultural Science*, *38*(2), 381-392. (In Persian with English abstract). https://doi.org/10.22067/jhs.2024.84985.1300
Accepted:	02-03-2024	
Available Online:	02-03-2024	

Introduction

Apple (*Malus domestica*) is considered as one of the important members of the Rosaceae family and is among the most consumed fruits in the world. One of the biggest challenges for agricultural researchers is to increase the quantity and quality of food to feed the growing population, without negatively affecting the health of the soil and agricultural ecosystems. Due to the adverse effects of chemicals on human health and environmental safety, the production of organic products has been considered as one of the most important issues in food production systems. It is utilized in various forms, including fresh fruit or processed as industrial products. Based on the respiratory and ethylene production pattern, apples are classified as climacteric fruits. Metabolic activities and ripening continue after harvest, so apples have the potential to transform into highly perishable products after harvest. Post-harvest treatments are certainly not the most suitable method for preserving the shelf life and quality of fruits during the post-harvest period. Therefore, employing new and effective methods to enhance quality, control decay, and consequently extend the post-harvest life of apples appears to be essential. Organic farming, as an agricultural system to protect human health and the environment, can improve product quality and shelf life.

Materials and Methods

This study was conducted on an apple orchard (*Malus domestica*) in Zarabad area of Khoy city located in the northwest of Iran (with the same management and growth conditions) in 2018-2019. The experiment was conducted as a factorial in the form of a completely randomized block design in 4 replications. The experimental factors included spraying fruit trees with nano-chitosan in 3 concentrations (zero, 5 and 10 ml) and ferulic acid in 3 concentrations (zero, 0.5 and 1 mM). Apple trees in three times, the first stage in the hazelnut time. Fruit drop, the second stage 20 days after the first stage and the third stage 20 days after the second stage spraying, were sprayed in the afternoon using a Cross mark PB20 manual sprayer. The harvested fruits were sprayed according to the treatments were packed and labeled and transferred to the central laboratory of horticultural sciences of Urmia University. After 24 hours of storage at the laboratory temperature, the measurement of the studied traits started on the fruits, the control treatment in this experiment was distilled water with Tween 80 (0.1/v/v).

Results and Discussion

Compared to the control group, fruits treated with a combination of chitosan and ferulic acid exhibited a significant increase in firmness after harvest. Notably, the most effective treatment involved a combination of 10

©2024 The author(s). This is an open access article distributed under Creative Commons Attribution 4.0 International License (CC BY 4.0).

https://doi.org/10.22067/jhs.2024.84985.1300

milliliters of nano-chitosan and 1 millimolar ferulic acid, resulting in the highest level of firmness among all treatments.As a result, the combined treatment of chitosan and ferulic acid can delay the aging process by reducing the activity of enzymes involved in cell wall degradation and maintain firmness in apples, contributing to a positive effect. According to the obtained results, fruits treated with nano-chitosan and ferulic acid showed a higher soluble solid content compared to the control fruits, and this amount increased with the higher concentrations of nano-chitosan and ferulic acid. The minimum level of TA was observed in the control treatment, and the highest level was observed in the treatment with 10 milliliters of chitosan and 1 millimolar ferulic acid. The treatment with 1 millimolar ferulic acid and 10 milliliters of chitosan showed the highest percentage of TA content compared to the control. The combination of nano-chitosan and ferulic acid treatment led to a reduction in fruit juice pH, with the lowest pH observed in the treatment with 1 millimolar ferulic acid and 10 milliliters of chitosan, and the highest pH observed in the control treatment. Vitamin C is the primary water-soluble antioxidant that directly reduces damage caused by free radicals. According to the obtained results, the maximum content of vitamin C was observed in the treatment with 1 millimolar ferulic acid and 10 milliliters of chitosan. According to the obtained results, the maximum PAL enzyme activity was observed in the treatment with 1 millimolar ferulic acid and 10 milliliters of chitosan.

Conclusion

In general, the findings of the current study showed that pre-harvest treatment with nano-chitosan and ferulic acid had a positive effect on the post-harvest quality of apple fruits. The fruits treated with the highest concentration of nano-chitosan and ferulic acid exhibited the highest fruit firmness, titratable acidity, vitamin C content, PAL enzyme activity, and the lowest pH compared to the control fruits. These results indicate that nano-chitosan and ferulic acid treatment can be proposed as a promising and healthy method for improving the post-harvest quality of apple fruits.

Keywords: Acidity, PAL, Pre-Harvest, Totatl-acidity

نشریه علوم باغبانی
https://jhs.um.ac.ir

مقاله پژوهشی
جلد ۳۸، شماره ۲، تابستان ۱۴۰۳، ص. ۳۹۲-۳۸۱

تأثیر محلول‌پاشی قبل از برداشت اسید فرولیک و نانوکیتوسان برخصوصیات کیفی و فیتوشیمیایی میوه سیب رقم'رد دلیشز' (*Malus domestica* cv. Red Delicious)

سجاد مصطفایی[1*]- محمد رضا اصغری[2]

تاریخ دریافت: ۱۱۴۰۲/۰۷/۳۰
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۱۲/۱۲

چکیده

سیب (*Malus domestica*) یکی از میوه‌های تجاری مهم می‌باشد که به‌دلیل الگوی تنفسی فرازگرا در پس از برداشت فسادپذیری بالایی دارد. یکی از بزرگ‌ترین چالش‌های محققان کشاورزی افزایش کمیت و کیفیت مواد غذایی است و به‌دلیل اثرات نامطلوب مواد شیمیایی بر سلامت انسان و ایمنی محیط زیست، تولید محصولات ارگانیک به‌عنوان یکی از مهم‌ترین مسائل در سیستم‌های تولید موادغذایی مورد توجه قرار گرفته است. استفاده از تیمارهای نانوکیتوسان و اسید فرولیک به‌عنوان ترکیبات سالم و طبیعی در فرایند تولید محصولات باغی می‌تواند تأثیرات بسیار مطلوبی در فرایند تولید داشته باشد. در این آزمایش که در سال ۱۳۹۸ در باغ سیب'رد دلیشز' در منطقه زرآباد شهرستان خوی واقع در شمال غرب استان آذربایجان غربی به‌منظور بهبود کیفیت میوها در زمان برداشت انجام گرفت، درختان سیب در سه مرحله با محلول نانوکیتوسان در سه غلظت (صفر، ۵ و ۱۰ میلی‌لیتر) و اسید فرولیک در سه غلظت (صفر، ۰/۵ و ۱ میلی‌مولار) به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی و در چهار تکرار مورد بررسی قرار گرفت و خصوصیات کیفی و بیوشیمیایی میوه‌ها در زمان برداشت بررسی شدند. نتایج نشان داد که تیمار با نانوکیتوسان و اسید فرولیک تأثیر معنی‌داری بر صفات اندازه‌گیری شده داشت، بیشترین میزان سفتی بافت میوه در زمان برداشت در تیمار نانوکیتوسان ۱۰ میلی‌لیتر و اسید فرولیک ۱ میلی‌مولار،کمترین میزان اسیدیته قابل تیتراسیون در شاهد، بیشترین میزان ویتامین ث و آنزیم PAL در تیمار نانوکیتوسان ۱۰ میلی‌لیتر و اسید فرولیک ۱ میلی‌مولار و بیشترین میزان pH و کمترین میزان مواد جامد محلول در شاهد مشاهده گردید.

واژه‌های کلیدی: اسیدیته، اسیدیته کل، فنیل‌آلانین‌آمونیالیاز، قبل از برداشت

مقدمه

سیب (*Malus domestica*) یکی از اعضای مهم خانواده Rosaceae از پرمصرف‌ترین میوه‌ها در جهان به‌شمار می‌رود. به‌طوری‌که به اشکال مختلف از جمله میوه تازه یا به‌صورت محصولات فرآوری شده صنعتی مصرف می‌شود (Wang *et al.*, 2007). براساس الگوی تنفسی و تولید اتیلن، سیب به‌عنوان یک میوه فرازگرا طبقه‌بندی شده و فعالیت‌های متابولیک و رسیدن آن پس‌از برداشت نیز ادامه می‌یابد، بنابراین، میوه‌های سیب بعدازبرداشت قابلیت تبدیل شدن به محصولات بسیار فاسدشدنی را دارند (Sahraei *et al.*, 2016). امروزه تقاضای زیادی برای تولید مواد غذایی سالم، سازگار با محیط زیست با کیفیت بالا و ماندگاری طولانی‌تر و بدون هیچ‌گونه مواد نگهدارنده شیمیایی وجود دارد (Saavedra *et al.*, 2016). تیمارهای پس از برداشت قطعاً مناسب‌ترین روش برای حفظ ماندگاری و کیفیت میوه در دوره پس از برداشت نیستند (Ehtesham Nia *et al.*, 2021). بنابراین، به‌کارگیری روش‌های جدید و مؤثر برای افزایش کیفیت، کنترل پوسیدگی و در نتیجه، عمر پس از برداشت میوه‌های سیب ضروری به نظر می‌رسد. تحقیقات زیادی در زمینه بهبود کیفیت میوه سیب در پس از برداشت انجام گرفته است، ولی از آنجا که مسئله کیفیت میوه فرآیندی بسیار پیچیده‌ای است، بنابراین نیازمند تحقیقات بیشتر است. در این راستا، کاربرد تیمارهای قبل از برداشت می‌تواند به‌عنوان یک جایگزین مهم برای حل مشکلات ذکر شده در نظر گرفته شود.

۱ و ۲- به‌ترتیب دانشجوی دکتری علوم باغبانی و استاد، گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران
(*- نویسندهٔ مسئول: Email: sajjad.m8597@gmail.com)

https://doi.org/10.22067/jhs.2024.84985.1300

کیتوسان[1]، به‌عنوان یک پلی‌ساکارید کاتیونی، دارای خواص غیرسمی، زیست‌فعال و ضدقارچی بوده که می‌تواند به‌صورت یک مانع نیمه‌تراوا روی سطح میوه عمل کرده و اتمسفر آن را تغییر دهد و بلوغ و پیری را در طیف وسیعی از محصولات باغبانی به تعویق بیندازد (Baswal *et al.*, 2020). با توجه به فعالیت‌های بیولوژیکی و نحوه عملکرد کیتوسان به‌عنوان یک ترکیب ضدمیکروبی نیز در نظر گرفته می‌شود و می‌تواند علیه ریزجانداران عمل کرده و به‌عنوان القاکننده مکانیسم‌های دفاعی گیاه مورد استفاده قرار گیرد (Xing *et al.*, 2020; Sofy *et al.*, 2020). از این نظر، محلول‌پاشی قبل و بعد از برداشت میوه‌ها با کیتوسان ممکن است باعث حفظ کیفیت میوه‌ها و تأخیر در پیری آن‌ها شده، بدون اینکه تأثیر مضر بر پذیرش مصرف کننده داشته باشد (Reddy *et al.*, 2000). در این راستا، ژانگ[2] و همکاران (Zhang *et al.*, 2019) گزارش کردند محلول‌پاشی کیتوسان بر روی میوه‌های کیوی[3]، باعث بهبود عملکرد و کیفیت میوه، افزایش محتوای کلسیم و سفتی، رسیدن و نرم شدن میوه شده و پوسیدگی را به تأخیر انداخته و قابلیت نگهداری را افزایش می‌دهد. همچنین گزارش شده محلول‌پاشی کیتوسان باعث بهبود وزن و اندازه میوه در انبه[4] (Zagzog *et al.*, 2017) و طول عمر نگهداری انگور[5] (Ehtesham Nia *et al.*, 2021) گردیده است. اسیدفرولیک[6] در گیاهان از هیدروکسی سینامیک اسید مشتق شده و یک محصول واسطه‌ای در مسیر فنیل‌پروپانوئید است و فواید بی‌شمار آن برای سلامت انسان نشان داده شده است (Navarrete *et al.*, 2015; Ma *et al.*, 2010). اسید فرولیک، به‌عنوان یک اسیدفنولیک طبیعی در گیاهان به‌وفور یافت می‌شود، معمولاً در دیواره‌های سلولی متصل به پلی‌ساکاریدها و پروتئین‌های اسکلت‌سلولی یافت می‌شود (Mathew & Abraham, 2006). به‌دلیل عملکردهای بیولوژیکی خود که شامل فعالیت‌های ضداشعه ماوراء بنفش، ضداکسیداتیو و ضدسرطان و از بین بردن رادیکال‌های آزاد است که در محصولات بهداشتی، آرایشی و بهداشتی و پزشکی استفاده می‌شود (Lillioja *et al.*, 2013; Vinayagam *et al.*, 2016). در مطالعه فروز[7] و همکاران (Ferruz *et al.*, 2016) روی گونه‌های قارچ *فوزاریوم* در محیط آزمایشگاهی نشان داد تیمار با اسید فرولیک به‌طور قابل توجهی رشد پاتوژن را مهار کرده و بیوسنتز سم را کاهش می‌دهد. اثر مشابهی توسط فروکیو[8] و همکاران (Ferrochio *et al.*, 2013) مشاهده شد و یافته‌های او در ذرت تأیید کرد که اسید فرولیک می‌تواند به‌طور مؤثری رشد پاتوژن را مهار کرده و تولید سم را کاهش دهد. بااین‌حال، اطلاعات در مورد استفاده و تأثیر محلول‌پاشی قبل از برداشت اسید فرولیک بر کیفیت میوه تولیدی هنوز به‌طور قابل توجهی گزارش نشده است. بنابراین، مطالعه حاضر با هدف بررسی تأثیر کاربرد قبل از برداشت نانوکیتوسان و اسید فرولیک به‌طور جداگانه و به‌صورت ترکیبی در چند مرحله بر خصوصیات کیفی و بیوشیمیایی میوه سیب در زمان برداشت انجام گرفت.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی و تیمارهای آزمایشی

این مطالعه بر روی باغ سیب (*Malus domestica*) در منطقه زرآباد شهرستان خوی واقع در شمال غرب ایران (با شرایط مدیریتی و رشدی یکسان) در سال‌های ۱۳۹۸- ۱۳۹۹ انجام گرفت. آزمایش به صورت فاکتوریل در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی در چهار تکرار انجام گرفت. فاکتورهای آزمایشی شامل محلول‌پاشی درختان میوه با نانوکیتوسان در سه غلظت (صفر، ۵ و ۱۰ میلی‌لیتر) و اسید فرولیک در سه غلظت (صفر، ۰/۵ و ۱ میلی‌مولار) بود. درختان سیب در سه زمان، مرحله اول در زمان فندقی شدن قطرمیوه، مرحله دوم ۲۰ روز پس از مرحله اول و مرحله سوم ۲۰ روز بعد از محلول‌پاشی مرحله دوم، در ساعات بعد از ظهر با استفاده از سمپاش دستی مدل کراس مارک PB20 محلول‌پاشی شدند. میوه‌های برداشت شده با توجه به تیمارهای انجام شده بسته‌بندی و اتیکت‌زنی شده و به آزمایشگاه مرکزی علوم باغبانی دانشگاه ارومیه منتقل شدند و پس از ۲۴ ساعت نگهداری در دمای آزمایشگاه اندازه‌گیری صفات مورد مطالعه بر روی میوه‌ها شروع شد، شاهد در این آزمایش آب مقطر همراه با (۰/۱v/v) توین ۸۰ بود.

اندازه‌گیری خصوصیات کیفی و بیوشیمیایی

به‌منظور تعیین سفتی بافت میوه از دستگاه اندازه‌گیری سفتی (Model Fruit Texture Analyzer, USA) با پروب با قطر شش میلی‌متر استفاده شد. جهت اندازه‌گیری مواد جامد محلول (TSS)، ۵۰ میکرولیتر از عصاره نمونه با استفاده از دستگاه رفراکتومتر دستی مدل (AZ 8601) در دمای آزمایشگاه اندازه‌گیری شد، برای کالیبره کردن این دستگاه از آب مقطر استفاده گردید (Magne *et al.*, 2006). برای اندازه‌گیری اسیدیته قابل تیتراسیون (TA) از روش تیتراسیون با سود

1- Chitosan
2- Zhang
3- *Actinidia deliciosa* cv. ‘Guichang
4- *Mangifera indica* L.
5- *Vitis vinifera* L. cv. Yaghouti’
6- Ferulic Acid
7- Ferruz
8- Ferrochio

۰/۱ نرمال استفاده شد و مقدار اسیدیته قابل تیتراسیون از معادله زیر محاسبه گردید (Bellincontro *et al.*, 2004).

TA = S×N×F×E/C×100

که در این معادله، TA: مقدار اسیدیته بر اساس میلی‌گرم اسیدمالیک در ۱۰۰ میلی‌لیتر عصاره نمونه، S: مقدار NaOH مصرف شده (میلی‌لیتر)، N: نرمالیته NaOH، F: فاکتور NaOH، E: اکی والان اسید مورد نظر (ایزوسیتریک) و C: مقدار عصاره میوه (میلی‌لیتر) می‌باشد و در نهایت، برای اندازه‌گیری pH آب‌میوه از یک pH متر (pH-Meter CG 824، SCHOTT، Hofheim، آلمان) استفاده شد.

ویتامین ث

برای اندازه‌گیری ویتامین ث عصاره میوه از روش تیتراسیون با محلول ان- بروموسوکسینامید استفاده شد. مقدار پنج میلی‌لیتر عصاره میوه، به همراه پنج میلی‌لیتر محلول پایدارکننده (Trichloroacetic acid) TCA و شش میلی‌لیتر آب مقطر و یک میلی‌لیتر یدید پتاسیم چهار درصد و ۰/۳ میلی‌لیتر اسید استیک ۱۰ درصد و ۰/۴ میلی‌لیتر معرف نشاسته یک درصد به‌وسیلهٔ محلول NBS با غلظت چهار میلی گرم در لیتر تا رسیدن به رنگ آبی تیتر شد و ویتامین‌ث عصاره برحسب میلی‌گرم در ۱۰۰ میلی‌گرم گزارش شد (Egan *et al.*, 1981).

فعالیت آنزیم PAL

مقدار دو گرم بافت میوه با دو میلی‌لیتر بافر استخراج (۵۰ میلی‌مولار Tris-HCl با اسیدیته ۸/۵) حاوی ۱۵ میلی‌مولار بتا-مرکاپتو اتانول همگن شد. سپس به‌مدت پنج دقیقه با نیروی ۴۰۰۰ دور در دمای چهار درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شد. در نهایت، برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیم PAL از محلول رویی به‌عنوان عصاره آنزیمی استفاده شد. برای تخمین فعالیت آنزیم، یک میلی‌لیتر محلول واکنش شامل بافر واکنش (۵۰۰ میکرومولار Tris-HCl با اسیدیته هشت) حاوی شش میکرومول فنیل‌آلانین و ۱۰۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی در حجم نهایی یک میلی‌لیتر تهیه شد. سپس به‌مدت ۶۰ دقیقه در دمای ۴۰ درجه سانتی گراد قرار گرفت. در نهایت، به این محلول مقدار ۵۰ میکرولیتر اسید کلریدریک با غلظت پنج نرمال اضافه شد تا واکنش تولید سینامیک اسید از فنیل‌آلانین متوقف شود. در پایان، فعالیت آنزیم در طول موج ۲۹۰ نانومتر بر اساس میزان تولید سینامیک اسید برحسب میکرومول بر دقیقه گزارش گردید (Beaudoin-Eagan & Thorpe, 1985).

آنالیز آماری

داده‌های به‌دست آمده از سنجش پارامترهای مختلف با چهار تکرار به‌صورت آزمایش فاکتوریل و بر پایه طرح بلوک‌های کامل تصادفی، توسط نرم‌افزار (SAS, version (9.2 و آزمون چنددامنه‌ای دانکن مورد بررسی قرار گرفتند. تجزیه واریانس‌ها نیز با ضریب اطمینان ۹۵ درصد ($p \leq 0.05$) انجام شد (جدول ۱) و نمودارها با استفاده از نرم‌افزار Excelرسم شدند.

جدول ۱ـ تجزیه واریانس خصوصیات فیتوشیمیایی و بیوشیمیایی اندازه‌گیری شده میوه تحت تأثیر تیمار نانوکیتوسان و اسید فرولیک در سیب رقم ’رد دلیشز‘

Table 1- ANOVA for the phytochemical and biochemical properties measured of fruit under the influence of chitosan nanoparticle and ferulic acid treatment on apple cv. Red Delicious.

منابع تغییرات S.O.V	درجه آزادی df	میانگین مربعات Mean squares فعالیت آنزیم PAL PAL enzayme activity	اسیدیته PH	ویتامین ث Vitamin C	اسیدیته کل TA	قند محلول Tss	سفتی Firmnes
بلوک Block	3	6.080 ns	0.112 ns	2.142 ns	.137 ns	185.42 ns	.143 ns
نانوکیتوسان Nano chitosan (A)	2	253.959*	3.237*	730.971*	10.508*	1067.111*	0.947*
فرولیک اسید FerulicAcid (B)	2	149.478**	4.507*	58.685*	0.921*	453.777*	0.727*
A×B	4	86.857*	2.073*	40.758*	0.366*	99.611 ns	0.602*
خطا Error	24	3.691	0.085	1.085	0.076	66.768	0.069
ضریب تغییرات C.V(٪)		11.03	8.62	4.04	10.12	7.37	3.45

ns، * و **: به‌ترتیب عدم معنی‌داری، معنی‌داری در سطح پنج و یک درصد.

ns, ** and *: non-significant, significant at p≤0.01 and p≤0.05, respectively

نتایج و بحث

سفتی میوه

سفتی میوه یکی از مهم‌ترین فاکتورها در تعیین کیفیت و عمر پس از برداشت آن می‌باشد(Kirmani *et al.*, 2013). به‌طور کلی، سفتی میوه پس از برداشت در میوه‌های تیمار شده با کیتوسان و اسید فرولیک در مقایسه با شاهد به‌طور قابل توجهی افزایش یافت. بااین‌حال، میوه های تیمارشده با نانوکیتوسان ۱۰ میلی‌لیتر و اسید فرولیک یک میلی‌مولار سفتی میوه بالاتری نسبت به بقیه تیمارها نشان دادند (شکل ۱). میزان نرم شدن میوه به‌طور مستقیم با سرعت شکسته شدن ترکیبات پکتینی از طریق فعالیت آنزیم‌های پکتین‌متیل‌استراز (PME) و پلی‌گالاکتوروناز (PG) در طول رسیدن مرتبط است (Paniagua *et al.*, 2014). تأثیر مثبت کیتوسان قبل از برداشت بر استحکام میوه می‌تواند به‌دلیل تشکیل یک لایه کیتوسان بر روی میوه باشد که به عنوان مانعی برای جذب O_2 عمل کرده و در نتیجه، فعالیت متابولیک از جمله فعالیت آنزیم‌های تخریب‌کننده دیواره‌سلولی را کاهش داده و فرآیند رسیدن را کاهش دهد (Reddy *et al.*, 2000). در راستای نتایج این تحقیق، کاسمه سیلوا[1] و همکاران (Cosme Silva *et al.*,2017) در انبه و لی و یو[2] (Li and Yu, 2001) در هلو افزایش استحکام میوه را پس از محلول‌پاشی با کیتوسان گزارش کردند. علاوه‌براین، ردی و همکاران (Reddy *et al.*, 2000) اثر مفید اسپری قبل از برداشت کیتوسان را بر سفتی گوشت توت‌فرنگی گزارش کردند. علاوه‌براین، آن‌ها دریافتند که سفتی میوه با افزایش غلظت کیتوسان ارتباط دارد. مطابق با همین رفتار کیتوسان، افزایش سفتی میوه در اثر تیمار با اسید فرولیک در ذغال اخته (Xu & Liu, 2017) و میوهای تازه برش سیب (Alves *et al.*, 2017) گزارش شده است. در نتیجه، تیمار ترکیبی کیتوسان و اسید فرولیک می‌توانند با کاهش فعالیت آنزیم‌هایی که در تخریب دیواره‌سلولی نقش دارند، روند پیری را به تأخیر انداخته و با حفظ سفتی در سیب تأثیر مثبت بگذارند.

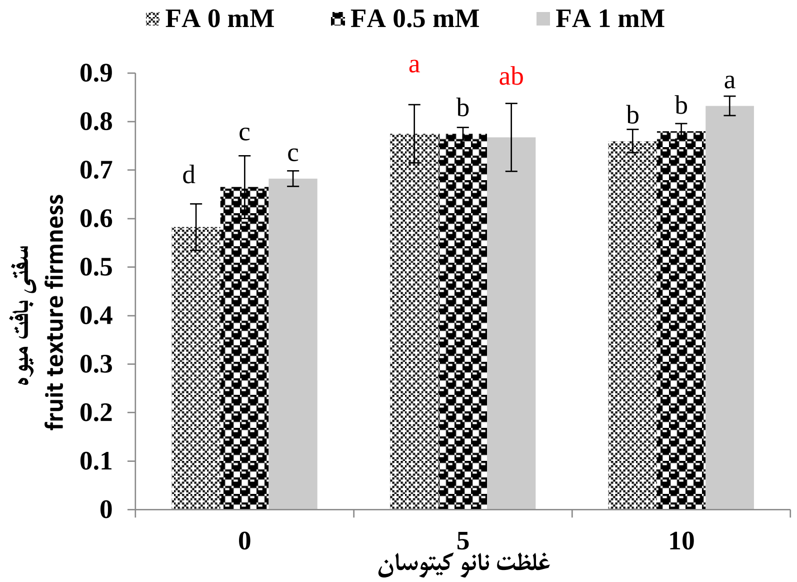
مواد جامد محلول

طبق نتایج به‌دست آمده میوه‌های تیمار شده با نانوکیتوسان و اسیدفرولیک، محتوای مواد جامد محلول بالاتری را نسبت به میوه‌های شاهد نشان دادند، به‌طوری‌که این میزان با افزایش غلظت نانوکیتوسان و اسید فرولیک بیشتر بود. همچنین در تیمار قبل از برداشت میوه‌ها با اسید فرولیک بین تیمار نیم میلی‌مولار اسید فرولیک و شاهد اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد (شکل ۲). گزارش شده است که کاربرد قبل از برداشت کیتوسان، با کاهش روند پیری از طریق کاهش تولید و اثر اتیلن، کاهش تنفس باعث حفظ دیواره‌سلولی شده که در نهایت، منجر به حفظ بهتر قندهای محلول می‌شود (Ehtesham Nia *et al.*, 2021). افزایش درصد قندهای‌محلول در طول دوره نگهداری احتمالاً به‌دلیل افزایش فعالیت آنزیم‌های مسئول هیدرولیز نشاسته به قندهای‌محلول است و می‌تواند ناشی از کاهش میزان کربوهیدرات‌ها، پکتین‌ها، هیدرولیز نسبی پروتئین و تجزیه گلیکوزیدها به زیر واحدها در طول تنفس باشد (Abbasi *et al.*, 2009; Aranzana *et al.*, 2011) که کی و وانگمتا[3] (Ke & Wongmetha, 2012) گزارش کردند که کیتوسان هیچ تأثیری بر مقدار قندهای‌محلول میوه‌های انبه ندارد. پاسخ مشابهی نیز در توت‌فرنگی[4] گزارش شده است (Hernández-Muñoz *et al.*, 2008). در انبه و موز تیمار شده با کیتوسان (Kittur *et al.*, 2001) محتوای قند محلول در مقایسه با میوه‌های شاهد کمتر بود، درحالی‌که مقادیر بالاتری برای هلوهای تیمار شده مشاهده شد (Srinivasa *et al.*, 2002).

اسیدیته قابل تیتراسیون (TA)

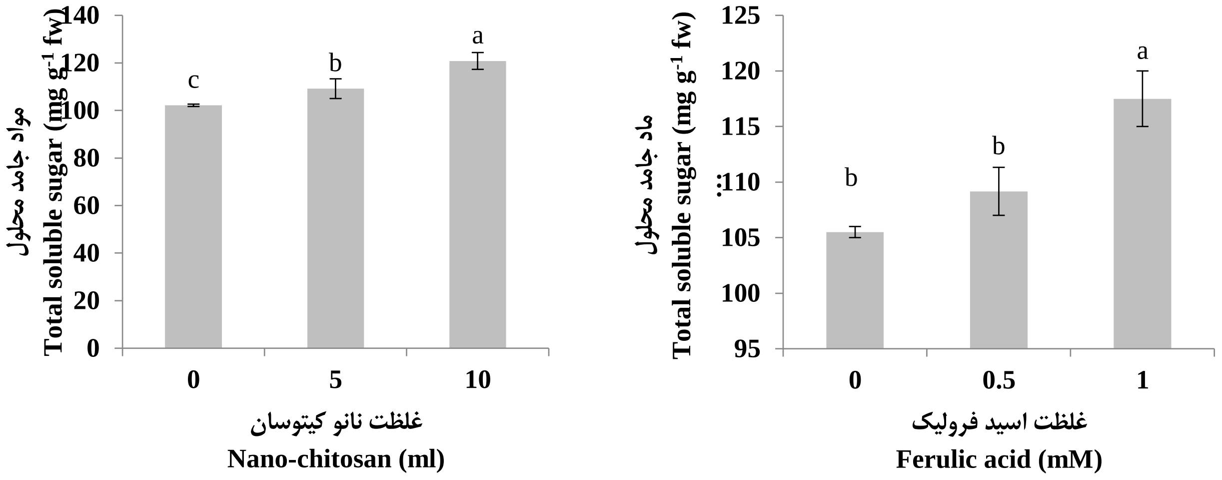
طبق نتایج به‌دست آمده حداقل میزان TA در شاهد و بیشترین میزان در تیمار کیتوسان ۱۰ میلی‌لیتر و اسید فرولیک ۱ میلی‌مولار مشاهده شد. تیمار ۱ میلی‌مولار اسید فرولیک و ۱۰ میلی‌لیتر کیتوسان بالاترین درصد محتوای TA را در مقایسه با شاهد نشان داد که اختلاف معنی‌داری با تیمار نیم میلی‌مولار اسید فرولیک و پنج میلی‌لیتر کیتوسان نداشت (شکل ۳). در فرآیند پس از برداشت، از قندها و اسیدهای آلی به‌عنوان سوبسترای اصلی در فرآیند متابولیک استفاده می‌شود. به‌طوری‌که اسیدیته قابل تیتراسیون معمولاً در طول نگهداری کاهش می‌یابد و حداکثر کاهش نشان‌دهنده پیری می‌باشد. پوشش‌های خوراکی یک لایه نازک بر روی سطوح میوه تشکیل می‌دهند که می‌تواند تبادل گاز و سرعت تنفس میوه را کاهش دهد (Cosme Silva *et al.*, 2017). نتایج مشاهده شده در این مطالعه می‌تواند به دلیل کاهش تغییرات متابولیک اسیدهای آلی به دی‌اکسیدکربن و آب، کاهش سرعت تنفس و در نتیجه، حفظ میزان بالاتر اسیدها باشد. تنفس یک فرآیند آنزیمی است و آنزیم‌های دخیل در تنفس از اسیدهای آلی به‌عنوان سوبسترا استفاده می‌کنند (Yaman & Bayoındırlı, 2002). نتایج گزارش شده در این مطالعه با نتایج به‌دست آمده توسط گوتام[5] و همکاران (Goutam *et al.*, 2010) در مورد گواوا مطابقت دارد.

1- Cosme Silva
2- Li and Yu
3- Wongmetha and Ke
4- *Fragaria*× *ananassa*
5- Goutam



شکل ۱- اثر متقابل نانوکیتوسان × اسید فرولیک بر میزان سفتی میوه سیب رقم ٬ردلیشر٬

Figure 1- The interaction effect of chitosan nanoparticle ×ferulic acid on the fruit firmness of apple cv. Red Delicious. (DMRT, *p≤0.05*)

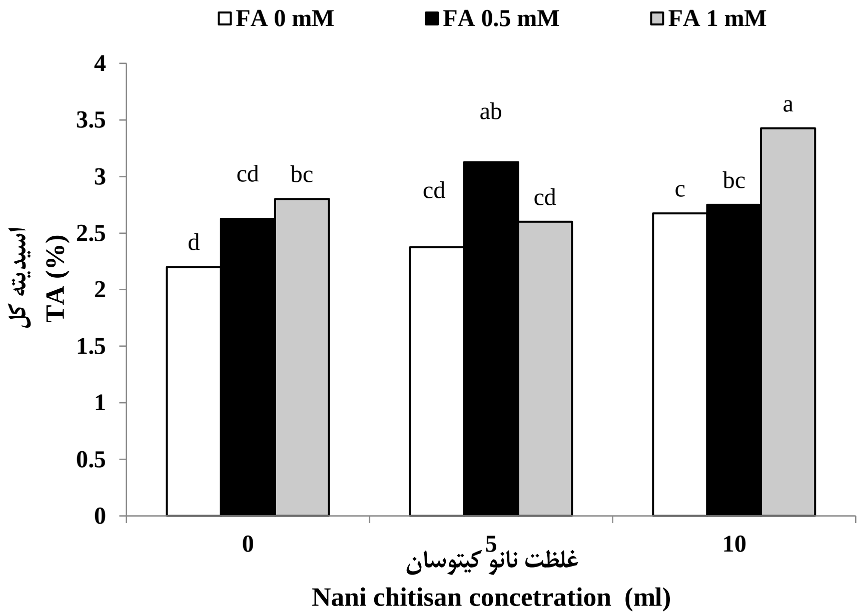


شکل ۲- اثر متقابل نانوکیتوسان × اسید فرولیک بر میزان مواد جامد محلول میوه سیب رقم ٬ردلیشر٬

Figure 2- The interaction effect of chitosan nanoparticle ×ferulic acid on the fruit total soluble sugar content of apple cv. Red Delicious. (DMRT, *p≤0.05*)

pH

طبق نتایج اثر متقابل غلظت‌های مختلف نانوکیتوسان و اسید فرولیک بر pH آب‌میوه معنی‌دار بود. ترکیب تیمار نانوکیتوسان و اسید فرولیک باعث کاهش pH آب‌میوه گردید به‌طوری‌که کمترین pH در تیمار ۱ میلی‌مولار اسید فرولیک و ۱۰ میلی‌لیتر کیتوسان و بیشترین آن در شاهد مشاهده گردید. همچنین به‌جز تیمار ۱ میلی‌مولار اسید فرولیک و ۱۰ میلی‌لیتر کیتوسان با شاهد، اختلاف بقیه تیمارها معنی‌دار نبود (شکل ۴). pH آب‌میوه یکی از مهم‌ترین پارامترهای کیفی است به‌طوری‌که با اسیدیته قابل تیتراسیون و اسید آسکوربیک رابطه غیرمستقیم دارد.



شکل ۳- اثر متقابل نانوکیتوسان × اسید فرولیک بر میزان اسیدیته قابل تیتراسیون میوه سیب رقم 'رددلیشز'

Figure 3- The interaction effect of chitosan nanoparticle ×ferulic acid on the fruit titratable acidity of apple cv. Red Delicious. (DMRT, *p≤0.05*)

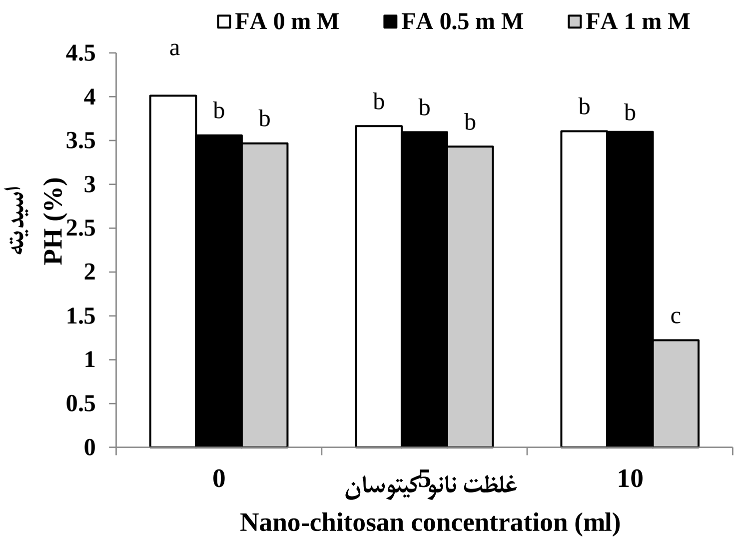
افزایش اسیدیته قابل تیتراسیون میوه‌ها باعث کاهش pH همان میوه می‌شود. شرایط بیوشیمیایی میوه با استفاده از کیتوسان تغییر می‌کند و با ایجاد مانعی برای عبور اکسیژن، سرعت تنفس و فرآیندهای متابولیک را کاهش می‌دهد که دلیلی واقعی برای تغییر pH است (Sheikh *et al.*, 2017). از طرف دیگر، اسید فرولیک یکی از فراوان‌ترین اسیدهای‌فنولیک در گیاهان است که به‌عنوان یک عامل اتصال‌دهنده دیواره‌سلولی عمل می‌کند (He *et al.*, 2019). یافته‌های امران[1] و همکاران (Imran *et al.*, 2000) نیز نتایج ما را تأیید می‌کند که جلوگیری از هیدرولیز پکتین و افزایش اسیدهای‌آزاد منجر به کاهش pH می‌شود. علاوه‌براین، دلیل افزایش pH میوه در زمان نگهداری، افزایش سرعت تنفس و به دنبال آن افزایش فرآیندهای کاتابولیک مختلف گزارش شده است که منجر به تجزیه اسیدهای آلی می‌شود (Kelebek *et al.*, 2008).

ویتامین ث

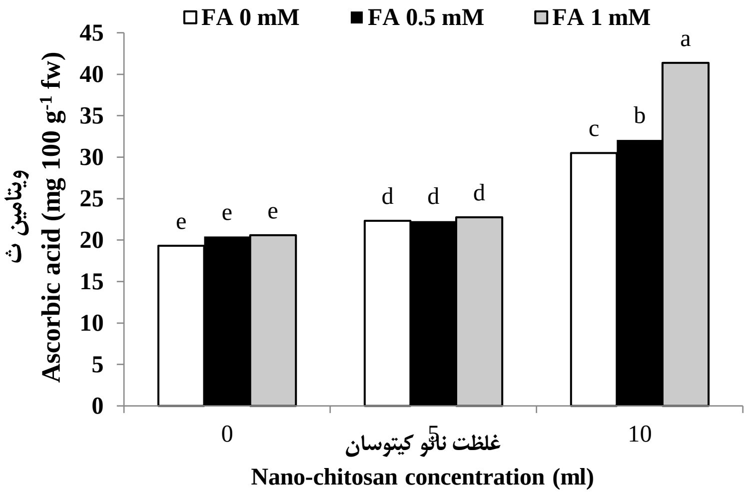
ویتامین ث اصلی‌ترین آنتی‌اکسیدان محلول در آب است که به‌طور مستقیم آسیب‌های ناشی از رادیکال‌های آزاد را کاهش می‌دهد. بر اساس نتایج به‌دست آمده حداکثر محتوای ویتامین ث در تیمار ۱ میلی‌مولار اسید فرولیک و ۱۰ میلی‌لیتر کیتوسان مشاهده شد، درحالی‌که کمترین مقدار در شاهد مشاهده گردید که اختلاف معنی‌داری با تیمارهای نیم میلی‌مولار اسید فرولیک و یک میلی‌مولار اسید فرولیک نداشت (شکل ۵). اسید آسکوربیک رابطه مستقیمی با اسیدیته دارد، درحالی‌که نسبت به سطح pH رابطه آن معکوس است. سطح اسید آسکوربیک (ویتامین ث) با رسیدن میوه به‌دلیل اثر مستقیم آنزیم آسکوربیک‌اسیداکسیداز (آسکوربیناز)، اکسیداسیون و به دنبال آن تبدیل اسید آسکوربیک به ۲، ۳- دی‌کتوگولونیک اسید کاهش می‌یابد (Chitarra, 2005) و ساجید[2] و همکاران (Sajid *et al.*, 2020) تخریب تأخیری ویتامین ث را در میوه‌های هلو (*Prunus persica* L.) تیمار شده با کیتوسان را گزارش کردند. عبور پایین سطح اکسیژن منجر به کاهش فعالیت آسکوربیناز شده است که از اکسیداسیون اسید آسکوربیک جلوگیری می‌کند (Dang *et al.*, 2010). مطابق با نتایج این تحقیق، سطح بالایی از اسید آسکوربیک در نتیجه کاربرد کیتوسان در توت‌فرنگی یافت شد (Wang & Gao, 2013). نتایج این مطالعه نشان داد که محتوای ویتامین ث زمانی افزایش می‌یابد که تیمارهایی ترکیب نانوکیتوسان و اسید فرولیک در غلظت‌های بالا به‌کار برده شوند که احتمالاً به دلیل استحکام دیواره سلولی و القای اتمسفر تغییر یافته در نتیجه کاربرد این دو ترکیب باشد.

1- Imran

2- Sajid



شکل ٤- اثر متقابل نانوکیتوسان × اسید فرولیک بر میزان pH میوه سیب رقم رددلیشز
Figure 4- The interaction effect of chitosan nanoparticle ×ferulic acid on fruit pH of apple cv. Red Delicious. (DMRT, *p≤0.05*)

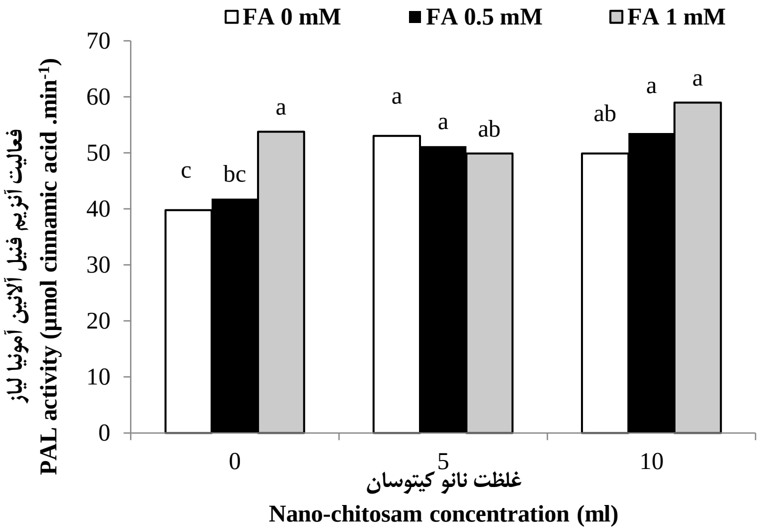


شکل ٥- اثر متقابل نانوکیتوسان × اسید فرولیک بر میزان ویتامین ث میوه سیب رقم رددلیشز
Figure 5- The interaction effect of chitosan nanoparticle ×ferulic acid on the vitamin C content of apple cv. Red Delicious. (DMRT, *p≤0.05*).

فعالیت آنزیم PAL

بر اساس نتایج بدست آمده حداکثر فعالیت آنزیم PAL در تیمار ۱ میلی‌مولار اسید فرولیک و ۱۰ میلی‌لیتر کیتوسان مشاهده شد و به جز شاهد و اسید فرولیک نیم میلی‌مولار اختلاف معنی‌داری با بقیه تیمارها نداشت (شکل ۶). مطالعات کمی در مورد تأثیر کاربرد بیرونی اسید فرولیک بر فعالیت آنزیم PAL انجام شده است و نتایج متناقض هستند. ساتو[1] و همکاران (Sato *et al.*, 1982) نشان داد که کاربرد اسید فرولیک در برابر فعالیت PAL در سیب‌زمینی شیرین بی‌اثر است. در واقع، کیتوسان به‌عنوان یک محرک، می‌تواند فعالیت آنزیم‌های PAL را که در بیوسنتز پلی‌فنل‌ها و کوتیکول نقش دارند، فعال کند (Orzali *et al.*, 2014)؛ در مطالعه حاضر، فعالیت آنزیم PAL به‌طور قابل توجهی با افزایش غلظت نانوکیتوسان و اسید فرولیک افزایش نشان داد.

1- Sato



شکل ٦- اثر متقابل نانوکیتوسان ×اسید فرولیک بر میزان فعالیت آنزیم PAL میوه سیب رقم رُددلیشز.

Figure 6- The interaction effect of chitosan nanoparticle ×ferulic acid on fruit PAL enzyme activity of apple cv. Red Delicious. (DMRT, $p\leq 0.05$)

نتیجه‌گیری

یافته‌های مطالعه حاضر نشان داد که تیمار قبل از برداشت نانوکیتوسان و اسید فرولیک بر کیفیت میوه‌های سیب در زمان برداشت تأثیر مثبتی داشتند. میوه‌های تیمار شده با بالاترین غلظت نانوکیتوسان و اسید فرولیک، بیشترین سفتی میوه، اسیدیته قابل تیتراسیون، ویتامین ث، فعالیت آنزیم PAL و کمترین میزان pH را در مقایسه با میوه شاهد در زمان برداشت را نشان دادند. این نتایج نشان می‌دهد که تیمار نانوکیتوسان و اسید فرولیک می‌تواند به‌عنوان روشی سالم و امیدوارکننده جهت بهبود کیفیت میوه‌های سیب در زمان برداشت میوه پیشنهاد شود.

References

1- Abbasi, N.A., Iqbal, Z., Maqbool, M., & Hafiz, I.A. (2009). Postharvest quality of mango (*Mangifera indica* L.) fruit as affected by chitosan coating. *Pakistan Journal of Botany*, *41*(1), 343-357.
2- Alves, M.M., Gonçalves, M.P., & Rocha, C.M. (2017). Effect of ferulic acid on the performance of soy protein isolate-based edible coatings applied to fresh-cut apples. *Food Science and Technology*, *80*, 409-415. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.03.013
3- Aranzana, M.J., Abbassi, E.K., Howad, W., & Arús, P. (2010). Genetic variation, population structure and linkage disequilibrium in peach commercial varieties. *BMC Genetics*, *11*, 1-11. https://doi.org/10.1186/1471-2156-11-69
4- Baswal, A.K., Dhaliwal, H.S., Singh, Z., Mahajan, B.V.C., Kalia, A., & Gill, K.S. (2020). Influence of carboxy methylcellulose, chitosan and beeswax coatings on cold storage life and quality of Kinnow mandarin fruit. *Scientia Horticulturae*, *260*, 108-887. https://doi.org/10.1016/j.scienta.2019.108887
5- Beaudoin-Eagan, L.D. & Thorpe, T.A. (1985). Tyrosine and phenylalanine ammonialyase activities during shoot initiation in tobacco callus cultures. *Plant Physiology*, *78*(3), 438-441. https://doi.org/10.1104
6- Bellincontro, A., De Santis, D., Botondi, R., Villa, I., & Mencarelli, F. (2004). Different postharvest dehydration rates affect quality characteristics and volatile compounds of Malvasia, Trebbiano and Sangiovese grapes for wine production. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *84*(13), 1791-1800. https://doi.org/10.1002/JSFA.1889
7- Chitarra, M.I.F., & Chitarra, A.B. (2005). Post-harvest of fruits and vegetables, Physiology and Handling. 2nd Edition, FAEPE, Lavras, Lavras, 785 p.
8- Cosme Silva, G.M.C., Silva, W.B., Medeiros, D.B., Salvador, A.R., Cordeiro, M.H.M., da Silva, N.M., & Mizobutsi, G.P. (2017). The chitosan affects severely the carbon metabolism in mango *(Mangifera indica* L. cv. Palmer) fruit during storage. *Food Chemistry*, *237*, 372-378. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.05.123
9- Dang, Q.F., Yan, J.Q., Li, Y., Cheng, X.J., Liu, C.S., & Chen, X.G. (2010). Chitosan acetate as an active coating material and its effects on the storing of *Prunus avium* L. *Journal Food Science*, *75*(2), S125-S131. https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2009.01483.x

10- Sahraei Khosh Gardesh, A.S.K., Badii, F., Hashemi, M., Ardakani, A.Y., Maftoonazad, N., & Gorji, A.M. (2016). Effect of nanochitosan based coating on climacteric behavior and postharvest shelf-life extension of apple cv. Golab Kohanz. *Food Science and Technology*, *70*, 33-40. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.02.002
11- Shazly, S.M., Eisa A.M., Moatamed, A.M.H., & Kotb, H.R.M. (2013). Effect of some agrochemical pre harvest foliar application on yield and physiology molecular biology plants quality of Swelling peach trees. *Alexander Journal of Agriculture Research*, *58*(3), 219-229.
12- Egan, H., Kirk, R.S., & Sawyer, R. (1981). Pearson's chemical analysis of food 8th Edt. Churchill livingstone, medical division of longman group Ltd. *Great Britain*, 591.
13- Ferrochio, L., Cendoya, E., Farnochi, M.C., Massad, W., & Ramirez, M.L. (2013). Evaluation of ability of ferulic acid to control growth and fumonisin production of *Fusarium verticillioides* and *Fusarium proliferatum* on maize based media. *International Journal of Food Microbiology*, *167*(2), 215-220. https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.09.005
14- Ferruz, E., Atanasova-Pénichon, V., Bonnin-Verdal, M.N., Marchegay, G., Pinson-Gadais, L., Ducos, C., Lorán, S., Ariño, A., Barreau, C., & Richard-Forget, F. (2016). Effects of phenolic acids on the growth and production of T-2 and HT-2 toxins by *Fusarium langsethiae* and F. sporotrichioides. *Molecules*, *21*(4), p.449. https://doi.org/10.3390/molecules21040449
15- Goutam, M., Dhaliwal, H.S., & Mahajan, B. (2010). Effect of pre-harvest calcium sprays on post-harvest life of winter guava (*Psidium guajava* L.). *Journal of Food Science and Technology*, *47*, 501-506. https://doi.org/10.1007/s13197-010-0085-2
16- He, J., Ma, L., Wang, D., Zhang, M., & Zhou, H. (2019). Ferulic acid treatment reinforces the resistance of postharvest apple fruit during gray mold infection. *Journal of Plant Pathology*, *101*, 503-511. https://doi.org/10.1007/s42161-018-00223-0
17- Hernandez-Munoz, P., Almenar, E., Del Valle, V., Velez, D., & Gavara, R. (2008). Effect of chitosan coating combined with postharvest calcium treatment on strawberry (*Fragaria× ananassa*) quality during refrigerated storage. *Food Chemistry*, *110*(2), 428-435. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.02.020
18- Imran, A., Rafiullah, K., & Muhammad, A. (2000). Effect of added sugar at various concentration on the storage stability of guava pulp. *Sarhad Journal of Agriculture*, *16*(1), 89-93.
19- Kelebek, H., Canbas, A., & Selli, S. (2008). Determination of phenolic composition and antioxidant capacity of blood orange juices obtained from cvs. Moro and Sanguinello (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) grown in Turkey. *Food Chemistry*, *107*(4), 1710-1716. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.10.004
20- Kirmani, S.N., Wani, G.M., Wani, M.S., Ghani, M.Y., Abid, M., Muzamil, S., Raja, H., & Malik, A.R. (2013). Effect of preharvest application of calcium chloride ($CaCl_2$), gibberlic acid (GA_3) and napthelenic acetic acid (NAA) on storage of plum (*Prunus salicina* L.), cv. Santa Rosa, under ambient storage conditions. *African Journal of Agricultural Research*, *8*(9), 812-818. https://doi.org/10.5897/AJAR12.1708
21- Kittur, F.S., Saroja, N., & Tharanathan, R. (2001). Polysaccharide-based composite coating formulations for shelf-life extension of fresh banana and mango. *European Food Research and Technology*, *213*(4), 306-311. https://doi.org/10.1007/s002170100363
22- Lillioja, S., Neal, A.L., Tapsell, L., & Jacobs Jr, D.R. (2013). Whole grains, type 2 diabetes, coronary heart disease, and hypertension: Links to the aleurone preferred over indigestible fiber. *Biofactors*, *39*(3), 242-258. https://doi.org/10.1002/biof.1077
23- Li, H., & Yu, T. (2001). Effect of chitosan on incidence of brown rot, quality and physiological attributes of postharvest peach fruit. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *81*(2), 269-274.
24- Ma, Z.C., Hong, Q., Wang, Y.G., Tan, H.L., Xiao, C.R., Liang, Q.D., Cai, S.H., & Gao, Y. (2010). Ferulic acid attenuates adhesion molecule expression in gamma-radiated human umbilical vascular endothelial cells. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, *33*(5), 752-758.
25- Magné, C., Saladin, G., & Clément, C. (2006). Transient effect of the herbicide flazasulfuron on carbohydrate physiology in *Vitis vinifera* L. *Chemosphere*, *62*(4), 650-657. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2005.04.119
26- Mathew, S., & Abraham, T.E. (2006). Bioconversions of ferulic acid, an hydroxycinnamic acid. *Critical Reviews in Microbiology*, *32*(3), 115-125. https://doi.org/10.1080/10408410600709628
27- Navarrete, S., Alarcón, M., & Palomo, I. (2015). Aqueous extract of tomato (*Solanum lycopersicum* L.) and ferulic acid reduce the expression of TNF-α and IL-1β in LPS-activated macrophages. *Molecules*, *20*(8), 15319-15329. https://doi.org/10.3390/molecules200815319
28- Nia, A.E., Taghipour, S., & Siahmansour, S. (2021). Pre-harvest application of chitosan and postharvest *Aloe vera* gel coating enhances quality of table grape (*Vitis vinifera* L. cv.'Yaghouti') during postharvest period. *Food Chemistry*, *347*, 129012. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.129012

29- Orzali, L., Forni, C.I.N.Z.I.A., & Riccioni, L. (2014). Effect of chitosan seed treatment as elicitor of resistance to *Fusarium graminearum* in wheat. *Seed Science and Technology*, *42*(2), 132-149. https://doi.org/10.15258/sst.2014.42.2.03

30- Paniagua, C., Posé, S., Morris, V.J., Kirby, A.R., Quesada, M.A., & Mercado, J.A. (2014). Fruit softening and pectin disassembly: An overview of nano structural pectin modifications assessed by atomic force microscopy. *Annals of Botany*, *114*(6), 1375-1383. https://doi.org/10.1093/aob/mcu149

31- Reddy, M.B., Belkacemi, K., Corcuff, R., Castaigne, F., & Arul, J. (2000). Effect of pre-harvest chitosan sprays on post-harvest infection by *Botrytis cinerea* and quality of strawberry fruit. *Postharvest Biology and Technology*, *20*(1), 39-51. https://doi.org/10.1016/S0925-5214(00)00108-3

32- Saavedra, G.M., Figueroa, N.E., Poblete, L.A., Cherian, S., & Figueroa, C.R. (2016). Effects of preharvest applications of methyl jasmonate and chitosan on postharvest decay, quality and chemical attributes of *Fragaria chiloensis* fruit. *Food Chemistry*, *190*, 448-453. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.05.107

33- Sajid, M., Basit, A., Ullah, Z., Shah, S.T., Ullah, I., Mohamed, H.I., & Ullah, I. (2020). Chitosan-based foliar application modulated the yield and biochemical attributes of peach (*Prunus persica* L.) cv. Early Grand. *Bulletin of the National Research Centre*, *44*(1), 1-11. https://doi.org/10.1186/s42269-020-00405-w

34- Shiekh, R.A., Malik, M.A., Al-Thabaiti, S.A., & Shiekh, M.A. (2017). Chitosan as a novel edible coating for fresh fruits. *Food Science and Technology Research*, *19*(2), 139–155.

35- Sofy, A.R., Dawoud, R.A., Sofy, M.R., Mohamed, H.I., Hmed, A.A., & El-Dougdoug, N.K. (2020). Improving regulation of enzymatic and non-enzymatic antioxidants and stress-related gene stimulation in cucumber mosaic cucumovirus-infected cucumber plants treated with glycine betaine, chitosan & combination. *Molecules*, *25*(10), 2341. https://doi.org/10.3390/molecules25102341

36- Srinivasa, P., Baskaran, R., Ramesh, M., Harish Prashanth, K., & Tharanathan, R. (2002). Storage studies of mango packed using biodegradable chitosan film. *European Food Research and Technology*, *215*, 504-508. https://doi.org/10.1007/s00217-002-0591-1

37- Vinayagam, R., Jayachandran, M., & Xu, B. (2016). Antidiabetic effects of simple phenolic acids: A comprehensive review. *Phytotherapy Research*, *30*(2), 184-199. https://doi.org/10.1002/ptr.5528

38- Wang, L.Z., Liu, L., Holmes, J., Kerry, J.F., & Kerry, J.P. (2007). Assessment of film-forming potential and properties of protein and polysaccharide-based biopolymer films. *International Journal of Food Science and Technology*, *42*(9), 1128-1138. https://doi.org/10.1111/J.1365-2621.2006.01440.X

39- Wang, S.Y., & Gao, H. (2013). Effect of chitosan-based edible coating on antioxidants, antioxidant enzyme system, and postharvest fruit quality of strawberries (*Fragaria* x *aranassa Duch*.). LWT-*Food Science and Technology*, *52*(2), 71-79. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2012.05.003

40- Wongmetha, O., & Ke, L.S. (2012). The quality maintenance and extending storage life of mango fruit after postharvest treatments. *International Journal of Agricultural and Biosystems Engineering*, *6*(9), 798-803.

41- Xing, Y., Yang, H., Guo, X., Bi, X., Liu, X., Xu, Q., Wang, Q., Li, W., Li, X., Shui, Y., & Chen, C. (2020). Effect of chitosan/Nano-TiO_2 composite coatings on the postharvest quality and physicochemical characteristics of mango fruits. *Scientia Horticulturae*, *263*, p.109135. https://doi.org/10.1016/j.scienta.2019.109135

42- Xu, F., & Liu, S. (2017). Control of postharvest quality in blueberry fruit by combined 1-methylcyclopropene (1-MCP) and UV-C irradiation. *Food and Bioprocess Technology*, *10*, 1695-1703. https://doi.org/10.1007/s11947-017-1935-y

43- Yaman, Ö., & Bayoındırlı, L. (2002). Effects of an edible coating and cold storage on shelf-life and quality of cherries. LWT-*Food Science and Technology*, *35*(2), 146-150.

44- Zagzog, O.A., Gad, M.M., & Hafez, N.K. (2017). Effect of nano-chitosan on vegetative growth, fruiting and resistance of malformation of mango. *Trends in Horticultural Research*, *67*, 673-681. https://doi.org/10.3923/THR.2017.11.18

45- Zhang, C., Long, Y.H., Wang, Q.P., Li, J.H., Wu, X.M., & Li, M. (2019). The effect of pre harvest 28.6% chitosan composite film sprays for controlling the soft rot on kiwifruit. *Horticultural Science*, *46*(4), 180-194. https://doi.org/10.17221/84/2018-HORTSCI

Journal of Horticultural Science
https://jhs.um.ac.ir

Research Article
Vol. 38, No. 2, Summer 2024, p. 393-406

Investigating the Effect of Chicken Manure and Potassium Sulfate on Yield and Biochemical Traits of Fenugreek Medicinal Plant

M.H. Aminifard[1]*, S. Nadafan[2], H. Bayat[3], M. Jahani[4]

1- Associate Professor, Department of Horticultural Sciences and Regional Plant Research Center, Faculty of Agriculture, Birjand University, Birjand, Iran
(*- Corresponding Author Email: mh.aminifard@birjand.ac.ir)
2 and 3- M.Sc. Student and Associate Professor, Department of Horticultural Sciences, Faculty of Agriculture, Birjand University, Birjand, Iran, respectively.
4- Associate Professor, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Birjand University, Iran

Received:	04-12-2023	**How to cite this article:**
Revised:	22-01-2024	Aminifard, M.H., Nadafan, S., Bayat, H., & Jahani, M. (2024). Investigating the effect of chicken manure and potassium sulfate on yield and biochemical traits of fenugreek medicinal plant. *Journal of Horticultural Science, 38*(2), 393-406. (In Persian with English abstract). https://doi.org/10.22067/jhs.2024.85718.1307
Accepted:	05-02-2024	
Available Online:	05-02-2024	

Introduction

The annual herb *Trigonella foenum-graecum* L. (Fabaceae) is cultivated worldwide as a semi-arid crop. It is commonly known as Fenugreek and used as both a spice and medicinal plant. Fenugreek is used to treat many ailments due to the presence of various bioactive compounds, like apigenin, luteolin, orientin, quercetin, vitexin, isovitexin, saponins, amino acids, phenols, alkaloids, etc. Combining chemical and organic fertilizers offers a sustainable approach to nutrient management. This integrated strategy enhances the effectiveness of chemical fertilizers, fosters improved soil health, and minimizes nutrient loss from the system.Chicken manure is one of the types of animal manure and a source of organic matter to strengthen all types of soil. In addition to having nutrients, it is one of the cheap fertilizers compared to common fertilizers in the production of crops, and it is richer in nitrogen than other animal fertilizers. Potassium is a critical element for plant growth and development, playing a vital physiological role in plant health and resilience against biotic and abiotic stresses.

Materials and Methods

To investigate the effect of chicken manure and potassium sulfate on yield and biochemical traits of the fenugreek medicinal plant, factorial research was conducted in the form of randomized complete block design in three replications in the crop year 2021-2022. Experimental treatments included chicken manure at three levels (0, 1000, and 2000 $kg.ha^{-1}$) and potassium sulfate at four levels (0, 1.5, 3, and 5 per thousand). To determine the seed yield after full ripening, the seeds were collected from one plant in each plot, weighed, and recorded. Arnon's method was used to measure the pigments in the leaves at the full flowering stage of the plant. To measure the amount of total phenolic compounds in the leaf using the Folin Cicalto method, antioxidant using 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) method, total sugar using anthrone method, total flavonoid using aluminum chloride reagent method was used in the full flowering stage of the plant.

Results and Discussion

This experiment revealed that chicken manure significantly boosted crop yield and improved most biochemical traits, with the exception of sugar and antioxidant content.The amount of antioxidant activity decreased with

©2024 The author(s). This is an open access article distributed under Creative Commons Attribution 4.0 International License (CC BY 4.0).

https://doi.org/10.22067/jhs.2024.85718.1307

increasing levels of chicken manure and soluble sugar was not affected by this manure. Treatment of 2000 $kg.h^{-1}$ chicken manure has the highest phenol with 10.793 $mg.g^{-1}$ dry weight, flavonoid with 4.475 $mg.g^{-1}$ dry weight, Chlorophyll a with 2.591 $mg.g^{-1}$ of fresh weight, Chlorophyll b with 3.055 $mg.g^{-1}$ of fresh weight, and seed yield with 1185.8 $kg.h^{-1}$. Regarding the impact of Soluptas on biochemical traits, all except phenol and antioxidant content peaked at a concentration of three parts per thousand. Notably, these peak levels were statistically indistinguishable from those observed at five parts per thousand.Treatment of 5 per thousand Soluptas also increased 28% seed yield, 13% soluble sugar, 20% phenol, 31% flavonoid, and 97% chlorophyll b. In the interaction effect in the treatment, it was observed that the highest amount of the two fertilizers had the highest amount of yield and biochemical traits, except for the antioxidant, whose activity level decreased with the increase of fertilizer levels. The results showed that the highest amount of soluble sugar in fenugreek leaves was related to the level of no chicken fertilization with Soluptas 5 per thousand at the rate of 21.53 $mg.g^{-1}$ dry weight. The highest levels of both treatments (2000 $kg.h^{-1}$ of chicken manure and Soluptas 5 per thousand) caused an increase in grain yield (1396 $kg.h^{-1}$), phenol (12.86 $mg.g^{-1}$ DW), and chlorophyll b (3.62 $mg.g^{-1}$ FW) compared to no fertilization (control level). The highest amount of chlorophyll a was related to the interaction of 2000 $kg.h^{-1}$of chicken manure and Soluptas 3 per thousand at the rate of 3.11 $mg.g^{-1}$ of fresh weight.

Conclusion

Overall, chicken manure exhibited the strongest positive influence on the greatest number of traits among the single treatments. When considering the combined effects, a combination of 2000 parts per thousand chicken manure and 5 parts per thousand Soluptas appears to be optimal for enhancing the fenugreek plant's properties.

Keywords: Chlorophyll, Organic fertilizer, Phenol, Soluptas, Yield

نشریه علوم باغبانی
https://jhs.um.ac.ir

مقاله پژوهشی
جلد ۳۸، شماره ۲، تابستان ۱٤۰۳، ص. ٤۰٦-۳۹۳

بررسی تأثیر سطوح مختلف کود مرغی و سولفات پتاسیم بر صفات کیفی و پارامترهای بیوشیمیایی گیاه شنبلیله (*Trigonella foenum- graceum* L.)

محمدحسین امینی‌فرد[۱*]- سجاد ندافان[۲]- حسن بیات[۳]- مهدی جهانی[٤]

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۹/۱۳
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۱۱/۱۶

چکیده

به‌منظور بررسی تأثیر کود مرغی و سولفات پتاسیم بر میزان صفات بیوشیمیایی و عملکرد گیاه شنبلیه، پژوهشی به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی در سال زراعی ۱۴۰۱-۱۴۰۰ انجام گردید. تیمارهای آزمایش شامل کود پلیت مرغی در سه سطح (صفر، ۱۰۰۰ و ۲۰۰۰ کیلوگرم در هکتار) به‌صورت کاربرد خاکی و سولفات پتاسیم (سولوپتاس) در چهار سطح (صفر، ۱/۵، ۳ و ۵ در هزار) به‌صورت محلول پاشی بودند. نتایج نشان داد که کود مرغی در همه صفات به‌جز میزان قند محلول و فعالیت آنتی‌اکسیدانی، سبب افزایش معنی‌دار صفات بیوشیمیایی و عملکرد دانه شنبلیله شد، به‌طوری‌که تیمار ۲۰۰۰ کیلوگرم در هکتار کود مرغی، بالاترین میزان فنل (۱۰/۷۹۳ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک)، میزان فلاونوئید (۴/۴۷۵ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک)، کلروفیل a (۲/۵۹۱ میلی‌گرم بر گرم وزن تر) و کلروفیل b (۳/۰۵۵ میلی‌گرم بر گرم وزن تر) و عملکرد دانه (۱۱۸۵/۸ کیلوگرم در هکتار) را به خود اختصاص داد. در تأثیر سولفات پتاسیم (سولوپتاس) بر صفات بیوشیمیایی شنبلیله مشاهده شد که همه صفات به‌جز میزان فنل و فعالیت آنتی‌اکسیدانی، همگی در سطح سه در هزار، دارای بالاترین میزان بودند که با سطح پنج در هزار اختلاف معنی‌داری نداشتند. نتایج اثر متقابل تیمارها نشان داد که در تمام صفات به‌جز صفت فعالیت آنتی‌اکسیدانی، بالاترین میزان مصرف هر دو کود، بیشترین میزان صفات بیوشیمیایی و عملکرد دانه را به خود اختصاص دادند، به‌طوری‌که، بیشترین سطوح هر دو تیمار (۲۰۰۰ کیلوگرم در هکتار کود مرغی و سولوپتاس ۵ در هزار) سبب افزایش عملکرد دانه، میزان فنل و کلروفیل b نسبت به سطح شاهد شد. بیشترین میزان کلروفیل a نیز مربوط به برهم‌کنش ۲۰۰۰ کیلوگرم در هکتار کود مرغی و سولوپتاس ۳ در هزار به‌میزان ۳/۱۱ میلی‌گرم بر گرم وزن‌تر بود. در مجموع، در بین سطوح مورد بررسی در دو تیمار، سطح ۲۰۰۰ کیلوگرم در هکتار کود مرغی و ۳ در هزار سولوپتاس برای دستیابی به افزایش عملکرد دانه و بهبود صفات بیوشیمیایی برای گیاه شنبلیله پیشنهاد می‌گردد.

واژه‌های کلیدی: سولوپتاس، عملکرد، فنل، کلروفیل، کود آلی

مقدمه

شنبلیله (*Trigonella foenum-graecum* L.) گیاهی یک ساله از خانواده Fabaceae به‌عنوان یک محصول نیمه خشک در سراسر جهان کشت می‌شود. به‌عنوان ادویه و هم به‌عنوان گیاه دارویی استفاده می‌شود. شنبلیله به‌دلیل وجود ترکیبات فعال زیستی مختلف مانند آپیژنین، لوتئولین، اورینتین، کورستین، ویتکسین، ایزوویتکسین، ساپونین‌ها، اسیدهای آمینه، فنل‌ها، آلکالوئیدها و غیره برای درمان بسیاری از بیماری‌ها استفاده می‌شود (Wani & Kumar, 2018).

از ارکان اصلی و مهم کشاورزی پایدار، استفاده از کودهای آلی در اکوسیستم‌های زراعی با هدف کاهش کاربرد کودهای شیمیایی است، زیرا کودهای آلی سبب تأمین سلامت انسان و محیط زندگی می‌شود و از طرفی، اهمیت کاربرد آن‌ها در مورد گیاهان که به‌طور مستقیم با

۱- دانشیار، گروه علوم باغبانی و مرکز پژوهشی گیاهان ویژه منطقه، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بیرجند، بیرجند، ایران
(*- نویسندهٔ مسئول: Email: mh.aminifard@birjand.ac.ir)
۲ و ۳- به‌ترتیب دانشجوی کارشناسی ارشد و دانشیار، گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بیرجند، بیرجند، ایران
۴- دانشیار، گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بیرجند، ایران

https://doi.org/10.22067/jhs.2024.85718.1307

سلامت انسان در ارتباط هستند، محرز می‌باشد (Khalesro & Malekian, 2017). کاربرد کودهای دامی از جمله کود مرغی در بهبود شرایط خاک و رشد گیاه و عملکرد دانه مؤثر بوده و در صورت دسترسی به مقادیر زیاد آن می‌تواند مکمل مناسبی برای کودهای شیمیایی باشد که در این میان، کود مرغی علاوه‌بر عناصر غذایی، دارای خواصی مانند آزادسازی تدریجی نیتروژن (کاهش آب‌شویی نیترات)، آزادسازی تدریجی ترکیبات پتاسیم و کلسیم (تنظیم pH خاک) و ماده آلی (افزایش ظرفیت نگهداری آب و موادغذایی) می‌باشد (Neisani *et al.*, 2011). کود مرغی یکی از انواع کودهای دامی و منبع ماده آلی برای تقویت انواع خاک‌هاست. علاوه‌بر داشتن مواد مغذی، یکی از کودهای ارزان قیمت در مقایسه با کودهای متداول در تولید گیاهان زراعی است و از نظر داشتن نیتروژن نسبت به سایر کودهای دامی غنی تر است (Lawrence *et al.*, 2008).

کودهای شیمیایی یکی از مهم‌ترین نهاده‌های کشاورزی پیشرفته است و اعمال آن در جهت افزایش عملکرد محصولات کشاورزی به عنوان سریع‌ترین رویکرد رفع نیازهای تغذیه‌ای گیاه در کشورهای توسعه یافته و در حال توسعه بسیار متداول و موفقیت‌آمیز بوده است (Al-Taai, 2021). مصرف بهینه کودها آسان‌ترین ، سریع‌ترین و کارآمدترین روش دستیابی به افزایش عملکرد در واحد سطح و بهبود کیفیت محصولات کشاورزی است (Scharf *et al.*, 2005) و بدون اطمینان از تأمین تغذیه مناسب و متعادل گیاهان امکان دستیابی به عملکرد زیاد وجود ندارد.

پتاسیم یکی از عناصر اصلی و پرمصرف شیمیایی نقش اصلی در فعالیت رشد و نمو گیاهان دارد. همچنین، این عنصر دارای نقش فیزیولوژیکی در رابطه با سلامت گیاه و مقاومت به تنش‌های زیستی و غیرزیستی است. کمبود پتاسیم به‌صورت ضعف در رشد و کاهش عملکرد کمّی و کیفی نمود پیدا می‌کند. نقش فیزیولوژیک پتاسیم شامل فعال کردن آنزیم‌ها، متعادل کردن سنتز ترکیبات آلی، روابط آبی گیاه و کنترل روزنه‌ها، فتوسنتز، انتقال مواد زیستی، پاسخ گیاه به تنش‌های خشکی، شوری، سرما و تنش‌های زیستی (Oosterhuis *et al.*, 2013) جلوگیری از پیری گیاه، حفظ ظرفیت مقصد در گیاه (Lv *et al.*, 2017) و تسریع در بهبود اثرات تنش خشکی در گیاهان می‌باشد (Zahoor *et al.*, 2017).

استفاده تلفیقی از کودهای شیمیایی به همراه کودهای آلی رویکرد پایدار برای استفاده کارآمد از عناصر غذایی است که باعث افزایش کارآیی کودهای شیمیایی، بهبود خواص فیزیکی خاک و کاهش تلفات مواد مغذی می‌گردد (Mahmood *et al.*, 2017). براساس نتایج به دست آمده از تحقیق تعدادی از محققان مصرف ترکیبی کودهای شیمیایی و آلی منجر به بهبود صفات کمّی و کیفی گردید (Birjely & Al-Atrushy, 2017; Fereidooni *et al.*, 2018). لذا با توجه به موارد اشاره شده و کمبود اطلاعات علمی در زمینه تلفیق کودها، در این پژوهش سـعی در دسـتیابی بـه یافتن ترکیب کودی مناسب متشکل از کود مرغی (به‌عنوان کود آلی) و سولفات پتاسیم (به‌عنوان کود شیمیایی) برای افزایش صفات بیوشیمایی و عملکرد گیاه شنبلیله شد.

مواد و روش‌ها

این تحقیق در اوایل سال ۱۴۰۰ در شهرستان قوچان در شمال استان خراسان رضوی انجام گردید. قبل از کاشت، پنج نمونه خاک از مکان‌های مختلف انتخاب شد. سپس، آن‌ها را ترکیب کرده و یک نمونه مرکب از آن‌ها تهیه و سپس برخی از ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی اندازه‌گیری شد (جدول ۱).

جدول ۱- خصوصیات خاک آزمایش قبل از کاشت

Table 1- Characteristics of the experiment soil before planting

اسیدیته pH	هدایت الکتریکی EC (dS.m^{-1})	مواد آلی Organic matter (%)	فسفر قابل جذب Absorbable phosphorus (ppm)	پتاسیم قابل جذب Absorbable potassium (ppm)	ازت کل Total nitrogen (%)	آهک Lime (%)	بافت خاک Soil texture
8	1.1	0.57	1.5	90	0.055	37	لومی Loam

به‌منظور بررسی تأثیر سطوح مختلف کود پلیت مرغی و محلول‌پاشی سولفات پتاسیم (به‌صورت کود تجاری سولوپتاس) بر خصوصیات فیزیولوژیکی شنبلیله، آزمایش فاکتوریل در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی با سه تکرار اجرا شد. فاکتور اول، شامل کود پلیت مرغی در سه سطح صفر، ۱۰۰۰ و ۲۰۰۰ کیلوگرم بر هکتار و فاکتور دوم شامل کود سولوپتاس در چهار سطح صفر، ۱/۵، ۳ و ۵ در هزار بود. مشخصات تجزیه کود پلیت مرغی ۷۰ درصد و سولفات پتاسیم مورد استفاده در آزمایش در جدول‌های ۲ و ۳ ارائه شده است.

جدول ۲- مشخصات تجزیه کود پلیت مرغی ۷۰ درصد مورد استفاده در آزمایش

Table 2- Characteristics of chicken manure decomposition of 70% used in the experiment

رطوبت حداکثر Maximum humidity (%)	اسیدیته pH	هدایت الکتریکی EC ($dS.m^{-1}$)	کربن آلی OC (%)	گوگرد کل Total sulfur (%)	پتاسیم محلول در آب K_2O (%)	فسفر قابل استفاده P_2O_5 (%)	نیتروژن کل Total nitrogen (%)
10	8.42	4.28	20	7	2	1	2

جدول ۳- مشخصات تجزیه کودی سولفات پتاسیم مورد استفاده در آزمایش

Table 3- Characteristics of decomposition of potassium sulfate fertilizer used in the experiment

حداقل حلالیت Minimum solubility ($g.l^{-1}$)	حداکثر رطوبت Maximum humidity (%)	منگنز کلاته باEDTA Manganese chelate with EDTA (%)	مس کلاته با EDTA Copper chelated with EDTA (%)	روی کلاته با EDTA Zinc chelate with EDTA (%)	آهن کلاته با EDTA Iron chelate with EDTA (%)	گوگرد محلول در آب Sulfur soluble in water (%)	پتاسیم محلول در آب K_2O (%)
110	1.5	0.05	0.05	0.05	0.1	18	50

برای آماده‌سازی بستر کشت، ابتدا پس از شخم، دیسک و مسطح کردن خاک اقدام به کرت‌بندی زمین شد. ابعاد کرت آزمایش به‌میزان ۱/۵ در یک و فاصله بین کرت‌ها نیم متر در نظر گرفته شد. همچنین فاصله بین بلوک تا بلوک دیگر یک متر و فاصله کاشت بین ردیف‌ها ۲۰ سانتی‌متر و فاصله روی ردیف‌ها ۱۰ سانتی‌متر بود. عمق کاشت بذور شنبلیله نیز ۱/۵ سانتی‌متر در نظر گرفته شد. کود پلیت مرغی را بر حسب سطح مورد بررسی قبل از کاشت به زمین داده شد. به‌منظور جلوگیری از سله بستن، روی بذرها با ماسه‌های ریز مخلوط با کود دامی پوشانده شد. سپس در مرحله ۴-۶ برگی برای رسیدن به تراکم مناسب تنک انجام شد. اولین آبیاری پس از کاشت و آبیاری‌های بعدی به فاصله هر شش روز یک بار تا آخر فصل رشد انجام شد. همچنین کود سولوپتاس به‌صورت محلول‌پاشی بعد از کاشت از مرحله شش برگی تا مرحله گل‌دهی طی سه نوبت به فاصله ۱۴ روز اعمال گردید. از زمان کاشت تا نمونه‌برداری، وجین و مبارزه با علف‌های هرز نیز انجام شد. بعد از اعمال تیمارها در مرحله گل‌دهی کامل و قبل از مرحله رسیدگی فیزیولوژیکی گیاه، از هر کرت ۱۰ بوته به‌طور تصادفی انتخاب شده و سپس نمونه‌هایی از برگ‌های توسعه یافته از ۱۰ بوته تهیه و صفات بیوشیمیایی شنبلیله اندازه‌گیری شدند.

جهت تعیین عملکرد دانه پس از رسیدگی کامل، دانه‌ها از یک بوته در هر کرت جمع‌آوری شده، توزین و ثبت شدند.

روش تهیه عصاره گیاهی: ابتدا یک گرم از بافت تازه برگی به همراه ۱۰ میلی لیتر متانول ۸۰ درصد در داخل هاون چینی کوبیده و له شد. قسمت بالای محلول حاصله، جدا گشته و سپس محلول به‌دست آمده، در دستگاه سانتریفوژ به‌مدت ۱۰ دقیقه با دور ۶۰۰۰ قرار گرفت و بعد، فاز مایع رویی برداشته شده و به‌عنوان عصاره گیاهی استفاده گردید. عصاره به‌دست آمده تا زمان اندازه‌گیری صفات بیوشیمایی در داخل یخچال نگهداری شد.

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

معادله (۱)

۱۰۰× جذب شاهد/ (جذب نمونه- جذب شاهد) = فعالیت آنتی‌اکسیدانی

اندازه‌گیری میزان فنل کل برگ شنبلیله: برای اندازه‌گیری میزان فنل کل برگ شنبلیله از روش اسید گالیک و معرف فولین سیوکالچو استفاده شد (Chuah *et al.*, 2008). بدین منظور، ۰/۵ میلی‌لیتر از معرف فولین سیوکالچو به ۰/۵ میلی‌لیتر عصاره برگ شنبلیله و استانداردهای اسید گالیک اضافه و سپس به محلول حاصل چهار میلی‌لیتر سدیم کربنات یک مولار اضافه شد. پس از ۱۵ دقیقه نگهداری در دمای محیط، جذب نمونه‌ها در طول موج ۷۶۵ نانومتر توسط دستگاه اسپکتوفتومتر خوانده شد. سپس مقدار کل ترکیبات فنلی نمونه‌ها با استفاده از منحنی استاندارد اسید گالیک محاسبه گردید و در پایان، غلظت بر حسب میلی‌گرم اسید گالیک بر گرم عصاره برگ گزارش شد.

اندازه‌گیری میزان فلاونوئید کل برگ شنبلیله: میزان فلاونوئید کل برگ با استفاده از معرف آلومینیوم کلرید انجام گرفت (Serra Bonvehí *et al.*, 2001). به این ترتیب که به ۰/۵ میلی‌لیتر از عصاره متانولی برگ، ۰/۱ میلی‌لیتر از کلرید آلومینیوم ۱۰ درصد افزوده سپس ۰/۱ میلی‌لیتر استات پتاسیم یک میلی‌مولار افزوده و در پایان ۲/۸ میلی‌لیتر آب مقطر اضافه شد. بعد از گذشت مدت زمان ۳۰ دقیقه در دمای آزمایشگاه، جذب آن‌ها در ۴۱۵ نانومتر اندازه‌گیری شد. میزان فلاونوئید از روی منحنی استاندارد کوئرستین تعیین بر حسب میلی‌گرم در گرم عصاره بیان شد.

اندازه‌گیری رنگیزه‌های فتوسنتزی: اندازه‌گیری رنگیزه‌های موجود در برگ در مرحله گل‌دهی کامل بوته اندازه‌گیری شد (Lichtenthaler, 1987)، استخراج کلروفیل از برگ توسط استون ۸۰ درصد صورت گرفت. مقدار ۰/۱ گرم از بافت تر بر هرکدام از تیمارها وزن شد. ساییدن برگ با استون تدریجی و تا حصول یک محلول سبز رنگ ادامه یافت. سپس، حجم محلول با استون به ۱۰ میلی‌لیتر رسید. محلول حاضر به‌مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۴۰۰۰ دور سانتریفوژ گردید. پس از آن، جذب محلول رویی به‌وسیله دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج‌های ۶۴۵ برای کلروفیل b و ۶۶۳ نانومتر برای کلروفیل a و ۴۷۰ نانومتر برای کاروتنوئید ثبت شد.

کلروفیل a= (۱۲/۲۱ A۶۶۳ – ۲/۸۱ A۶۴۵) ×V/۱۰۰۰ W

کلروفیل b= (۲۰/۱۳ A۶۴۵ – ۵/۰۳ A۶۶۳) × V/۱۰۰۰W

کلروفیل کل = کلروفیل a + کلروفیل b

کاروتنوئید= (۱۰۰۰A۴۷۰–۳/۲۷ کلروفیل a– ۱۰۴ کلروفیل b)/۲۲۹

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

تجزیه آماری داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SAS 9.4 انجام شد. مقایسه میانگین داده‌ها نیز با استفاده از آزمون LSD در سطح احتمال پنج درصد مورد مقایسه قرار گرفت. برای رسم شکل‌ها از نرم‌افزار Excel استفاده شد.

نتایج و بحث

میزان فنل کل گیاه

نتایج تجزیه واریانس داده‌های به‌دست آمده نشان داد که اثر ساده کود مرغی و سولوپتاس و همچنین، برهم‌کنش این دو کود، همگی در سطح یک درصد بر صفت فنل برگ شنبلیله معنی‌دار بودند (جدول ۴). مقایسه میانگین داده‌های به‌دست آمده نشان داد که کود مرغی تا سطح ۱۰۰۰ کیلوگرم در هکتار اختلاف معنی‌داری با سطح عدم کوددهی نداشت، ولی سطح ۲۰۰۰ کیلوگرم در هکتار کود مرغی موجب افزایش معنی‌دار فنل شد، به‌نحویکه این سطح موجب افزایش ۱۷/۰۵ درصدی این صفت نسبت به عدم کوددهی شد (جدول ۵). مقایسه میانگین اثر ساده سولوپتاس بر فنل شنبلیله نشان داد که این تیمار تا سطح سه در هزار تفاوت معنی‌داری نسبت به شاهد نداشت، ولی سطح پنج در هزار سولوپتاس سبب افزایش ۱۶/۹۱ درصدی نسبت به شاهد شد (جدول ۵). اثر متقابل دو تیمار مورد بررسی بر میزان فنل نشان داد که بیشترین فنل در گیاه شنبلیله در برهم‌کنش کود مرغی ۲۰۰۰ کیلوگرم در هکتار و سولوپتاس ۵ در هزار مشاهده شد. بیشترین سطح تیمارها سبب افزایش ۵۸/۳۷ درصدی فنل نسبت به شاهد شد (جدول ۷).

یزدانی بیوکی و همکاران (Yazdani Biuki *et al.*, 2010) نیز به بررسی صفات کمّی و کیفی گیاه ماریتیغال (*Silybum marianum* L.) در پاسخ به کودهای آلی، زیستی و شیمیایی پرداختند و تأثیر معنی‌دار مصرف انواع مختلف کودهای آلی و شیمیایی را در افزایش درصد روغن و مواد فنلی و فلاونوئیدی موجود در دانه (سیلی‌مارین و سیلین) گزارش نمودند.

با توجه به نقش ترکیبات فنلی در تأمین سلامت انسان‌ها امروزه تمایل شدیدی بین محققین صنایع غذایی در پرورش سبزی‌هایی که حاوی مقادیر بالای ترکیبات فنلی وجود دارد، لذا نخستین گام در راستای تحقق این امر مدیریت صحیح در مرحله پرورش سبزی‌ها مخصوصاً مدیریت تغذیه گیاه می‌باشد تا با تولید محصولات سالم از ابتلا به بیماری‌های مختلف مخصوصاً سرطان کاست (Vojodi Mehrabani, 2020).

براساس نتایج تحقیق صانعی و رضوی (Sanei & Razavi, 2018)، تغییر محتوای فنل کل تحت تأثیر محلول‌پاشی نیترات پتاسیم قرار گرفت که مشابه نتایج این تحقیق است. این نتایج با اثر پتاسیم بر افزایش ترکیبات فنلی در برنج (*Oryza sativa*) مطابقت دارد (Prasad *et al.*, 2010). تهرانی‌فر و تبار (Tehranifar & Tabar, 2009) بیان کردند که کاربرد برگی پتاسیم منجر به افزایش معنی‌دار رنگدانه‌های آنتوسیانین، ترکیب‌های فنلی و فعالیت آنتی اکسیدانی در آب میوه انار (*Punica granatum*) در مقایسه با شاهد شد. در مورد علت افزایش ترکیبات فنلی در اثر پتاسیم می‌توان گفت که پتاسیم رشد گیاه را افزایش داده و در نتیجه، باعث افزایش تولید مواد فتوسنتزی می‌شود و به‌علت تخصیص کربن اضافی به مسیر اسید شیکمیک موجب افزایش ترکیبات فنلی می‌شود (Nguyen *et al.*, 2010). از طرف دیگر، ثابت شده است که پتاسیم با افزایش فعالیت آنزیم فنیل آالنین آمونیالیاز که آنزیم کلیدی در مسیر فنیل پروپانوئید است، میزان ترکیبات فنلی را افزایش می‌دهد (Soares *et al.*, 2005).

میزان فلاونوئید کل گیاه

داده‌های به‌دست آمده از این آزمایش نشان داد که اثر ساده کود مرغی و سولوپتاس در سطح یک درصد بر میزان فلاونوئید کل گیاه معنی‌دار بودند، ولی اثر متقابل این دو فاکتور بر این صفت معنی‌دار نبود (جدول ۴). مقایسه میانگین اثر ساده کود مرغی نشان داد که با استفاده از این کود، میزان فلاونوئید نیز افزایش می‌یابد، امّا تا سطح ۱۰۰۰ کیلوگرم در هکتار فلاونوئید افزایش معنی‌داری نسبت به شاهد نداشت؛ بیشترین میزان فلاونوئید شنبلیله در سطح ۲۰۰۰ کیلوگرم در هکتار کود مرغی به‌میزان ۴/۴۷ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک و کمترین این صفت مربوط به عدم کوددهی به‌میزان ۳/۵۳ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک بود. در اثر ساده سولوپتاس مشاهده شد که با افزایش میزان این صفت تا سطح ۱/۵ در هزار سولوپتاس افزایش معنی‌داری در میزان فلاونوئید مشاهده نشد، ولی سطح ۳ و ۵ در هزار سولوپتاس سبب افزایش معنی‌دار این صفت شد و این دو سطح اختلاف معنی‌داری با یکدیگر نداشتند (جدول ۵).

علت افزایش ترکیبات فلاونوئیدی در اثر محلول‌پاشی سولفات پتاسیم نیز احتمالاً می‌تواند به‌دلیل تأثیر محلول‌پاشی پتاسیم بر فتوسنتز گیاه و متابولیسم ترکیبات کربنی باشد که خود اساس تشکیل متابولیت های ثانویه می‌باشند و از این طریق، سنتز فلاونوئید را افزایش می‌دهد (Nojavan *et al.*, 2016). در بررسی انجام شده در گیاه رازیانه (*Foeniculum vulgare*) مشخص شد که کاربرد کودهای آلی در ترکیب با کودهای شیمیایی موجب افزایش محتوای فنل، فلاونوئید و اسید آسکوربیک گیاه شد که با نتایج این تحقیق هم‌خوانی دارد. افزایش عملکرد فنلی به تبعیت از افزایش عملکرد خشک منطقی به نظر می رسد. پژوهشگران دیگری نیز نقش مثبت کودهای آلی را در افزایش سنتز فلاونوئیدها در گیاهان گزارش کرده‌اند (Kheiry *et al.*, 2016). افزایش میزان فنل‌ها در کلم بروکلی (*Brassica olaracea*, var. Italica) پس از کاربرد کودهای آلی، نقش بارز این کودها را در بیوسنتز ترکیباتی که القاکننده مسیر اسید شیکمیک و در نهایت، بیشتر فلاونوئید و سایر ترکیبات فنلی است را تقویت می‌کند (Naguib *et al.*, 2012). ترکیبات فنلی موجود در سبزی‌ها نقش مهمی در از بین بردن رادیکال های آزاد اکسیژن دارند. رادیکال‌های آزاد موجب افزایش بیماری‌های قلبی، عروقی و سرطلان در موجودات زنده به‌دلیل آسیب به DNA و اسیدهای چرب غیراشباع می‌شود (Naguib *et al.*, 2012).

فعالیت آنتی‌اکسیدانی گیاه

داده‌های به‌دست آمده از این آزمایش نشان داد که اثر ساده کود مرغی و سولوپتاس در سطح یک درصد و همچنین، اثر متقابل این دو فاکتور نیز در سطح پنج درصد بر فعالیت آنتی‌اکسیدانی گیاه معنی‌دار بود (جدول ۴). مقایسه میانگین اثر ساده کود مرغی نشان داد که با افزایش در هر سطح این کود، میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی نیز کاهش می‌یابد؛ به‌نحوی‌که بیشترین فعالیت این صفت شنبلیله در سطح عدم کوددهی مرغی به‌میزان ۴۵/۳۱ درصد و کمترین این صفت مربوط به سطح کوددهی ۲۰۰۰ کیلوگرم در هکتار به‌میزان ۳۷/۳۷ درصد بود. در مقایسه میانگین اثر ساده سولوپتاس بر فعالیت آنتی‌اکسیدانینشان داد که سولوپتاس سبب کاهش معنی‌دار صفت مذکور شد، ولی بین سطح ۰ و ۱/۵ در هزار سولوپتاس اختلاف معنی‌داری وجود نداشت. سولوپتاس در سطح پنج در هزار سبب کاهش ۱۲/۹ درصدی فعالیت آنتی‌اکسیدانی شنبلیله نسبت به عدم کوددهی شد (جدول ۵). در اثر متقابل دو تیمار مورد بررسی، بیشترین میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی مربوط به سطح عدم کود مرغی به همراه سولوپتاس ۰، ۱/۵ و ۳ در هزار بود و کمترین میزان این صفت مربوط به سطح کود مرغی ۲۰۰۰ کیلوگرم در هکتار به‌همراه پنج در هزار سولوپتاس به‌میزان ۲۶/۹۴ درصد بود (جدول ۷).

برخی از مطالعات افزایش سطح آنتی‌اکسیدان‌ها را با افزایش پتاسیم نشان دادند (Tavallali *et al.*, 2018; Constán-Aguilar *et al.*, 2015)، درحالی‌که برخی دیگر هیچ تأثیری یا حتی کاهش سطح آنتی‌اکسیدان را نشان دادند (Taber *et al.*, 2008; Fanasca *et al.*, 2006). این نتایج متنوع ممکن است به‌دلیل محیط‌های کشت متفاوت باشد برای مثال، گلخانه (Constán-Aguilar *et al.*, 2015) یا زمین باز (Taber *et al.*, 2008) همراه با عوامل غیرزیست متناوب یا حتی به‌دلیل ارقام مختلف. با این وجود، پتاسیم، کاتیون اصلی در سیتوپلاسم سلولی است و به‌عنوان یک کوآنزیم در چندین فرآیند متابولیک عمل می‌کند (Zhao *et al.*, 2018). در نتیجه، آنتی‌اکسیدان‌های گیاه حاصل از مسیرهای مختلف متابولیسم ثانویه به‌دلیل افزایش سطح عرضه پتاسیم اثر خود را نشان می‌دهند. همچنین گزارش شده است که کود آلی برخلاف کود معدنی باعث افزایش سطح متابولیت‌های ثانویه مانند فنل، فلاونوئید و فعالیت آنتی‌اکسیدانی در گیاه می‌شود (Salama *et al.*, 2015).

میزان قند محلول گیاه

نتایج تجزیه واریانس نشان داد که اثر ساده کود مرغی بر میزان قند محلول گیاه شنبلیله معنی‌دار نبود، ولی اثر ساده سولوپتاس و اثر متقابل این دو تیمار در سطح پنج درصد بر این صفت معنی‌دار بود (جدول ۴). مقایسه میانگین اثر ساده سولوپتاس بر میزان قند محلول گیاه شنبلیله نشان داد که این تیمار تا سطح سه در هزار تفاوت معنی-داری نسبت به شاهد نداشت، ولی سطح پنج در هزار سولوپتاس سبب افزایش ۱۲/۱۱ درصدی نسبت به شاهد شد (جدول ۵). اثر متقابل

داده‌های به‌دست آمده نشان داد که سولوپتاس سه در هزار در برهم‌کنش با هر سطح از کود مرغی سبب تولید بالاترین سطوح میزان قند محلول شد. همچنین مشاهده شد که در سطح ۲۰۰۰ کیلوگرم در هکتار کود مرغی در برهم‌کنش با تمامی سطوح سولوپتاس به‌جز سطح پنج کیلوگرم در هکتار ، میزان قند محلول گیاه در بالاترین سطح بودند. در این بین نیز بیشترین قند محلول برگ شنبلیله مربوط به سطح عدم کوددهی مرغی به‌همراه سولوپتاس پنج در هزار به‌میزان ۲۱/۵۳ میلی گرم بر گرم وزن خشک بود که نسبت به سطح شاهد (عدم کوددهی) ۲۲/۷ درصد افزایش داشت (جدول ۷).

با افزایش میزان پتاسیم، میزان تثبیت دی‌اکسیدکربن به‌دلیل کارکرد مطلوب روزنه‌ها افزایش می‌یابد و در نتیجه، میزان فتوسنتز افزایش یافته و بدین ترتیب، تولید کربوهیدرات در برگ‌ها افزایش می یابد و این امر باعث افزایش ویژگی‌های رشدی می‌شود (Khaldbrin & Islamzadeh, 2014). پتاسیم آنزیم مسئول ساخت نشاسته را فعال می‌کند، بنابراین در شرایط کمبود پتاسیم میزان نشاسته کاهش یافته، امّا ترکیبات نیتروژنی و کربوهیدرات‌های محلول انباشته می‌شوند. میزان فعالیت فتوسنتزی بر سرعت ساخت قند جهت تولید نشاسته مؤثر است. هنگامی که میزان پتاسیم زیاد است، نشاسته از مکان‌های سنتز به اندام‌های ذخیره‌کننده انتقال می‌یابد (Zörb *et al.*, 2014).

کاربرد کودهای آلی باعث افزایش میزان قند گردیده است که این امر را می‌توان به افزایش رشد گیاه، افزایش جذب مواد غذایی و افزایش تولید مواد ثانویه در گیاه مرتبط نمود. ساکارز در تنظیم اسمزی و حفاظت گیاه در برابر سرما نیز نقش دارد. تولیدات متابولیکی نشاسته و ساکارز به‌عنوان واسطه گلیکولیز برای تولید اسکلت کربنی و ATP برای ساخت اسیدهای چرب و نوکلئوتیک‌ها به‌کار می‌روند (Kafi *et al.*, 2009). تجمع قندهای محلول در گونه‌هایی مانند بادام زمینی (*Arachis hypogaea*)، سیب‌زمینی (*Solanum tuberosum*) و گیاهان دیگری چون گوجه‌فرنگی (*Solanum lycopersicum*)، آفتابگردان (*Helianthus annuus*)، سویا (*Glycine max*) و جو (*Hordeum vulgare*) نیز مشاهده شده است. اسیدهای آلی می‌توانند باعث رشد بهتر گیاه شوند (Samavat *et al.*, 2017) و متعاقباً این رشد بیشتر، سبب افزایش میزان ویتامین‌ها و کربوهیدرات‌ها در گیاه می‌شود.

میزان کلروفیل برگ گیاه

نتایج داده‌های به‌دست آمده نشان داد که اثر ساده کود مرغی و سولوپتاس و همچنین برهم‌کنش این دو کود، همگی در سطح پنج درصد بر میزان کلروفیل a برگ شنبلیله معنی‌دار بودند (جدول ۴). مقایسه میانگین داده‌های به‌دست آمده نشان داد که کود مرغی تا سطح ۱۰۰۰ کیلوگرم در هکتار اختلاف معنی‌داری با سطح عدم کوددهی روی کلروفیل a نداشت، ولی سطح ۲۰۰۰ کیلوگرم در هکتار کود مرغی موجب افزایش معنی‌دار این صفت شد، به‌نحوی‌که سطح ۲۰۰۰ کیلوگرم در هکتار کود مرغی سبب افزایش ۱۳/۵ درصدی نسبت به عدم کوددهی داشت (جدول ۶). همچنین اثر ساده سولوپتاس بر صفت کلروفیل a نشان داد که بیشترین میزان کلروفیل a مربوط به سطح سه در هزار سولوپتاس به‌میزان ۲/۶۳ میلی‌گرم بر گرم وزن تر بود (جدول ۵). در اثر متقابل دو تیمار مورد بررسی مشاهده شد که بیشترین میزان کلروفیل a مربوط به برهم‌کنش ۲۰۰۰ کیلوگرم در هکتار کود مرغی و سولوپتاس سه در هزار به‌میزان ۳/۱۱ میلی‌گرم بر گرم وزن تر بود؛ هر چند که از نظر آماری این برهم‌کنش تفاوت معنی‌داری با سطح ۲۰۰۰ کیلوگرم در هکتار کود مرغی و عدم مصرف سولوپتاس نداشت (جدول ۸).

داده‌های به‌دست آمده از این تحقیق مشخص کرد که اثر ساده کود مرغی، سولوپتاس و اثر متقابل این دو تیمار در سطح یک درصد بر میزان کلروفیل b برگ شنبلیله معنی‌دار بود (جدول ۴). مقایسه میانگین داده‌های به‌دست آمده نشان داد که همانند کلروفیل a، کود مرغی تا سطح ۱۰۰۰ کیلوگرم در هکتار اختلاف معنی‌داری با سطح عدم کوددهی روی کلروفیل b نداشت، ولی سطح ۲۰۰۰ کیلوگرم در هکتار کود مرغی موجب افزایش معنی‌دار این صفت شد، به‌نحوی‌که سطح ۲۰۰۰ کیلوگرم در هکتار کود مرغی سبب افزایش ۲۸/۱۹ درصدی نسبت به عدم کوددهی داشت (جدول ۶). در اثر ساده سولوپتاس مشاهده شد که تا سطح ۱/۵ کیلوگرم در هکتار، سولوپتاس تأثیر معنی داری بر افزایش صفت کلروفیل b نداشت و بیشترین میزان این صفت مربوط به سطح پنج در هزار سولوپتاس بود که با سطح سه در هزار تفاوت معنی‌داری نداشت (جدول ۶). بیشترین میزان هر دو تیمار (۲۰۰۰ کیلوگرم در هکتار کود مرغی و سولوپتاس پنج در هزار) بالاترین میزان کلروفیل b (۳/۶۲ میلی‌گرم بر گرم وزن تر) را به خود اختصاص دادند (جدول ۸).

مطابق گزارش‌ها یکی از مهم‌ترین نقش‌های پتاسیم، نقش کلیدی آن در فتوسنتز می‌باشد که به‌دلیل افزایش جذب دی‌اکسیدکربن و افزایش مستقیم رشد و شاخص سطح برگ نقش حیاتی در فتوسنتز دارد (Heakal *et al.*, 1990). همچنین بیان کردند که کودهای پتاسیم در ساخت مواد هیدروکربنی در گیاه و در نتیجه، بهبود فتوسنتز و رنگیزه‌های فتوسونتزی نقش دارند (Tabatabaei, 2018). در آزمایشی با عنوان اثر نانو کلات پتاسیم و کلسیم روی ویژگی‌های کمّی و کیفی ریحان (*Ocimum basilicum*) اعلام کردند که غلظت دو در هزار نانو کلسیم و شش در هزار نانوپتاسیم در مقایسه با نمونه شاهد بیشترین تأثیر مثبت را بر ارتفاع بوته، وزن خشک، سطح برگ، شاخص برداشت،

عملکرد بیولوژیک، درصد پتاسیم و ترکیبات کلروفیلی موجود در ریحان داشتهاند (Ghahremani *et al.*, 2014).

کودهای آلی دارای مواد آلی می‌باشند که به‌راحتی تجزیه شده و حاوی مقادیر زیادی نیتروژن می‌باشند (Ashnavar *et al.*, 2014). می توان اثر مثبت استفاده از کنسانتره کود مرغ روی رنگیزه‌های فتوسنتزی برگ را این گونه استنباط کرد که با توجه به اینکه عمده ترکیبات رنگدانه‌های فتوسنتزی دارای ساختار نیتروژنی هستند، ازاین‌رو کاربرد کودهای با نیتروژن بالا می‌تواند تا حد زیادی منجر به افزایش مقدار آن‌ها در گیاه گردد (Zgallaï *et al.*, 2006). همچنین، نیتروژن ساختار اصلی تمامی آمینواسیدها در پروتئین‌ها و چربی‌ها می‌باشد که به‌عنوان ترکیبات ساختاری کلروپلاست فعالیت می‌کنند (Badr & Fekry, 1998; Arisha & Bradisi, 1999).

عملکرد دانه شنبلیله

نتایج داده‌های به‌دست آمده نشان داد که اثر ساده کود مرغی و سولوپتاس و همچنین برهم‌کنش این دو کود در سطح یک درصد بر صفت عملکرد دانه شنبلیله معنی‌دار بودند (جدول ۴). مقایسه میانگین داده‌های به‌دست آمده نشان داد که کود مرغی تا سطح ۱۰۰۰ کیلوگرم در هکتار اختلاف معنی‌داری با سطح عدم کوددهی نداشت، ولی سطح ۲۰۰۰ کیلوگرم در هکتار کود مرغی موجب افزایش معنی‌دار عملکرد دانه شد، به‌نحوی‌که این سطح موجب افزایش ۱۹/۹ درصدی عملکرد دانه شنبلیله نسبت به عدم کوددهی شد (جدول ۶). جدول مقایسه میانگین اثر ساده سولوپتاس نشان داد که مصرف این کود سبب افزایش معنی‌دار عملکرد دانه شنبلیله نسبت به سطح شاهد شد، ولی اختلاف معنی‌داری بین سطوح مختلف سولوپتاس وجود نداشت. عملکرد دانه در سطح پنج در هزار سولوپتاس به‌میزان ۱۱۴۵ کیلوگرم در هکتار و در سطح عدم کوددهی ۸۹۲ کیلوگرم در هکتار بود (جدول ۶). در جدول اثر متقابل داده‌های به‌دست آمده مشاهده شد که بیشترین سطوح هر دو تیمار سبب افزایش ۴۵/۵ درصدی عملکرد دانه نسبت به عدم کوددهی (سطح شاهد) شد (جدول ۸).

جدول ٤- تجزیه واریانس اثر کاربرد کود مرغی و سولوپتاس بر صفات بیوشیمیایی و عملکردی شنبلیله

Table 4- ANOVA for the effect of chicken manure and Solupotas application on the biochemical and yield traits of fenugreek

منابع تغییرات S.O.V	درجه آزادی df	میانگین مربعات Mean squares: فنل Phenol	فلاونوئید Flavonoid	آنتی‌اکسیدان Antioxidants	قند محلول soluble sugar	کلروفیل a Chlorophyll a	کلروفیل b Chlorophyll b	عملکرد دانه Seed yield
بلوک Block	2	0.344^{ns}	0.455^{ns}	3.131^{ns}	15.73*	0.532*	0.007^{ns}	219.44^{ns}
کود مرغی Chicken manure	2	10.306**	3.136**	189.29**	4.510^{ns}	0.384*	2.669**	168369**
سولوپتاس Solupotas	3	5.657**	2.129**	282.190**	9.554*	0.375*	1.431**	125437**
کود مرغی × سولوپتاس Chicken manure × Soluptas	6	8.169**	0.119^{ns}	37.275*	8.182*	0.418*	0.632**	115351**
خطا Error	22	0.867	0.233	10.052	2.80	0.111	0.06	21395
ضریب تغییرات CV (%)	-	9.49	12.41	7.69	8.70	13.97	9.77	13.74

*، ** و ns به‌ترتیب معنی‌دار در سطوح احتمال ۵ و ۱ درصد و عدم اختلاف معنی‌دار

*, ** and ns are significant at 5% and 1% of probability levels, and non- significant, respectively.

جدول ۵- اثر ساده کود مرغی و کود سولوپتاس بر صفات بیوشیمیایی شنبلیله

Table 5- The simple effect of chicken manure and Solupotas fertilizer on the biochemical traits of fenugreek

تیمارها Treatments	فنل Phenol (mg.g^{-1} DW)	فلاونوئید Flavonoid (mg.g^{-1} DW)	آنتی‌اکسیدان Antioxidants (%)	قند محلول Soluble sugar (mg.g^{-1} DW)
کود مرغی Chicken manure (Kg.ha^{-1})				
0	8.952^{b}	3.532^{b}	45.31^{a}	18.59^{a}
1000	9.685^{b}	3.662^{b}	40.98^{b}	19.32^{a}
2000	10.793^{a}	4.475^{a}	37.37^{c}	19.81^{a}
سولوپتاس Soluptas (in 1000)				
0	9.092^{b}	3.376^{b}	46.59^{a}	17.85^{b}
1.5	9.579^{ab}	3.603^{b}	44.04^{a}	19.25^{b}
3	9.627^{b}	4.143^{a}	40.58^{b}	19.55^{ab}
5	10.943^{a}	4.437^{a}	33.68^{c}	20.31^{a}

اعداد دارای حروف مشابه در هر ستون براساس آزمون LSD در سطح احتمال پنج درصد معنی‌دار نیستند.

Numbers with the same letters in each column are not significant at the 5% of probability level based on the LSD test.

جدول ٦- اثر ساده کود مرغی و کود سولوپتاس بر کلروفیل برگ و عملکرد شنبلیله

Table 6- The simple effect of chicken manure and Solupotasfertilizer on the leaf chlorophyll and yield of fenugreek

تیمارها Treatments	کلروفیل a Chlorophyll a (mg.g^{-1} FW)	کلروفیل b Chlorophyll b (mg.g^{-1} FW)	عملکرد دانه Seed yield (kg.h^{-1})
کود مرغی (کیلوگرم در هکتار) Chicken manure (kg.ha^{-1})			
0	2.248^{b}	2.198^{b}	949.17^{b}
1000	2.332^{ab}	2.285^{b}	1058.3^{b}
2000	2.591^{a}	3.055^{a}	1185.8^{a}
سولوپتاس Solupotas (in 1000)			
0	2.47^{ab}	1.959^{b}	892.22^{b}
1.5	2.25^{b}	2.525^{b}	1083.3^{a}
3	2.63^{a}	2.671^{a}	1136.6^{a}
5	2.19^{b}	2.894^{a}	1145.5^{a}

اعداد دارای حروف مشابه در هر ستون براساس آزمون LSD در سطح احتمال پنج درصد معنی‌دار نیستند.

Numbers with the same letters in each column are not significant at the 5% of probability level based on the LSD test.

جدول ۷- اثر متقابل کود مرغی × کود سولوپتاس بر صفات بیوشیمیایی شنبلیله

Table 7- The interaction effect of chicken manure ×Solupotas fertilizer on the biochemical traits of fenugreek

کود مرغی Chicken manure (Kg.ha^{-1})	سولوپتاس *Solupotas* (in 1000)	فنل Phenol (mg.g^{-1} DW)	آنتی‌اکسیدان Antioxidants (%)	قند محلول Soluble sugar (mg.g^{-1} DW)
0	0	8.91^{cde}	49.28^{a}	16.64^{e}
	1.5	8.14^{e}	46.23^{abc}	17.16^{cde}
	3	10.13^{bcd}	44.83^{abc}	19.05^{abcd}
	5	8.61^{de}	40.89^{c}	21.53^{a}
1000	0	10.22^{bc}	43.05^{bc}	17.05^{de}
	1.5	8.35^{e}	44.58^{abc}	19.91^{abc}
	3	8.80^{cde}	43.10^{bc}	19.32^{abcde}
	5	11.35^{ab}	33.20^{d}	20.98^{ab}
2000	0	8.12^{e}	47.43^{ab}	19.85^{abcd}
	1.5	12.23^{a}	41.32^{c}	20.70^{ab}
	3	9.94^{bcd}	33.81^{d}	20.29^{ab}
	5	12.86^{a}	26.94^{e}	18.42^{bcde}

اعداد دارای حروف مشابه در هر ستون براساس آزمون LSD در سطح احتمال پنج درصد معنی‌دار نیستند.

Numbers with the same letters in each column are not significant at the 5% of probability level based on the LSD test.

جدول ۸- اثر متقابل کود مرغی × کود سولوپتاس بر عملکرد دانه و محتوی کلروفیل برگ شنبلیله

Table 8- The interaction effect of chicken manure ×Solupotas fertilizer on the yield and leaf chlorophyll content of fenugreek

تیمارها Treatments		عملکرد دانه Seed yield (kg.h^{-1})	کلروفیل a Chlorophyll a (mg.g^{-1} FW)	کلروفیل b Chlorophyll b (mg.g^{-1} FW)
کود مرغی Chicken manure (Kg.ha^{-1})	سولوپتاس Solupotas (in 1000)			
0	0	769^{e}	2.16^{cde}	2.29^{d}
	1.5	730^{e}	2.37^{bcde}	2.10^{d}
	3	1156^{abc}	2.46^{bcde}	2.11^{d}
	5	1150^{abc}	2.00^{de}	2.26^{d}
1000	0	946^{cde}	2.43^{bcde}	1.41^{e}
	1.5	1260^{ab}	1.91^{e}	2.05^{d}
	3	1136^{bcd}	2.32^{bcde}	2.87^{c}
	5	890de	2.64^{abc}	2.79^{c}
2000	0	970^{cde}	2.83^{a}	2.16^{d}
	1.5	1260^{ab}	2.49^{bcd}	3.41^{ab}
	3	1116^{bcd}	3.11^{a}	3.01^{bc}
	5	1396^{a}	1.92^{e}	3.62^{a}

اعداد دارای حروف مشابه در هر ستون براساس آزمون LSD در سطح احتمال پنج درصد معنی‌دار نیستند.

Numbers with the same letters in each column are not significant at the 5% of probability level based on the LSD test.

در تأیید نتایج به‌دست آمده از این تحقیق، صالحی و همکاران (Salehi *et al.*, 2017) با بررسی تغذیه گیاه دارویی شنبلیله با کودهای آلی و شیمیایی به این نتیجه رسیدند که کود تلفیقی در شنبلیله، عملکرد دانه را نسبت به کودهای شیمیایی افزایش داد. همچنین روستایی و فلاح (Rostaei & Fallah, 2016) بیشترین عملکرد دانه هر دو گیاه را از تیمار یک ردیف سیاهدانه + دو ردیف شنبلیله تغذیه شده از منبع کود تلفیقی (۵۰ درصد کود مرغی +۵۰ درصد کود شیمیایی) گزارش کردند. در آزمایشی که روی اثر نوع و مقدار کود دامی بر عملکرد پنبه (*Gossypium*) صورت گرفت، نتایج نشان داد که کود مرغی به‌میزان ۲۰ تن در هکتار بیشترین عملکرد پنبه را تولید کرد (Houshyarifard & Qaranchik, 2009). در نتایجی مشابه روی گیاه شنبلیله گزارش شده است که محلول‌پاشی پتاسیم در بالاترین سطح (۴۰۰ میلی‌گرم در ۱۰۰ لیتر) سبب افزایش معنی‌دار عملکرد کل نسبت به شاهد شد (Naser, 2017). همچنین در پژوهشی دیگر، عملکرد دانه شنبلیله در تیمار تغذیه شیمیایی (۱۰۰، ۱۲۰ و ۱۵۰ کیلوگرم در هکتار به‌ترتیب اوره، سوپرفسفات تریپل و سولفات پتاسیم) بیشترین افزایش را داشت (Esmaeilian & Jalali, 2022).

نتیجه‌گیری

در تولید گیاهان دارویی علاوه‌بر شرایط آب‌وهوایی، فاکتورهای خاکی نیز از اهمیت خاصی برخوردار هستند. عناصر غذایی نه تنها در افـزایش میـزان محصـول گیاهـان داروپـی همانند بقیه گیاهان مؤثر هستند، بلکه کیفیت محصول تولیـدی را نیـز تغییر می‌دهند. استفاده از کود مرغی به‌خصوص در مناطق خشک و نیم خشک که عمدتاً از سطح ماده آلی پایین برخوردارند، علاوه‌بر افزایش ماده آلی خاک و فراهمی عناصر غذایی می‌تواند خصوصیات فیزیکی، شیمیایی و بیولوژیکی این خاک‌ها را بهبود بخشد.

در صفات عملکرد و بیوشیمیایی این آزمایش مشاهده شد که کود مرغی در همه صفات به‌جز میزان قند محلول و فعالیت آنتی‌اکسیدانی، سبب افزایش معنی‌دار صفات عملکرد و بیوشیمیایی شد. میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی با افزایش سطح کود مرغی کاهش یافت و قند محلول تحت تأثیر این کود قرار نگرفت. در تأثیر سولوپتاس بر صفت بیوشیمایی مشاهده شد که همه صفات به‌جز میزان فنل و فعالیت آنتی‌اکسیدانی، همگی در سطح سه در هزار دارای بالاترین میزان بودند که با سطح پنج در هزار اختلاف معنی‌داری نداشتند. اثر متقابل تیمارها نشان داد که بالاترین سطح دو کود مصرفی، بیشترین میزان صفات عملکرد و بیوشیمیایی را دارا بود، به‌جز فعالیت آنتی‌اکسیدانی که با افزایش سطوح کودی، میزان فعالیت آن کاهش یافت. در مجموع می‌توان نتیجه گرفت که در بین سطوح مورد بررسی در دو تیمار، سطح ۲۰۰۰ کود مرغی و ۳ در هزار سولوپتاس برای دستیابی به افزایش عملکرد دانه و صفات بیوشیمیایی، برای گیاه شنبلیله پیشنهاد می‌گردد.

References

1- Al-Taai, S.H.H. (2021). The Effect of fertilizer uses on environmental pollution: A review. *Review of International Geographical Education Online*, *11*(5), 3620-3529 .
2- Arisha, H., & Bradisi, A. (1999). Effect of mineral fertilizers and organic fertilizers on growth, yield and quality of potato under sandy soil conditions. *Zagazig Journal Agriculture Research, 26,* 391-405.
3- Ashnavar, M., Bahmanyar, M.A., & Akbarpour, V. (2014). Investigation on the effect of different sources of fertilizers on growth indices and yield of coneflower (*Echinacea purpurea* L.) as a medicinal plant. *Journal of Agroecology*, *6*(2), 266-274. (In Persian with English abstract). https://doi.org/10.22067/JAG.V6I2.39510
4- Badr, L., & Fekry, W. (1998). Effect of intercropping and doses of fertilization on growth and productivity of taro and cucumber plants. 1-vegetative growth and chemical constituents of foliage. *Zagazig Journal of Agriculture Research, 25,* 1087-1101 .
5- Birjely, H.M.S., & Al-Atrushy, S.M.M. (2017). Effect of some organic and non-organic fertilizers on some parameters of growth and berries quality of grape cv. Kamali. *Kufa Journal for Agricultural Sciences*, *9*(3), 262-274.
6- Chuah, A.M., Lee, Y.C., Yamaguchi, T., Takamura, H., Yin, L.J., & Matoba, T. (2008). Effect of cooking on the antioxidant properties of coloured peppers. *Food Chemistry, 111*(1), 20-28 . https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.03.022
7- Constán-Aguilar, C., Leyva, R., Romero, L., Soriano, T., Blasco, B., & Ruiz, J.M. (2015). The effect of potassium biofortification over yield and nutritional quality of cherry tomato fruits. *American Journal of Advanced Food Science Technology, 3*(2), 67-93. https://doi.org/10.7726/ajafst.2015.1006
8- Esmaeilian, Y., & Jalali, A. (2022). Evaluation of quantitative, qualitative, and economic aspects of garlic (*Allium sativum* L.) and fenugreek (*Trigonella foenum-graceum* L.) intercropping under organic and chemical nutrition systems. *Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants Research*, *38*(1), 133-149. (In Persian with English Summary). https://doi.org/10.22092/ijmapr.2022.354814.3003
9- Fanasca, S., Colla, G., Maiani, G., Venneria, E., Rouphael, Y., Azzini, E., & Saccardo, F. (2006). Changes in antioxidant content of tomato fruits in response to cultivar and nutrient solution composition. *Journal of Agricultural Food Chemistry, 54*(12), 4319-4325. https://doi.org/10.1021/jf0602572
10- Fereidooni, M.J., Maghsoudi, E., Mojabghasroldashti, A., & Behzadi, Y. (2018). Investigation the effect of different fertilizing levels from various sources on yield, and grain quality of sweet corn. *Journal of Plant Ecophysiology, 10*(33), 79-89. (In Persian with English abstract). https://doi.org/20.1001.1.20085958.1397.10.33.8.5
11- Ghahremani, A., Akbari, K., Yousefpour, M., & Ardalani, H. (2014). Effects of nano-potassium and nano-calcium chelated fertilizers on qualitative and quantitative characteristics of *Ocimum basilicum*. *International Journal for Pharmaceutical Research Scholars, 3*(12), 325-241 .
12- Heakal, M., Modaihsh, A., Mashhady, A., & Metwally, A. (1990). Combined effects of leaching fraction, salinity, and potassium content of waters on growth and water-use efficiency of wheat and barley. *Plant Soil*, *125*(2), 177-184. https://doi.org/10.1007/bf00010655
13- Houshyarifard, M., & Qaranchik, A. (2009). Effect of source and rate of manures on incidence and severity of important diseases, yield and yield components in cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *Iranian Society of Crops and Plant Breeding Sciences, 11*(3), 237-248. (In Persian with English abstract). http://doi.org/20.1001.1.15625540.1388.11.3.4.8
14- Kafi, M.G., Zamani, S., & Ghoraishi, G. (2009). Relative them together. *New Phytologist*, *14*(1), 63-79 .
15- Khaldbrin, B., & Islamzadeh, T. (2014). *Mineral nutrition of higher plants.* Shiraz University. https://doi.org/10.1016/b978-0-12-473542-2.x5000-7
16- Khalesro, S., & Malekian, H. (2017). Effects of vermicompost and humic acid on morphological traits, yield, essential oil content and component in organic farming of ajwan (*Trachyspermum ammi* L.). *Iranian Journal of Medicinal Aromatic Plants Research. 32*(6), 968-980. (In Persian with English abstract). https://doi.org/10.22092/ijmapr.2017.109314
17- Kheiry, A., Arghavani, M., & Khastoo, M. (2016). Effects of organic fertilizers application on morphophysiological characteristics of calendula (*Calendula officinalis* L.). *Iranian Journal of Medicinal Aromatic Plants Research, 31*(6), 1047-1057. (In Persian with English abstract). https://doi.org/10.22092/ijmapr.2016.105893
18- Lawrence, J.R., Ketterings, Q., & Cherney, J. (2008). Effect of nitrogen application on yield and quality of silage corn after forage legume- grass. *Agronomy Journal*, *100*(1), 73-79. https://doi.org/10.2134/agronj2007.0071
19- Lichtenthaler, H.K. (1987). Chlorophylls and carotenoids: Pigments of photosynthetic biomembranes. *In Methods in Enzymology*, *148*, 350-382. https://doi.org/10.1016/0076-6879(87)48036-1
20- Lv, X., Li, T., Wen, X., Liao, Y., & Liu, Y. (2017). Effect of potassium foliage application post-anthesis on grain filling of wheat under drought stress. *Field Crops Research*, *206*, 95-105. https://doi.org/10.1016/j.fcr.2017.02.015

21- Mahmood, F., Khan, I., Ashraf, U., Shahzad, T., Hussain, S., Shahid, M., Abid, M., & Ullah, S. (2017). Effects of organic and inorganic manures on maize and their residual impact on soil physico-chemical properties. *Journal of Soil Science Plant Nutrition, 17*(1), 22-32. https://doi.org/10.4067/s0718-95162017005000002
22- Mocready, R., Guggolz, J., Silviera, V., & Owens, H. (1950). Determination of starch and amylose in vegetables. Application to peas. *Analytical Chemistry, 22*, 1156-1158. https://doi.org/10.1021/ac60045a016
23- Naguib, A.E.M. M., El-Baz, F.K., Salama, Z.A., Hanaa, H.A.E.B., Ali, H.F., & Gaafar, A.A. (2012). Enhancement of phenolics, flavonoids and glucosinolates of broccoli (*Brassica olaracea*, var. Italica) as antioxidants in response to organic and bio-organic fertilizers. *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences, 11*(2), 135-142. https://doi.org/10.1016/j.jssas.2012.03.001
24- Naser, A.A. (2017). Study of response *Trigonella foenum-graecum* to spraying with high potassium (Miller) and high phosphor (Agroleaf). *Tikrit Journal of Pure Science, 22*(9), 6-10. https://doi.org/10.25130/tjps.v22i9.866
25- Neisani, S., Fallah, S., & Raiesi, F. (2011). The effect of poultry manure and urea on agronomic characters of forage Maize under drought stress conditions. *Journal of Agricultural Science and Sustainable Production, 21*(4), 63-74. (In Persian with English abstract)
26- Nguyen, P.M., Kwee, E.M., & Niemeyer, E.D. (2010). Potassium rate alters the antioxidant capacity and phenolic concentration of basil (*Ocimum basilicum* L.) leaves. *Food Chemistry, 123*(4), 1235-1241. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.05.092
27- Nojavan, S., Naseri, L., & Hasanpour, H. (2016). The effect of foliar spraying of potassium sulfate and zinc sulfate on some physical and chemical characteristics of red quince variety grapes. *Bi-quarterly Journal of Plant Production Technology, 8*(2), 195-213. (In Persian with English abstract). https://doi.org/10.22084/PPT.2016.1865
28- Oosterhuis, D.M., Loka, D.A., & Raper, T.B. (2013). Potassium and stress alleviation: Physiological functions and management of cotton. *Journal of Plant Nutrition Soil Science, 176*(3), 331-343. https://doi.org/10.1002/jpln.201200414
29- Prasad, D., Singh, R., & Singh, A. (2010). Management of sheath blight of rice with integrated nutrients. *Indian Phytopathology, 63*(1), 11 .
30- Rostaei, M., & Fallah, S. (2016). Assessment of canopy characteristics and essential oil yeild of fenugreek and black cumin in intercropping under application of organic and chemical ferilizer. *Journal of Agricultural Science and Sustainable Production, 25*(4), 1-23. (In Persian with English abstract)
31- Salama, Z.A., El Baz, F.K., Gaafar, A.A., & Zaki, M.F. (2015). Antioxidant activities of phenolics, flavonoids and vitamin C in two cultivars of fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.) in responses to organic and bio-organic fertilizers. *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences, 14*(1), 91-99. https://doi.org/10.1016/j.jssas.2013.10.004
32- Salehi, A., Fallah, S., Abasi Sourki, A., & Tadayon, M.R. (2017). Evaluation of yield and yield components of fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* L.) and buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) under organic and chemical fertilizers *Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants Research, 33*(2), 338-352. (In Persian with English abstract). https://doi.org/10.22092/ijmapr.2017.106802.1804
33- Samavat, S., Pazki, A.R., Laden Moghadam, A.R., & Samawat, S. (2017). *Applied principles of organic materials in agriculture*. Publications of Islamic Azad University, Garmsar branch. (In Persian)
34- Sanei, S.J., & Razavi, S.I. (2018). Effects of potassium nitrate on growth and photosynthetic pigments of basil under *Colletotrichum gloeosporioides* infection. *Horticultural Plants Nutrition, 1*(1), 49-58. (In Persian with English abstract). https://doi.org/10.22070/HPN.2018.454
35- Scharf, P.C., Kitchen, N.R., Sudduth, K.A., Davis, J.G., Hubbard, V.C., & Lory, J.A. (2005). Field‐ scale variability in optimal nitrogen fertilizer rate for corn. *Agronomy Journal, 97*(2), 452-461. https://doi.org/10.2134/agronj2005.0452
36- Serra Bonvehí, J., Soliva Torrentó, M., & Centelles Lorente, E. (2001). Evaluation of polyphenolic and flavonoid compounds in honeybee-collected pollen produced in Spain. *Journal of Agricultural Food Chemistry, 49*(4), 1848-1853. https://doi.org/10.1021/jf0012300
37- Soares, A.G., Trugo, L.C., Botrel, N., & da Silva Souza, L.F. (2005). Reduction of internal browning of pineapple fruit (*Ananas comusus* L.) by preharvest soil application of potassium. *Postharvest Biology Technology, 35*(2), 201-207. https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2004.07.005
38- Tabatabaei, S.J. (2018). *Principles of plant mineral nutrition*. First edition, author's publications. Tabriz, Iran.
39- Taber, H., Perkins-Veazie, P., Li, S., White, W., Rodermel, S., & Xu, Y. (2008). Enhancement of tomato fruit lycopene by potassium is cultivar dependent. *HortScience, 43*(1), 159-165. https://doi.org/10.21273/hortsci.43.1.159
40- Tavallali, V., Esmaili, S., & Karimi, S. (2018). Nitrogen and potassium requirements of tomato plants for the optimization of fruit quality and antioxidative capacity during storage. *Journal of Food Measurement Characterization, 12*(2), 755-762. https://doi.org/10.1007/s11694-017-9689-9
41- Tehranifar, A., & Tabar, S.M. (2009). Foliar application of potassium and boron during pomegranate (*Punica granatum*) fruit development can improve fruit quality. *Horticulture Environment Biotechnology, 50*(3), 191-196 .

42- Turkmen, N., Sari, F., & Velioglu, Y.S. (2005). The effect of cooking methods on total phenolics and antioxidant activity of selected green vegetables. *Food Chemistry*, *93*(4), 713-718. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.12.038
43- Vojodi Mehrabani, l. (2020). The effects of organic and chemical fertilizers on some morphological and physiological traits of Petroselinum crispum *Journal of Plant Ecophysiology*, *12*(2), 86-96. (In Persian with English abstract). http://doi.org/20.1001.1.20085958.1399.12.41.8.5
44- Wani, S.A., & Kumar, P. (2018). Fenugreek: A review on its nutraceutical properties and utilization in various food products. *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences*, *17*, 97–106. https://doi.org/10.1016/j.jssas.2016.01.007
45- Yazdani Biuki, R., Rezvani Moghaddam, P., Khazaie, H.R., & Astaraei, A. (2010). Qualitative and qualitative characteristics of milk thistle (*Silybum marianum* L.) in response to organic, biological and chemical fertilizers *Journal of Agroecology*, *2*(4), 548-555. (In Persian with English abstract). http://doi.org/0.22067/JAG.V2I4.8783
46- Zahoor, R., Zhao, W., Dong, H., Snider, J.L., Abid, M., Iqbal, B., & Zhou, Z. (2017). Potassium improves photosynthetic tolerance to and recovery from episodic drought stress in functional leaves of cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *Plant Physiology Biochemistry*, *119*, 21-32. https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2017.08.011
47- Zgallaï, H., Steppe, K., & Lemeur, R.J.J.O.I.P.B. (2006). Effects of different levels of water stress on leaf water potential, stomatal resistance, protein and chlorophyll content and certain anti‐ oxidative enzymes in tomato plants. *Journal of Integrative Plant Biology*, *48*(6), 679-685. https://doi.org/10.1111/j.1744-7909.2006.00272.x
48- Zhao, X., Liu, Y., Liu, X., & Jiang, J. (2018). Comparative transcriptome profiling of two tomato genotypes in response to potassium-deficiency stress. *International Journal of Molecular Sciences*, *19*(8), 2402. https://doi.org/10.3390/ijms19082402
49- Zörb, C., Senbayram, M., & Peiter, E. (2014). Potassium in agriculture–status and perspectives. *Journal of plant physiology*, *171*(9), 656-669. https://doi.org/10.1016/j.jplph.2013.08.008

Journal of Horticultural Science
https://jhs.um.ac.ir

Research Article
Vol. 38, No. 2, Summer 2024, p. 407-418

The Effect of Phosphate Solubilizing Bacteria on the Amount of Morphine, Papaverine, and Noscapine Alkaloids of *Papaver somniferum* L.

S. Samavat[1*], M. Salehi Vozhdehnazari[2], M. Yahyazadeh Balalami[1], M. Rahimifard[1]
1 and 2- Assistant Professor and Ph.D., Research Institute of Forests and Rangelands, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Tehran, Iran, respectively.
(*- Corresponding Author Email: samaneh.samavat@gmail.com)

Received:	04-12-2023	**How to cite this article:** Samavat, S., Salehi Vozhdehnazari, M., Yahyazadeh Balalami, M., & Rahimifard, M. (2024). The effect of phosphate solubilizing bacteria on the amount of morphine, papaverine, and noscapine alkaloids of *Papaver somniferum* L.. *Journal of Horticultural Science*, *38*(2), 407-418. (In Persian with English abstract). https://doi.org/10.22067/jhs.2024.85697.1306
Revised:	29-01-2024	
Accepted:	13-02-2024	
Available Online:	13-02-2024	

Introduction
So far, more than 40 different types of alkaloids have been known in poppy (*Papaver somniferum* L.) as a valuable medicinal plant, the most important of which are morphine, codeine, thebaine, noscapine, and papaverine. The biosynthesis of these alkaloids may be strongly influenced by a variety of biotic and abiotic elicitors. In fact, microbes as biotic elicitors can affect the production of poppy alkaloids. Among them, plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) can be noticed, which stimulate and improve plant growth through various mechanisms such as mineral phosphate solubilization, plant hormone production, siderophores secretion, nitrogen fixation, etc. The use of PGPR agents can not only lead to an increase in plant biomass, but simultaneously, due to their role as biotic elicitors, they cause to an increase in the biosynthesis of secondary metabolites in plants. These biotic elicitors target plants' defense mechanisms and result in triggering a series of metabolic changes throughout the plant. The use of PGPR agents to stimulate the plant to produce secondary metabolites has several advantages: First, in some plants, defensive metabolites are active biological compounds that lead to the induction of food production with high added-value in the plants. Secondly, physiologically, with the increase in the synthesis of secondary metabolites, the resistance of the plant against pathogens also increases. Accordingly, the present study was performed with the aim of investigating the effects of bacterial strains with the ability to solubilize inorganic phosphate as biotic elicitors on the amount of morphine, papaverine, and noscapine alkaloids in *P. somniferum*.

Materials and Methods
In this research, the solubility of inorganic phosphate by four bacterial strains including *Enterobacter xiangfangensis* S2, *Pantoea dispersa* S7, *Pantoea stewartii* S25, and *Pseudomonas canadensis* S36 was evaluated quantitatively using Sperber broth medium. Under greenhouse conditions, the effect of foliar spraying of *P. somniferum* plants with a suspension of the bacterial strains (10^8 CFU.ml^{-1}) on the amount of morphine, papaverine, and noscapine in the plants' capsules, stems, and leaves was investigated. About three weeks after the appearance of capsules in poppy plants, the aerial parts of the plants (stems, leaves, and capsules) were sprayed with the bacterial suspensions. One week after foliar spraying, poppy plants were harvested in order to determine the amount of the desired alkaloids. Three pots were considered for each treatment and there were three poppy plants in each pot. Alkaloids were extracted based on an alcoholic method and detected using HPLC. Morphine and noscapine standards were prepared at a concentration of 1000 µg.ml^{-1} and papaverine standard at a concentration of 250 µg/ml. Then the mixture was prepared in proportions of 1, 1:50, 1:10, 1:50 and 1:100 and injected into the HPLC set to draw the calibration curve. All the experiments were conducted in a form of completely randomized design with three replications for each treatment (P<0.05).

©2024 The author(s). This is an open access article distributed under Creative Commons Attribution 4.0 International License (CC BY 4.0).

https://doi.org/10.22067/jhs.2024.85697.1306

Results and Discussion

The results showed that the highest (458.67 µg.ml^{-1}) and the lowest (130.47 µg.ml^{-1}) phosphate solubility were related to S2 and S36 strains, respectively. S7 and S25 strains were not statistically significantly different from each other and after S2 strain, they were placed in the second statistical position. In the bacterial strains' treatments, the level of morphine in the stems and leaves as well as the capsules increased significantly in most cases compared to the control. The amount of papaverine in the stems and leaves decreased significantly, but it had no significant changes in the capsule. Also, noscapine showed a significant increase in the stems and leaves and reached from 0.8 mg.g^{-1} DW in the control to 8.12 in the S2 treatment. While, the amount of noscapine increased significantly in the capsules, only in the S2 and S36 treatments. Other strains did not show significant differences with the control for noscapine content in the capsules. The results showed that the interaction effects of the type of the alkaloids and the use of phosphate solubilizing bacterial strains on the concentration of the studied alkaloids in poppy stems, leaves and capsules are significant ($P<0.01$).

Conclusion

It can be concluded that there is no need to apply genetic engineering to increase the production of valuable secondary metabolites by medicinal plants. Rather, this goal can be achieved much cheaper by using bacterial elicitors. Accordingly, by selecting compatible and efficient bacterial strains with phosphate solubilizing activity, the amounts of morphine, papaverine, and noscapine alkaloids in the aerial parts of *P. somniferum* as a valuable medicinal plant can be noticeably increased.

Keywords: Alkaloid, Bacterium, Elicitor, HPLC, PGPR

نشریه علوم باغبانی
https://jhs.um.ac.ir

مقاله پژوهشی
جلد ۳۸، شماره ۲، تابستان ۱۴۰۳، ص. ۴۱۸-۴۰۷

اثر باکتری‌های حل‌کننده فسفات بر میزان آلکالوئیدهای مورفین، پاپاورین، و نوسکاپین خشخاش (*Papaver somniferum* L.)

سمانه سماوات[1]* - مهدیه صالحی وژده نظری[2] - مهدی یحیی‌زاده بلالمی[1] - مهشید رحیمی فرد[1]

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۹/۱۳
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۱۱/۲۴

چکیده

تاکنون بیش از ۴۰ نوع آلکالوئید مختلف در گیاه دارویی و ارزشمند خشخاش (*Papaver somniferum* L.)، شناخته شده که مهم‌ترین آن‌ها مورفین، کدئین، تباءین، نوسکاپین و پاپاورین است. بیوسنتز این آلکالوئیدها ممکن است به شدت تحت تأثیر انواعی از الیسیتورهای زنده و غیرزنده قرار گیرد. پژوهش حاضر با هدف بررسی اثرات سویه‌های باکتریایی با قابلیت حل‌کنندگی فسفات معدنی به‌عنوان الیسیتورهای زنده، بر میزان تولید آلکالوئیدهای مورفین، پاپاورین، و نوسکاپین در گیاه خشخاش انجام شده است. در این پژوهش، قابلیت حل‌کنندگی فسفات معدنی توسط چهار سویه باکتریایی *Enterobacter xiangfangensis* S2، *Pantoea dispersa* S7، *Pantoea stewartii* S25 و *Pseudomonas canadensis* S36 به‌روش کمّی و به کمک محیط کشت مایع Sperber ارزیابی شد. در شرایط گلخانه، اثر محلول‌پاشی بوته‌های خشخاش با سوسپانسیون سویه‌های باکتریایی (10^8 CFU.ml^{-1}) بر میزان آلکالوئیدهای مورفین، پاپاورین، و نوسکاپین موجود در کپسول، ساقه، و برگ خشخاش بررسی شد. آلکالوئیدها به‌روش الکلی استخراج و توسط دستگاه HPLC ردیابی شدند. تمامی آزمون‌ها در قالب طرح آماری کاملاً تصادفی و با سه تکرار به‌ازای هر تیمار انجام شدند ($P<0.05$). نتایج نشان داد که بیشترین (۴۵۸/۶۷ میکروگرم بر میلی‌لیتر) و کمترین (۱۳۰/۴۷ میکروگرم بر میلی‌لیتر) میزان حل‌کنندگی فسفات به‌ترتیب مربوط به سویه‌های S2 و S36 بود. در تیمار با سویه‌های باکتریایی مشخص شد که سطح مورفین موجود در ساقه و برگ و نیز کپسول در اغلب موارد افزایش معنی‌داری در قیاس با شاهد را نشان داد. میزان پاپاورین موجود در ساقه و برگ کاهش معنی‌داری داشت، ولی در کپسول تغییرات معنی‌داری نداشت. نوسکاپین موجود در ساقه و برگ نیز افزایش معنی‌داری داشت و از ۰/۸ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک در شاهد به ۸/۱۲ در تیمار S2 رسید. درصورتی‌که میزان نوسکاپین کپسول فقط در تیمار با S2 و S36 افزایش معنی‌داری داشت و سایر سویه‌ها اختلاف معنی‌داری با شاهد نداشتند. به این ترتیب با انتخاب سویه‌های باکتریایی سازگار و کارآمد از گروه باکتری‌های حل‌کننده فسفات، می‌توان سطح آلکالوئیدهای مورفین، پاپاورین، و نوسکاپین در اندام‌های هوایی گیاه دارویی و ارزشمند خشخاش را به‌طور چشمگیری افزایش داد.

واژه‌های کلیدی: آلکالوئید، الیسیتور، باکتری، HPLC، PGPR

مقدمه

خشخاش (*Papaver somniferum* L.) گیاهی علفی و یک ساله به ارتفاع ۳۰ تا ۸۰ سانتی‌متر، متعلق به تیره خشخاش (Papaveraceae) است. تاکنون برای این گونه، زیرگونه و واریته‌های مختلفی معرفی شده است. منشأ این گونه به احتمالی مناطق مدیترانه‌ای است و کشت آن به دوره ماقبل تاریخ برمی‌گردد. این گیاه بومی آسیا و اروپای جنوب شرقی است و به‌راحتی از مزرعه به رویشگاه‌های طبیعی نفوذ می‌نماید و تقریباً شکل انتشار طبیعی پیدا می‌کند. به لحاظ خصوصیات گیاه‌شناختی، دارای ساقه‌هایی قائم با و یا بدون انشعاب و به رنگ سبز تا سبز مایل به خاکستری است. ریشه‌های آن سطحی و دارای برگ‌های منفرد و متناوب تخم مرغی، مستطیلی یا قلبی به رنگ سبز کدر و دارای دندانه‌های عمیق است. گل‌های آن درشت است و در

۱ و ۲- به‌ترتیب استادیار و دکتری، مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران
(*- نویسندهٔ مسئول: Email: samaneh.samavat@gmail.com)

https://doi.org/10.22067/jhs.2024.85697.1306

واریته‌های مختلف به رنگ‌های سفید و یا قرمز مایل به بنفش دیده می‌شود. میوه آن از نوع کپسول کمویش کروی است که در قاعده دارای یک پایک کوتاه است. این گونه دارای سلول‌های خاص یا مجراهایی است که حاوی شیرابه شیری رنگی است. این شیرابه شامل ۱۰ تا ۱۵ درصد آب، ۲۰ درصد مواد قندی، مقادیری اسیدهای آلی همچون اسید لاکتیک، اسید اگزالواستیک و اسید فوماریک است. همچنین حاوی ۱۰ تا ۲۰ درصد آلکالوئید است (Yazdani *et al.*, 2003; Tavakkoli & Assadi, 2017).

آلکالوئیدها به‌دلیل سمیتی که دارند، به‌عنوان یک ابزار اصلی برای محافظت از گیاهان در برابر آفات عمل می‌کنند (Srivasatava, 2022). تاکنون بیش از ۴۰ نوع آلکالوئید در خشخاش شناسایی شده است که مهم‌ترین آن‌ها مورفین[1]، کدئین[2]، تبائین[3]، نوسکاپین[4]، و پاپاورین[5] است (Liscombe & Facchini, 2008). مورفین، آلکالوئید غالب گیاه خشخاش و یک مسکن طبیعی قوی است. کدئین و نوسکاپین به‌عنوان سرکوب‌کننده سرفه و پاپاورین شل‌کننده عضلات است. آلکالوئید تبائین مستقیماً برای درمان استفاده نمی‌شود، امّا به صورت صنعتی جهت ساخت مسکن‌های دیگر کاربرد دارد (Meos *et al.*, 2017). میزان بیوسنتز آلکالوئیدهای خشخاش علاوه‌بر خصوصیات ژنتیکی گیاه، به‌شدت تحت تأثیر فاکتورهای محیطی مختلف اعم از زنده و غیرزنده است (Facchini, 2001; Bourgaud *et al.*, 2001; Szabó *et al.*, 2008).

از عوامل غیرزنده مؤثر بر غلظت آلکالوئیدهای تولید شده در خشخاش، می‌توان به نور، دما، و انواعی از ترکیبات شیمیایی اشاره کرد (Srivastava & Sharma, 1990; Bennett *et al.*, 2004; Kim *et al.*, 2005). از بین عوامل زنده نیز باکتری‌ها، قارچ‌ها و حشرات از اهمیت زیادی برخوردار هستند (Alcantara *et al.*, 2005; Ramos-Solano *et al.*, 2008; Silva *et al.*, 2004). در واقع، عوامل میکروبی اعم از بیماریزا و غیربیماریزا در نقش الیسیتور[6]های زنده می‌توانند میزان تولید آلکالوئیدهای خشخاش را تحت تأثیر قرار دهند. از جمله این عوامل می‌توان به باکتری‌های محرک رشد گیاه (PGPR)[7] اشاره کرد که از طریق مکانیسم‌های مختلفی نظیر حل‌کنندگی فسفات معدنی، تولید هورمون‌های رشد گیاهی، ترشح سیدروفورها، تثبیت نیتروژن، و غیره منجر به تحریک و بهبود رشد گیاهان نیز می‌شوند. تاکنون سویه‌ها و جدایه‌های متعددی از جنس‌های *Flavobacterium*، *Pseudomonas*، *Bacillus*، *Agrobacterium*، *Pantoea*، *Rhizobium*، *Aereobacter*، *Burkholderia*، *Achromobacter*، *Erwinia*، *Micrococcus*، و *Azotobacter* به‌عنوان عوامل PGPR مورد توجه قرار گرفته‌اند (Rodríguez & Fraga, 1999).

به‌کارگیری عوامل PGPR، نه تنها می‌تواند منجر به افزایش زیست‌توده گیاهی شود، بلکه به‌طور همزمان به‌دلیل نقشی که به‌عنوان الیسیتورهای زنده دارند، منجر به افزایش بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه در گیاه می‌شود (Ramos-Solano *et al.*, 2010). این الیسیتورهای زنده مکانیسم‌های دفاعی در گیاهان را مورد هدف قرار می‌دهند و منتج به تحریک یک سری تغییرات متابولیکی در سرتاسر گیاه می‌شوند و به این طریق، گیاه متابولیسم دفاعی خود را تقویت می‌کند (van Loon *et al.*, 1998). به‌کارگیری عوامل PGPR به‌منظور تحریک گیاه به تولید متابولیت‌های ثانویه دارای مزایای متعددی است؛ نخست اینکه، در برخی از گیاهان، متابولیت‌های دفاعی ترکیبات زیستی فعالی هستند که منجر به القای تولید مواد غذایی با ارزش افزوده بالا در گیاه می‌شوند (Algar *et al.*, 2012). به‌عنوان مثال، در گیاه دارویی گل انگشتانه (*Digitalis lanata* L.) (Gutiérrez *et al.*, 2003) و نیز سویا (Algar *et al.*, 2012) منجر به افزایش سطح ایزوفلاون‌ها[8] می‌شوند. ثانیاً، به لحاظ فیزیولوژیکی، با افزایش سنتز متابولیت‌های ثانویه، مقاومت گیاه در برابر عوامل بیماری‌زا نیز افزایش می‌یابد (Ramos-Solano *et al.*, 2008; Conrath *et al.*, 2006). به‌طور مثال، این عوامل می‌توانند منجر به تقویت سیستم دفاعی در گیاه مدل *Arabidopsis thaliana* در برابر بیمارگرها شوند (Ramos-Solano *et al.*, 2008).

تاکنون مطالعات معدودی از نقش عوامل PGPR به‌عنوان الیسیتورهای زنده در بهبود تولید متابولیت‌های ثانویه در گیاهان دارویی، به‌خصوص گیاه خشخاش انجام شده است. بر این اساس، پژوهش حاضر با هدف بررسی اثرات سویه‌هایی از عوامل PGPR با قابلیت حل‌کنندگی فسفات معدنی بر میزان تولید آلکالوئیدهای مورفین، پاپاورین و نوسکاپین در گیاه خشخاش انجام شده است.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی

بذور خشخاش (*P. somniferum*) از رویشگاه‌های طبیعی واقع در استان فارس در عرض جغرافیایی "۵۶ '۱۰ °۳۵ شمالی و طول جغرافیایی "۱۷ '۲۳ °۵۹ شرقی، در طی تیر ۱۴۰۱ جمع‌آوری شد.

1- Morphine
2- Codeine
3- Thebaine
4- Noscapine
5- Papaverine
6- Elicitor
7- Plant growth promoting rhizobacteria
8- Isoflavones

سویه‌های باکتری

چهار سویه باکتریایی (S2, S7, S25, S36) که پیشتر براساس توانایی در حل‌کنندگی فسفات معدنی و ایجاد هاله شفاف در اطراف کلنی خود در محیط کشت Sperber (Sperber, 1958)، غربالگری و شناسایی شده بودند، از کلکسیون میکروبی مؤسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع کشور دریافت شد. اطلاعات مربوط به سویه‌ها در جدول ۱ آورده شده است.

جدول ۱- خصوصیات سویه‌های باکتریایی مورد استفاده در پژوهش حاضر

Table 1- The characteristics of the bacterial strains used in this research

سویه Strain	گونه Species	شماره دسترسی Accession number	طول توالی Sequence length (kb)
S2	*Enterobacter xiangfangensis*	MW687115	1460
S7	*Pantoea dispersa*	MW687122	1472
S25	*Pantoea stewartii*	MW704276	633
S36	*Pseudomonas canadensis*	MW687114	1464

بررسی توانایی سویه‌های باکتریایی در حل‌کنندگی فسفات معدنی به‌روش کمّی

برای بررسی توان سویه‌ها در انحلال تری کلسیم فسفات به‌عنوان منبع فسفات معدنی نامحلول از محیط کشت مایع Sperber (دکستروز ۱۰ گرم بر لیتر، عصاره مخمر ۰/۵ گرم بر لیتر، کلرید کلسیم ۰/۱۴ گرم بر لیتر، سولفات منیزیوم ۰/۳۲ گرم بر لیتر، تری کلسیم فسفات ۲/۵ گرم بر لیتر، آب مقطر ۱۰۰۰ میلی‌لیتر، اسیدیته ۷)، استفاده شد. ابتدا سویه‌های باکتریایی به‌مدت ۴۸ ساعت در محیط جامد Sperber در سه تکرار رشد داده شدند. سپس ۵۰ میکرولیتر از سوسپانسیون هر باکتری به ارلن ۱۰۰ میلی‌لیتری حاوی ۲۵ میلی‌لیتر محیط مایع Sperber منتقل شد. ارلن‌ها به‌مدت ۱۲۰ ساعت داخل شیکر انکوباتور با سرعت ۱۲۰ دور بر دقیقه و دمای ۲±۲۷C° تکان داده شدند. به‌طور هم‌زمان سوسپانسیون باکتری سانتریفوژ شده و یک میلی‌لیتر از محلول رویی با یک میلی‌لیتر از محلول مولیبدات وانادات رقیق کرده و سپس با سه میلی‌لیتر آب مقطر مخلوط گردید. بعد از گذشت یک ساعت، میزان جذب نور با استفاده از اسپکتروفتومتر در ۴۷۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. مقدار فسفر محلول آزاد شده توسط هر سویه براساس منحنی استاندارد تهیه شده از غلظت‌های مختلف KH_2PO_4 محاسبه شد (Alikhani *et al.*, 2014).

مطالعات گلخانه‌ای

در مهرماه سال ۱۴۰۱، بذور خشخاش در گلدان‌هایی با ابعاد ۱۴cm × ۱۵ cm × ۱۵ cm که محتوی بستری به وزن تقریبی ۲۲۰۰ گرم با ترکیب خاک زراعی، ماسه شسته شده، خاک برگ و کود گاوی پوسیده (۲:۱:۱:۱) بود، کشت شدند. پس از کشت بذور، گلدان‌ها به گلخانه پژوهشی مؤسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع کشور در دمای ۲±۲۵C°، با شدت نور ۳۰۰۰ لوکس منتقل شدند. در طی دوره داشت (۱۵۰ روز)، گلدان‌ها به‌صورت یک روز در میان آبیاری می‌شدند و وجین علف‌های هرز انجام می‌شد. مرحله برداشت بوته‌های خشخاش تیمار شده در خرداد سال ۱۴۰۲ انجام گرفت.

تیمار بوته‌های خشخاش با سویه‌های باکتریایی

در ابتدا از کشت ۴۸ ساعته سویه‌های باکتریایی بر روی محیط کشت NA سوسپانسیونی با جمعیت 10^8 CFU.ml^{-1} تهیه شد. به منظور کاهش کشش سطحی، به سوسپانسیون حاصل به‌میزان (V/V) ۰/۰۵ درصد توین ۲۰ (Tween 20) اضافه شد. شاهد فقط شامل مخلوط آب مقطر استریل و توین ۲۰ بود. حدود سه هفته پس از ظهور کپسول در بوته‌های خشخاش، اندام‌های هوایی گیاه (ساقه، برگ، و کپسول) توسط سوسپانسیون باکتری‌ها محلول‌پاشی شدند. یک هفته پس از محلول‌پاشی، بوته‌های خشخاش به‌منظور ردیابی و تعیین میزان آلکالوئیدهای مورد نظر برداشت شدند. به‌ازای هر تیمار سه گلدان در نظر گرفته شد و در هر گلدان نیز سه عدد بوته خشخاش موجود بود.

استخراج آلکالوئیدها

جهت استخراج آلکالوئیدها از بافت گیاهی خشخاش‌های تیمار شده با سویه‌های باکتریایی، نمونه‌های گیاهی (ساقه، برگ، و کپسول) خشک شده با دستگاه آسیاب برقی پودر شدند. به‌۳۰ میلی‌گرم از نمونه‌های گیاهی خشک و پودر شده، ۱/۵ میلی‌لیتر متانول ۸۰ درصد (pH=4) اضافه گردید. مخلوط حاصل به‌مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۵۰°C در داخل حمام التراسونیک (Bandelin sonorex, DL) گذاشته شد تا عصاره آن استخراج شود. بعد از هر مرحله از استخراج، نمونه‌ها جهت جداسازی ذرات معلق به‌مدت ۱۵ دقیقه در ۱۳۰۰۰ g سانتریفیوژ شدند و مجدداً تا سه مرتبه تمام مراحل استخراج جهت استخراج حداکثری آلکالوئیدها تکرار شد. در نهایت، ماحصل هر سه مرحله عصاره‌گیری با هم ترکیب و ۲۰ میکرولیتر از این مخلوط جهت جداسازی ترکیبات به دستگاه HPLC تزریق شد (Paulsen *et al.*,

2015). قبل از تزریق نمونه‌ها به دستگاه HPLC، مخلوطی از غلظت های مختلف استانداردهای آلکالوئیدی جهت رسم منحنی شیب خط به دستگاه تزریق شدند. نوع ستون مصرفی در HPLC از نوع ۱۸C–RP و حلال مورد استفاده، متانول و آب حاوی دو درصد استیک اسید بود. ردیاب از نوع ماورای بنفش و طول موج مورد استفاده ۲۸۰ نانومتر بود.

مشخصات دستگاه HPLC

تجزیه HPLC نمونه‌ها با استفاده از یک سیستم گرادیانت با استفاده از ستون Nucleosil RP-18 (5µ) 100 Å توسط دستگاه Agilent سری ۱۲۰۰ انجام شد. دو حلال مورد استفاده در این سیستم گرادیانت شامل A– متانول حاوی دو درصد اسید استیک؛ B– آب حاوی دو درصد اسید استیک بود. برنامه گرادیانت HPLC در نقطه ابتدایی شامل ۱۰ درصد از حلال A و ۹۰ درصد از حلال B بود که این نسبت تا دقیقه ۵ همچنان بدون تغییر بود. از دقیقه ۵ تا دقیقه ۲۰، درصدها در مورد A و B به‌صورت گرادیانت به‌ترتیب به ۸۵ درصد و ۱۵ درصد رسید. سرعت جریان و حجم تزریق نمونه‌ها به دستگاه به ترتیب یک میلی‌لیتر در دقیقه و ۲۰ میکرولیتر بود. پایش آلکالوئیدهای مورفین، پاپاورین و ناسکاپین توسط آشکارساز ماورای بنفش در ۲۸۰ نانومتر انجام شد. کمّی‌سازی غلظت این ترکیبات آلکالوئیدی براساس یک منحنی کالیبراسیون با استفاده از پنج رقت سریال استاندارد پاپاورین بود که از ۲۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر تا پنج میکروگرم در میلی‌لیتر متغیر بود. استانداردهای مورد استفاده در این تحقیق از شرکت تولید مواد اولیه داروپخش (تماد) خریداری شده بود.

خصوصیات و مقادیر استانداردها

استانداردهای مورفین و نوسکاپین به غلظت ۱۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر و استاندارد پاپاورین به غلظت ۲۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر تهیه شد. سپس مخلوط به نسبت‌های ۱، ۱:۵۰، ۱:۱۰، ۱:۵۰ و ۱:۱۰۰ تهیه و به دستگاه HPLC جهت رسم منحنی کالیبراسیون تزریق شد.

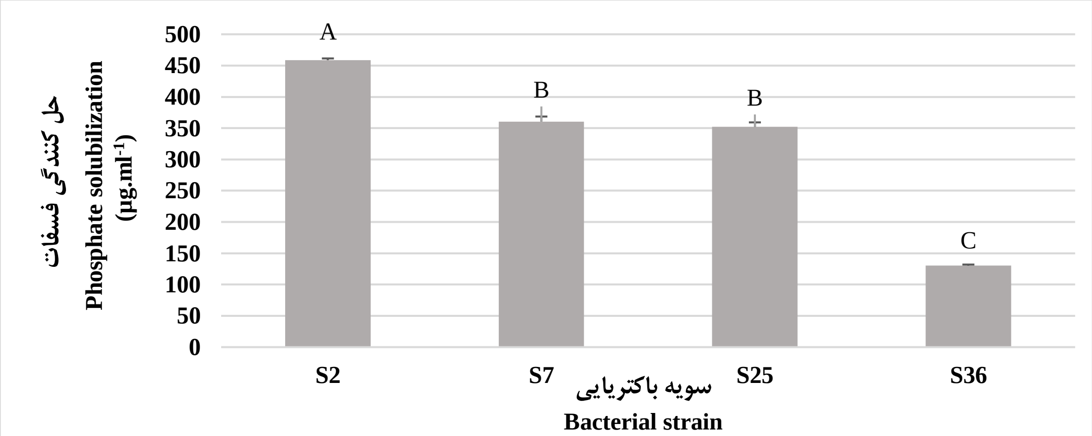
تجزیه و تحلیل داده‌های آماری

تمامی آزمایش‌ها در قالب طرح آماری کاملاً تصادفی و با سه تکرار به‌ازای هر تیمار انجام شد. داده‌های حاصل از پژوهش حاضر به کمک نرم‌افزار آماری (Version 26; SPSS Inc., IBM Company SPSS Chicago, USA)، تجزیه و تحلیل شدند و مقایسه میانگین‌ها نیز با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن انجام شد.

نتایج و بحث

توانایی سویه‌های باکتریایی در حل‌کنندگی فسفات معدنی به‌روش کمّی

همان‌گونه که در شکل ۱ نشان داده شده است، هر چهار سویه باکتریایی مورد بررسی از توانایی در حل‌کنندگی فسفات معدنی برخوردار بودند. بیشترین و کمترین میزان حل‌کنندگی فسفات به‌ترتیب مربوط به سویه‌های S2 و S36 بود. سویه‌های S7 و S25 نیز به لحاظ آماری اختلاف معنی‌داری با یکدیگر نداشتند و پس از سویه S2، در دومین جایگاه آماری قرار گرفتند. تجزیه واریانس داده‌های مربوطه در جدول ۲ آورده شده است.



شکل ۱- مقایسه توانایی سویه‌های باکتریایی در میزان حل‌کنندگی فسفات معدنی در محیط کشت مایع Sperber

Figure 1- Comparison of the ability of bacterial strains to solubilize inorganic phosphate in Sperber broth medium (DMRT, p<0.05) (n=3)

جدول ۲- تجزیه واریانس حل‌کنندگی فسفات توسط سویه‌های باکتریایی (P<0.05) (n=3)
Table 2- ANOVA for the solubility of phosphate by bacterial strains (P<0.05) (n=3)

منابع تغییرات S.O.V	درجه آزادی df	میانگین مربعات Mean squares	ارزش F F-value
تیمار Treatment	3	57698.6**	1820.42
تکرار Replication	2	31.5	0.99
خطا Error	6	31.7	
کل Total	11		

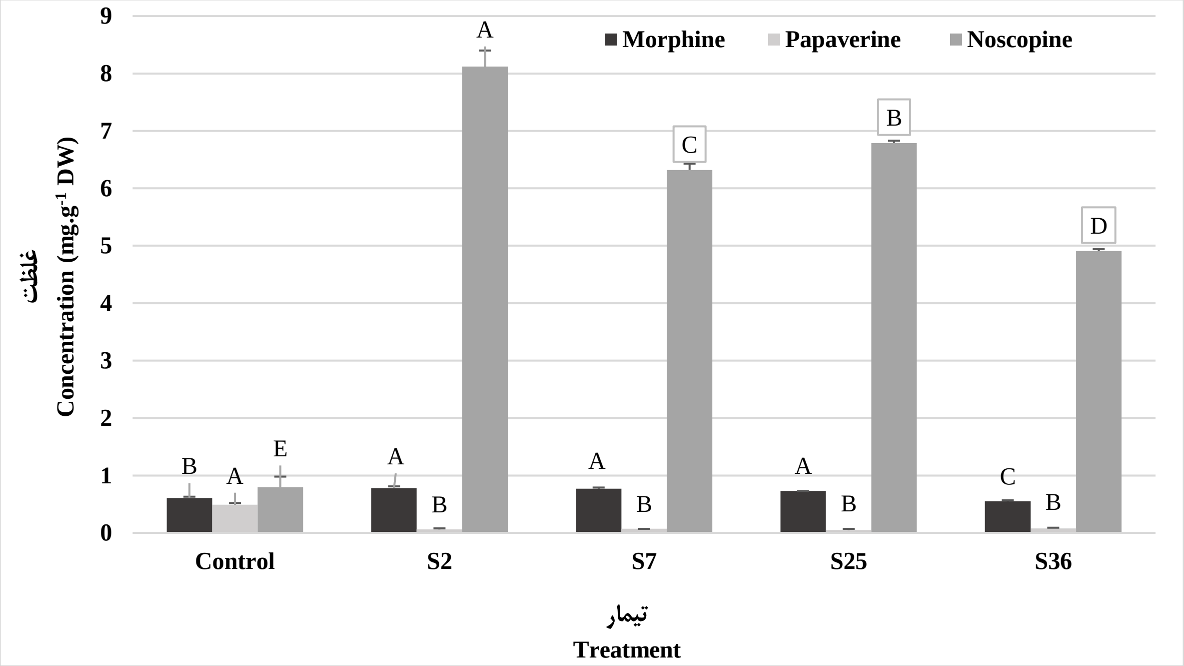
**: معنی‌داری در سطح احتمال ۱ درصد
**: significant at $p≤0.01$

به این ترتیب، نتایج حاصل از پژوهش حاضر نشان داد که سویه‌های باکتریایی بررسی شده که متعلق به گونه‌های *E. xiangfangensis*، *P. dispersa*، *P. stewartii* و *P. canadensis* بودند، از کارآمدی مطلوبی در حل‌کنندگی فسفات معدنی برخوردار بودند و می‌توان آن‌ها را به‌عنوان باکتری‌های حل‌کننده فسفات معرفی کرد. قریشی و اعتمادی فر (Ghoreishi and Etemadifar, 2017) نیز گزارش کردند که سویه بررسی شده که متعلق به *E. xiangfangensis* بود، از توانایی در تولید اسیدفسفاتاز و در نتیجه، حل‌کنندگی فسفات معدنی برخوردار بود. چن و همکاران (Chen *et al*., 2014) نشان دادند که باکتری *P. dispersa* از طریق تولید انواع از اسیدهای آلی قادر به حل‌کنندگی فسفات معدنی است. هو و همکاران (Hu *et al*., 2010) نیز اظهار داشتند که جدایه g6 از باکتری *P. stewartii* از کارایی بالایی به لحاظ حل‌کنندگی فسفات معدنی برخوردار بود. بلانکو-وارگس و همکاران (Blanco-Vargas *et al*., 2020) نیز نشان دادند که سویه‌های باکتریایی متعلق به جنس *Pseudomonas* sp. قادر به حل‌کنندگی فسفات معدنی هستند. به این ترتیب، نتایج حاصل از پژوهش حاضر با نتایج سایر پژوهشگران سازگاری دارد.

اثر سویه‌های باکتریایی بر غلظت برخی آلکالوئیدهای خشخاش

همان‌گونه که در شکل ۱ نشان داده شده است، تیمار بوته‌های خشخاش با سویه‌های باکتریایی حل‌کننده فسفات، در اغلب موارد منتج به بروز تغییرات معنی‌داری در سطح آلکالوئیدهای مورفین، پاپاورین، و نوسکاپین در ساقه و برگ خشخاش شد. در بررسی میزان آلکالوئید مورفین در ساقه و برگ خشخاش مشخص شد که تیمار با سویه‌های S2، S7 و S25 به‌طور معنی‌داری منجر به افزایش سطح مورفین در قیاس با شاهد شد (P<0.05). این در حالی است که تیمار با سویه S36 کاهش معنی‌داری در سطح مورفین در قیاس با شاهد منتج شد. تیمار با سویه‌های باکتریایی مورد مطالعه نیز منجر به کاهش معنی‌داری در غلظت آلکالوئید پاپاورین در ساقه و برگ خشخاش نسبت به شاهد شد. این در حالی است که میزان آلکالوئید نوسکاپین در ساقه و برگ خشخاش در تیمار با تمامی سویه‌های باکتریایی مورد مطالعه افزایش معنی‌داری در قیاس با شاهد نشان داد. بیشترین میزان افزایش به‌ترتیب مربوط به تیمار با سویه‌های S2، S25، S7، و S36 بود. نتایج تجزیه واریانس آورده شده در جدول ۳، نشان داد که اثر متقابل نوع آلکالوئید و به‌کارگیری سویه‌های باکتریایی حل‌کننده فسفات بر غلظت آلکالوئیدهای مورد مطالعه در ساقه و برگ خشخاش معنی‌دار است (P<0.01).

براساس نتایج آورده شده در شکل ۳، به‌کارگیری سویه‌های باکتریایی حل‌کننده فسفات منجر به افزایش معنی‌داری در میزان آلکالوئید مورفین موجود در کپسول بوته‌های خشخاش در قیاس با شاهد شد (P<0.05). از این نظر تیمارهای S25 و S36 در گروه اول آماری قرار گرفتند و با S2 اختلاف آماری معنی‌داری نشان ندادند. کمترین میزان آلکالوئید مورفین در کپسول خشخاش نیز مربوط به شاهد بود. این در حالی است که تیمار بوته‌های خشخاش با سویه‌های باکتریایی منجر به تغییر معنی‌داری در سطح آلکالوئید پاپاورین در کپسول خشخاش در قیاس با شاهد نشد. محلول‌پاشی سوسپانسیون سویه‌های S2 و S36 به‌طور معنی‌داری منجر به افزایش غلظت آلکالوئید نوسکاپین در کپسول خشخاش شد. این در حالی است که از این نظر تیمارهای S7 و S25 اختلاف آماری معنی‌داری با شاهد نشان ندادند (شکل ۳). نتایج تجزیه واریانس آورده شده در جدول ۴، نیز نشان داد که اثر متقابل نوع آلکالوئید و به‌کارگیری سویه‌های باکتریایی حل‌کننده فسفات بر غلظت آلکالوئیدهای مورد مطالعه در کپسول خشخاش معنی‌دار است (P<0.01).



شکل ۲- اثر سویه‌های باکتریایی حل‌کننده فسفات بر میزان آلکالوئیدهای مورفین، پاپاورین، و نوسکاپین ساقه و برگ خشخاش

Figure 2- The effect of phosphate-solubilizing bacterial strains on the amount of morphine, papaverine, and noscapine alkaloids in poppy stems and leaves (DMRT, *p*<0.05) (n=3)

جدول ۳- تجزیه واریانس اثر باکتری‌های حل‌کننده فسفات بر آلکالوئیدهای برگ و ساقه *P. somniferum*

Table 3- ANOVA for the effect of phosphate solubilizing bacteria on the alkaloids of *P. somniferum* leaves and stems

منابع تغییرات S.O.V	درجه آزادی Df	میانگین مربعات Mean squares	ارزش F F-value
آلکالوئیدها Alkaloids (A)	2	124.54**	15200.19
تیمار Treatment (T)	4	7.33**	895.19
تیمار × آلکالوئید A × T	8	8.24**	1006.18
خطا Error	30	0.01	
کل Total	44		

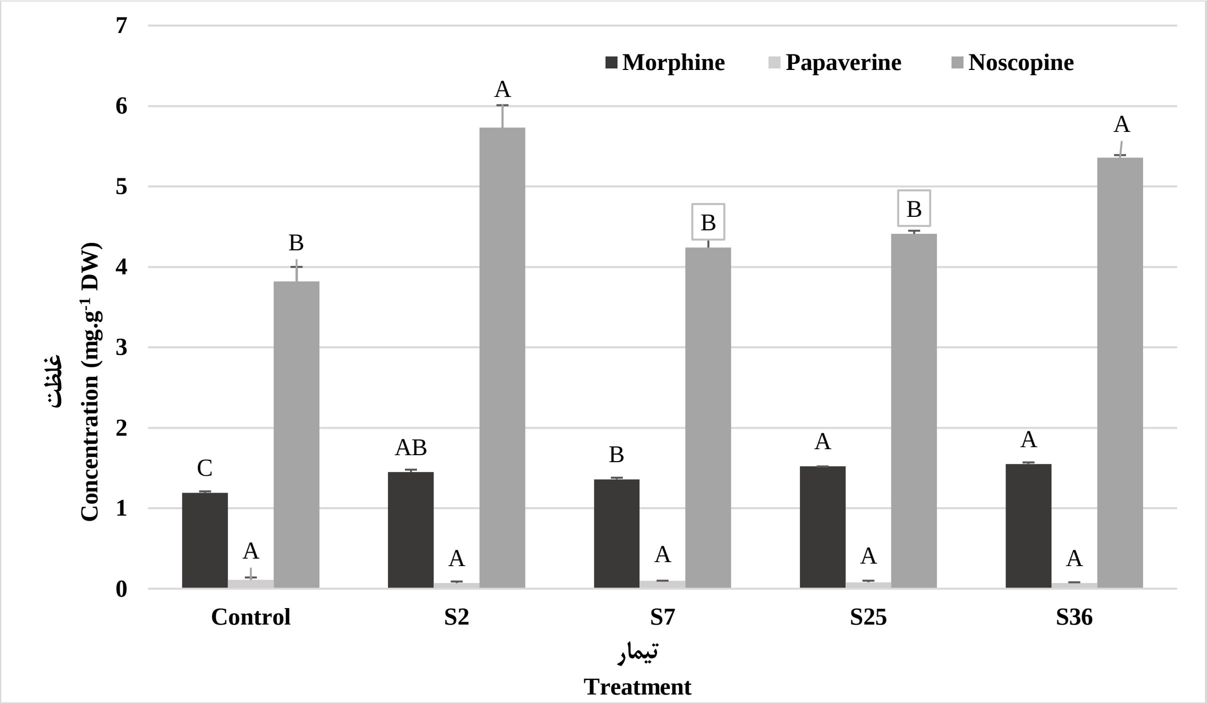
**: معنی‌داری در سطح احتمال ۱ درصد

**: significant at $p \leq 0.01$

پژوهش‌های متعددی اظهار می‌دارند که عوامل PGPR از جمله باکتری‌های حل‌کننده فسفات، می‌توانند به‌عنوان الیسیتورهای زنده عمل کنند و منجر به القای تولید انواعی از متابولیت‌های ثانویه در گیاهان شوند (Sekar & Kandavel, 2010). مثال‌های متعددی از ارزیابی اثرات این عوامل میکروبی مفید بر تولید انواعی از متابولیت‌های ثانویه ارزشمند توسط برخی گیاهان دارویی موجود است. به‌عنوان مثال، احمدزاده و همکاران (Ahmadzadeh *et al*., 2022) گزارش کردند که تیمار بذور و یا ریشه‌های گیاهچه‌های گیاه دارویی گل پریوش (*Catharanthus roseus*) با سویه ۱۶۹ از باکتری *Pseudomonas fluorescens* منجر به افزایش قابل توجهی در میزان آلکالوئیدهای وین بلاستین[1] و وین کریستین[2] که از خاصیت قوی ضدسرطان برخوردارند، در قیاس با شاهد می‌شود.

1- Vinblastine

2- Vincristine



شکل ۳- اثر سویه‌های باکتریایی حل‌کننده فسفات بر میزان آلکالوئیدهای مورفین، پاپاورین، و نوسکاپین کپسول خشخاش

Figure 3- The effect of phosphate-solubilizing bacterial strains on the amount of morphine, papaverine, and noscapine alkaloids in the poppy capsule (DMRT, *p*<0.05) (n=3)

جدول ٤- تجزیه واریانس اثر باکتری‌های حل‌کننده فسفات بر آلکالوئیدهای کپسول *P. somniferum*

Table 4- ANOVA for the effect of phosphate solubilizing bacteria on the alkaloids of *P. somniferum* capsule

منابع تغییرات S.O.V	درجه آزادی Df	میانگین مربعات Mean squares	ارزش F F-value
آلکالوئیدها Alkaloids (A)	2	85.10**	2150.455
تیمار Treatment (T)	4	0.79**	19.980
تیمار × آلکالوئید A × T	8	0.60**	15.134
خطا Error	30	0.04	
کل Total	44		

**: معنی‌داری در سطح احتمال ۱ درصد

**: significant at $p \leq 0.01$

قربانپور و همکاران (Ghorbanpour *et al*., 2013) نیز نشان دادند که تیمار گیاه دارویی بذرالبنج (*Hyoscyamus niger*) با باکتری‌های *Pseudomonas putida* و *P. fluorescens* منجر به افزایش معنی‌داری در میزان آلکالوئیدهای هیزوسیامین[1] و اسکوپولامین[2] موجود در ریشه و اندام‌های هوایی گیاه در قیاس با شاهد شد. همچنین ماماتا و همکاران (Mamta *et al*., 2010) اظهار داشتند که تیمار بوته‌های شیرین برگ (*Stevia rebaudiana*) با باکتری‌های حل‌کننده فسفات جداسازی شده از ریزوسفر این گیاه دارویی نه تنها منجر به افزایش رشد گیاهان شد، بلکه افزایش سطح متابولیت‌های

1- Hyoscyamine

2- Scopolamine

ثانویه‌ای چون استوویوزید[1] و ربودیوزید–آ[2] را نیز سبب شد. بیشترین کارایی مربوط به سویه ۱۰۲۱۶ از باکتری *Burkholderia gladioli* بود که توانست میزان استوویوزید و ربودیوزید–آ را به‌ترتیب ۱۵۰ درصد و ۵۵۵ درصد در هر گیاه در قیاس با شاهد افزایش دهد. بر طبق گزارش پراکاش و آرورا (Prakash & Arora, 2019) ، تیمار بوته‌های گیاه دارویی نعنای وحشی (*Mentha arvensis*) با جدایه STJP از باکتری *Bacillus* sp. که از ریزوسفر *S. rebaudiana* جداسازی شده بود و از توانایی در حل‌کنندگی فسفات معدنی برخوردار بود، منجر به افزایش عملکرد عصاره و مقدار منتول موجود در آن شد. بر طبق نتایج این پژوهش نیز ریزوباکترهای حل‌کننده فسفات معدنی مورد مطالعه توانستند به‌عنوان الیسیتورهای زنده بر میزان بیوسنتز آلکالوئیدهای مورفین، پاپاورین، و نوسکاپین موجود در کپسول، ساقه، و برگ خشخاش به‌طور معنی‌داری تأثیر بگذارند. به این ترتیب، نتایج حاصل در موافقت و هم‌راستای مثال‌های ذکر شده است.

بنیلا و همکاران (Bonilla *et al.*, 2014) گزارش کردند که عوامل PGPR می‌توانند به‌عنوان الیسیتورهای زنده منجر به افزایش سطح برخی آلکالوئیدهای گیاه خشخاش (*P. somniferum*) شوند. این پژوهشگران به بررسی اثر تیمار بوته‌های خشخاش (*P. somniferum*) با جدایه‌های *Stenotrophomonas maltophilia* (N5.18)، (Aur9) *Chryseobacterium balustinum* و (N21.4) *P. fluorescens*، بر میزان آلکالوئیدهای مورفین، تبائین، کدئین، و اوریپاوین[3] موجود در برگ (محلول‌پاشی) و ریشه (افزودن به خاک) پرداختند. بر طبق نتایج به‌دست آمده، مشخص شد که سویه‌های باکتریایی مختلف می‌توانند بر سطح آلکالوئیدهای موجود در برگ و یا ریشه خشخاش اثرات متفاوتی نشان دهند. به گونه‌ای که محلول‌پاشی بوته‌های خشخاش با جدایه N5.18، منجر به افزایش معنی‌داری در سطح آلکالوئیدهای مورفین، تبائین، و کدئین برگ شد، ولی مقدار اوریپاوین کاهش معنی‌داری داشت. همچنین تیمار با جدایه N21.4 منجر به کاهش معنی‌داری در سطح مورفین و اوریپاوین برگ شد، ولی سطح کدئین و تبائین افزایش یافت. این در حالی بود که در تیمار با جدایه N21.4، سطح مورفین، کدئین، و تبائین در ریشه افزایش ناچیزی داشت و سطح اوریپاوین بدون تغییر ماند. تیمار با جدایه N5.18، منجر به کاهش معنی‌داری در سطح تبائین، کدئین و اوریپاوین موجود در ریشه شد، ولی میزان مورفین افزایش یافت. یافته‌های پژوهش حاضر نیز نشان می‌دهد که سطح آلکالوئیدهای مورد مطالعه (مورفین، پاپاورین و نوسکاپین) در برگ و کپسول بوته‌های خشخاش محلول‌پاشی شده با جدایه‌های باکتریایی مورد مطالعه یکسان نبود. در تیمار با سویه‌های باکتریایی مورد مطالعه مشخص شد که میزان پاپاورین موجود در برگ و ساقه در قیاس با شاهد کاهش معنی‌داری داشت، ولی میزان آن در کپسول تغییرات معنی‌داری نداشت. میزان مورفین موجود در برگ در تمامی تیمارهای باکتریایی به‌جز S36 افزایش معنی‌داری را در قیاس با شاهد منتج شد. درحالی‌که مقدار آن در کپسول حتی در تیمار با S36، افزایش معنی‌داری نسبت به شاهد نشان داد. در بررسی نوسکاپین نیز مشخص شد که میزان آن در برگ و ساقه در تمامی تیمارهای باکتریایی افزایش معنی‌داری نسبت به شاهد داشت، ولی در بررسی کپسول مشخص شد که تنها تیمارهای S36 و S2 منجر به افزایش معنی‌داری در آن شدند. همچنین مشخص شد که اثر متقابل نوع آلکالوئید و به‌کارگیری سویه‌های باکتریایی حل‌کننده فسفات بر غلظت آلکالوئیدهای مورد مطالعه در کپسول، ساقه و برگ خشخاش معنی‌دار است. به این ترتیب، نتایج به‌دست آمده از پژوهش حاضر در موافقت با یافته‌های سایر پژوهشگران است.

نتیجه‌گیری

به این ترتیب می‌توان نتیجه‌گیری کرد که به‌منظور افزایش دستیابی به متابولیت‌های ثانویه ارزشمند گیاهان دارویی لزوماً نیازی به اعمال دستورزی‌های ژنتیکی نیست، بلکه با صرف هزینه‌های بسیار پایین‌تر، می‌توان با به‌کارگیری الیسیتورهای باکتریایی به این هدف دست یافت. در خصوص گیاه دارویی خشخاش نیز مشخص شد که با انتخاب سویه‌های باکتریایی سازگار و کارآمد از گروه باکتری‌های حل‌کننده فسفات، می‌توان سطح آلکالوئیدهای مورفین، پاپاورین، و نوسکاپین را در اندام‌های هوایی به‌طور چشمگیری افزایش داد.

سپاسگزاری

بدین وسیله از همکاری پرسنل محترم مؤسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع کشور کمال تشکر و قدردانی می‌شود.

1- Stevioside
2- Rebaudioside-A
3- Oripavine

References

1- Ahmadzadeh, M., Keshtkar, A.H., Moslemkhany, K., & Ahmadzadeh, M. (2022). Effect of the plant probiotic bacteria on terpenoid indole alkaloid biosynthesis pathway gene expression profiling, vinblastine and vincristine content in the root of *Catharanthus roseus*. *Molecular Biology Reports, 49*(11), 10357-10365. https://doi.org/10.1007/s11033-022-07841-z

2- Alcantara, J., Bird, D.A., Franceschi, V.R., & Facchini, P.J. (2005). Sanguinarine biosynthesis is associated with the endoplasmic reticulum in cultured opium poppy cells after elicitor treatment. *Plant Physiology*, *138*(1), 173-183. https://doi.org/10.1104/pp.105.059287

3- Algar, E., Gutierrez-Mañero, F.J., Bonilla, A., Lucas, J.A., Radzki, W., & Ramos-Solano, B. (2012). *Pseudomonas fluorescens* N21.4 metabolites enhance secondary metabolism isoflavones in soybean (*Glycine max*) calli cultures. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *60*(44), 11080-11087. https://doi.org/10.1021/jf303334q

4- Alikhani, H.A., Allah Dadi, I., Rashtbari, M., & Rajabpour, B. (2014). Applied methods of soil biology laboratory. University of Tehran Press, Tehran, Iran. 271 p. (In Persian)

5- Bennett, J.O., Yu, O., Heatherly, L.G., & Krishnan, H.B. (2004). Accumulation of genistein and daidzein, soybean isoflavones implicated in promoting human health, is significantly elevated by irrigation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *52*(25), 7574-7579. https://doi.org/10.1021/jf049133k

6- Blanco-Vargas, A., Rodríguez-Gacha, L.M., Sánchez-Castro, N., Garzón-Jaramillo, R., Pedroza-Camacho, L.D., Poutou-Piñales, R.A., Rivera-Hoyos, C.M., Díaz-Ariza, L.A., & Pedroza-Rodríguez, A.M. (2020). Phosphate-solubilizing *Pseudomonas* sp., and *Serratia* sp., co-culture for *Allium cepa* L. growth promotion. *Heliyon*, *6*(10), e05218. https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e05218

7- Bonilla, A., Sarria, A.L.F., Algar, E., Muñoz Ledesma, F.J., Ramos-Solano, B., Fernandes, J.B., & Gutierrez Mañero, F.J. (2014). Microbe associated molecular patterns from rhizosphere bacteria trigger germination and *Papaver somniferum* metabolism under greenhouse conditions. *Plant Physiology and Biochemistry*, *74*, 133-140.

8- Bourgaud, F., Gravot, A., Milesi, S., & Gontier, E. (2001). Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. *Plant Science*, *161*(5), 839-851. https://doi.org/10.1016/S0168-9452(01)00490-3

9- Chen, Y., Fan, J.B., Du, L., Xu, H., Zhang, Q.H., & He, Y.Q. (2014). The application of phosphate solubilizing endophyte *Pantoea dispersa* triggers the microbial community in red acidic soil. *Applied Soil Ecology*, *84*, 235-244. https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2014.05.014

10- Conrath, U., Beckers, G.J.M., Flors, V., García-Agustín, P., Jakab, G., & Mauch, F. (2006). Priming: getting ready for battle. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, *19*(10), 1062-1071. https://doi.org/10.1094/MPMI-19-1062

11- Facchini, P.J. (2001). Alkaloid biosynthesis in plants: biochemistry, cell biology, molecular regulation, and metabolic engineering applications. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, *52*, 29-66. https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.52.1.29

12- Ghorbanpour, M., Hatami, M., & Khavazi, K. (2013). Role of plant growth promoting rhizobacteria on antioxidant enzyme activities and tropane alkaloid production of *Hyoscyamus niger* under water deficit stress. *Turkish Journal of Biology*, *37*, 350–360. https://doi.org/10.3906/biy-1209-12

13- Ghoreishi, F.S., & Etemadifar, Z. (2017). Heavy metal removal by phosphate-solubilizing *Enterobacter xiangfangensis* isolated from rhizosphere. *Journal of Microbial World*, *10*(2), 145-156. (In Persian)

14- Gutiérrez Mañero, F.J., Ramos, B., Lucas García, J.A., Probanza, A., & Barrientos Casero, M.L. (2003). Systemic induction of terpenic compounds in *Digitalis lanata*. *Journal of Plant Physiology*, *160*, 105– r130.

15- Hu, X.J., Li, Z.J., Cao, Y.C., Zhang. J., Gong, Y.X., & Yang, Y.F. (2010). Isolation and identification of a phosphate-solubilizing bacterium *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii* g6, and effects of temperature, salinity, and pH on its growth under indoor culture conditions. *Aquaculture International*, *18*(6), 1079-1091. https://doi.org/10.1007/s10499-010-9325-8

16- Kim, S.H., Jung, W.S., Ahn, J.K., Kim, J.A., & Chung, I.M. (2005). Quantitative analysis of the isoflavone content and biological growth of soybean (*Glycine max* L.) at elevated temperature, CO_2 level and N application. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *85*(15), 2557-2566. https://doi.org/10.1002/jsfa.2294

17- Liscombe, D.K., & Facchini, P.J. (2008). Evolutionary and cellular webs in benzylisoquinoline alkaloid biosynthesis. *Current Opinion in Biotechnology*, *19*(2), 173-180. https://doi.org/10.1016/j.copbio.2008.02.012

18- Mamta, R.P., Pathania, V., Gulati, A., Singh, B., Bhanwra, R.K., & Tewari, R. (2010). Stimulatory effect of phosphate-solubilizing bacteria on plant growth, stevioside and rebaudioside-A contents of *Stevia rebaudiana* Bertoni. *Applied Soil Ecology*, *46*, 222-229.

19- Meos, A., Saks, L., & Raal, A. (2017). Content of alkaloids in ornamental *Papaver somniferum* L. cultivars growing in Estonia. *The Proceedings of the Estonian Academy of Sciences*, *66*(1), 34. http://doi.org/10.3176/proc.2017.1.04

20- Paulsen, J., Yahyazadeh, M., Hänsel, S., Kleinwächter, M., Ibrom, K., & Selmar, D. (2015). 13,14- dihydrocoptisine-the genuine alkaloid from *Chelidonium Majus*. *Phytochemistry*, *111*, 149-153. https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2015.01.006

21- Prakash, J., & Arora, N.K. (2019). Phosphate-solubilizing *Bacillus* sp. enhances growth, phosphorus uptake and oil yield of *Mentha arvensis* L. *3 Biotechnology*, *9*(4), 126. https://doi.org/10.1007/s13205-019-1660-5
22- Ramos-Solano, B., Barriuso Maicas, J., La Pereyra de Iglesia, M.T., Domenech, J., & Gutiérrez Mañero, F.J. (2008). Systemic disease protection elicited by plant growth promoting rhizobacteria strains: Relationship between metabolic responses, systemic disease protection, and biotic elicitors. *Phytopathology*, *98*(4), 451-457. https://doi.org/10.1094/PHYTO-98-4-0451
23- Ramos-Solano, B., Algar, E., García-Villaraco, A., García-Cristóbal, J., Lucas García, J.A., & Gutierrez-Mañero, F.J. (2010). Biotic elicitation of isoflavone metabolism with plant growth promoting rhizobacteria in early stages of development in *Glycine max* var. *Osumi*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *58*(3), 1484-1492. https://doi.org/10.1021/jf903299a
24- Rodríguez, H., & Fraga, R. (1999). Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. *Biotechnology Advances*, *17*(4-5), 319-339.
25- Sekar, S., & Kandavel, D. (2010) Interaction of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) and endophytes with medicinal plants for phytochemicals. *Journal of Phytology*, *2*(7), 91-100.
26- Silva, H.S.A., Da Romeiro, R.S., Macagnan, D., Halfeld-Vieira, B.D.A., Pereira, M.C.B., & Mounteer, A. (2004). Rhizobacterial induction of systemic resistance in tomato plants: Non-specific protection and increase in enzyme activities. *Biological Control*, *29*(2), 288-295. https://doi.org/10.1016/S1049-9644(03)00163-4
27- Sperber, J.I. (1958). Solubilization of apatite by soil microorganisms producing organic acids. *Australian Journal of Agricultural Research*, *9*, 782-787. https://doi.org/10.1071/AR9580782
28- Srivasatava, P. (2022). Chapter 13 Use of alkaloids in plant protection. In Ravindra Soni, Deep Chandra Suyal, Reeta Goel (Eds.): Plant Protection: De Gruyter, pp. 337–352
29- Srivastava, N.K., & Sharma, S. (1990). Effect of triacontanol on photosynthesis, alkaloid content and growth in opium poppy (*Papaver somniferum* L.). *Plant Growth Regulation*, *9*(1), 65-71. https://doi.org/10.1007/BF00025280
30- Szabó, B., Lakatos, A., Koszegi, T., & Botz, L. (2008): Investigation of abiogenic stress-induced alterations in the level of secondary metabolites in poppy plants (*Papaver somniferum* L.). *Acta Biologica Hungarica*, *59*(4), 425-438. https://doi.org/10.1556/ABiol.59.2008.4.4
31- Tavakkoli, Z., & Assadi, M. (2017). Papaveraceae. In: Flora of Iran. Vol: 127. Research Institute of Forests and Rangelands Press, Tehran, Iran. p. 79. (In Persian)
32- van Loon, L.C., Bakker, P.A., & Pieterse, C.M. (1998). Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. *Annual Review of Phytopathology*, *36*, 453-483. https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.36.1.453
33- Yazdani, D., Rezazadeh, S., & Shahnazi, S. (2003). Review of poppy (*Papaver somniferum* L.). *Journal of Medicinal Plants*, *2*(5), 1-12. (In Persian)

Journal of Horticultural Science
https://jhs.um.ac.ir

Research Article
Vol. 38, No. 2, Summer 2024, p. 419-429

Evaluation and Study of Yellow and White Onion Cultivars (*Allium cepa* L.) in the Climatic Conditions of Southern Kerman Province

M. Ghasemi[1], S. Sardouei-Nasab[2*], G. Mohammadi-Nejad[3], S. Aminizadeh[4]

1, 3 and 4- M.Sc. Student, Professor and Ph.D. in Genetics and Plant Breeding, Department of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran, respectively.
2- Assistant Professor, Research and Technology Institute of Plant Production (RTIPP), Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran
(*- Corresponding Author Email: sardoueinasabs@gmail.com)

Received: 11-12-2023 Revised: 09-03-2024 Accepted: 12-03-2024 Available Online: 12-03-2024	**How to cite this article:** Ghasemi, M., Sardouei-Nasab, S., Mohammadi-Nejad, G., & Aminizadeh, S. (2024). Evaluation and study of yellow and white onion cultivars (*Allium cepa* L.) in the climatic conditions of Southern Kerman province. *Journal of Horticultural Science, 38*(2), 419-429. (In Persian with English abstract). https://doi.org/10.22067/jhs.2024.85799.1310

Introduction

Onion stands as one of the primary and extensively consumed vegetables at global scale, with numerous genotypes, both native and imported, being cultivated in the country annually. The southern provinces of the country have allocated about 50 percent of the cultivated area to onion cultivation. Therefore, selecting superior genotypes compatible with southern regions is essential to achieve maximum yield .Considering the long history of onion cultivation as one of the native plants of our country, there is a lot of genetic diversity in this plant. However, to date, inadequate breeding programs have been conducted to develop new, high-yield varieties in our country, leading most farmers to rely on local cultivars for cultivation. Therefore, it is necessary to design targeted breeding programs to produce new varieties superior in yield potential, flavor, aroma, resistance to pests and diseases, and other characteristics. In this regard, collecting diverse onion germplasm and evaluating genetic diversity in it is one of the basic steps for designing targeted breeding. The main purpose of this project is to evaluate genetic diversity in yellow and white onion cultivars in terms of morphological traits and selecting superior genotypes. The results of this project are a necessary prerequisite for long-term plans for the production of new varieties of onions.

Materials and Methods

The research was carried out in the Faryab region, situated in the southern part of Kerman province. We assessed four commercial yellow onion hybrids- Rio Bravo, Soberana, Eiden, and Ascro Goldeneye -and four commercial white onion hybrids-Minerva, Cirrus, Macran, and 4043-using a 4x4 Latin square design during the 2022 growing season. Various observable traits, such as days to bulbing, days to maturity, onion bulb diameter, plant height and leaf length, fresh and dry plant weight, number of edible layers, fusarium infection percentage, and average tuber yield were recorded. To analyze the data, we used descriptive statistics to show the maximum, minimum, and average values of the traits, along with variance analysis, correlation analysis, and mean comparisons.

Results and Discussion

The analysis of variance revealed significant variations across the measured traits. Within the yellow onion

©2024 The author(s). This is an open access article distributed under Creative Commons Attribution 4.0 International License (CC BY 4.0).

https://doi.org/10.22067/jhs.2024.85799.1310

genotypes, Rio Bravo displayed the shortest maturity cycle, averaging 113 days to maturity, while Aiden exhibited the longest maturity duration with an average of 141 days. The Sobrana cultivar consistently outperformed other varieties across all investigated traits and was introduced as the best yellow onion cultivar. Bulb yield displayed strong and positive correlations with bulb diameter, bulb length, plant height, leaf length, number of edible layers, and both fresh and dry plant weight. However, the correlation between days to maturity and bulb yield was low, suggesting that the duration from planting to maturity did not affect the enhancement of bulb yield in yellow onions. The findings indicated that in contrast to yellow onion cultivars, white onion cultivars exhibited a longer average duration to bulb formation and maturity, alongside a lower bulb yield. Among the white onion genotypes, Minerva displayed the earliest maturity, while Cirrus was observed as the longest maturing genotype. Cirrus cultivar exhibited the highest average bulb diameter, bulb length, plant fresh weight, plant dry weight, leaf length, and bulb yield. Conversely, the Macran genotype displayed the lowest mean values for bulb diameter, bulb length, plant fresh weight, plant dry weight, and bulb yield. Additionally, a significant and strong positive relationship was observed among bulb diameter, bulb length, plant fresh weight, and plant dry weight. Typically, onion quality is often assessed based on bulb diameter, where larger bulb diameters tend to correspond with higher bulb yields. Evidently, both in yellow and white onion cultivars, those with higher yields also demonstrated larger bulb diameters.

Conclusion

In the southern regions of Kerman province, the early maturity of onions is very important. Among the yellow onion genotypes, Rio Bravo was the earliest variety. The Soberana cultivar had a higher bulb yield compared to Rio Bravo, but it matured approximately twenty days later than Rio Bravo. Among the white varieties, Minerva was also the earliest maturing variety. However, the Cirrus cultivar had a higher bulb yield compared to Minerva. Yet, in comparison to Minerva, it was both later to mature and more susceptible to fusarium. The selection of onion varieties can significantly depend on the specific conditions of the region and the needs of the farmers. If timing and fusarium sensitivity are crucial factors for farmers, Minerva and Rio Bravo, with lower susceptibility to fusarium, might be suitable options. However, if bulb yield and product quality hold greater importance for farmers, Soberana among yellow onions and Cirrus among white onions are recommended. Additionally, considering breeding goals, these varieties can be utilized in onion breeding programs according to breeding objectives.

Keywords: Bulb weight, Earliness, Genetic diversity, Yield

نشریه علوم باغبانی
https://jhs.um.ac.ir

مقاله پژوهشی
جلد ۳۸، شماره ۲، تابستان ۱٤۰۳، ص. ٤۲۹-٤۱۹

ارزیابی و مطالعه ارقام پیاز زرد و سفید (*Allium cepa* L.) در شرایط آب‌وهوایی جنوب استان کرمان

مهلا قاسمی[۱]- سمیه ساردویی نسب[۲*]- قاسم محمدی نژاد[۳]- سمیه امینی زاده[٤]

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۹/۲۰
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۱۲/۲۲

چکیده

پیاز یکی از سبزی‌های اصلی و پرمصرف در جهان است که هر ساله ژنوتیپ‌های زیادی اعم از بومی و وارداتی در کشور کشت می‌شوند. استان‌های جنوبی کشور حدود ۵۰ درصد از سطح زیر کشت را به کشت پیاز اختصاص داده‌اند. بنابراین، گزینش ژنوتیپ‌های برتر سازگار با مناطق جنوبی برای حصول حداکثر عملکرد امری ضروری است. در این مطالعه، با هدف بررسی سازگاری ارقام پیاز خارجی (چهار رقم پیاز سفید و چهار رقم پیاز زرد) در شرایط آب‌وهوایی جنوب استان کرمان، آزمایشی در قالب طرح مربع لاتین با چهار تکرار در ایستگاه تحقیقاتی واقع در جنوب استان کرمان انجام شد. صفات فنوتیپی شامل: تعداد روز تا سوخ‌دهی، تعداد روز تا رسیدن، قطر غده، طول غده، ارتفاع بوته، تعداد لایه‌های خوراکی، وزن تر بوته، وزن خشک بوته، طول برگ، درصد آلودگی به فوزاریوم و عملکرد غده مورد ارزیابی قرار گرفتند. نتایج تجزیه واریانس تفاوت معنی‌داری در سطح یک درصد بین ارقام پیاز سفید و زرد از لحاظ صفات مورفولوژیک نشان داد. براساس نتایج به‌دست آمده، ارقام 'مینروا' (پیاز سفید) و 'ریوبراوو' (پیاز زرد) به‌عنوان ارقام زودرس و با درصد آلودگی کمتر به فوزاریوم معرفی شدند و ارقام 'سوبرانا' (پیاز زرد) و 'سایروس' (پیاز سفید) به‌عنوان ارقام با عملکرد غده بالابرای کاشت در مناطق جنوبی استان کرمان و همچنین برای استفاده در برنامه‌های به‌نژادی پیاز معرفی گردیدند. در هر دو نوع پیاز قطر غده، طول غده، وزن تر بوته و وزن خشک بوته همبستگی بالا، مثبت و معنی‌داری با عملکرد غده نشان دادند، در نتیجه برای افزایش عملکرد و اهداف به‌نژادی می‌توان به گزینش پیازهایی با قطر و وزن خشک بوته بیشتر اقدام نمود.

واژه‌های کلیدی: تنوع ژنتیکی، زودرسی، عملکرد، وزن غده

مقدمه

پیاز خوراکی (*Allium cepa* L.) یکی از مهم‌ترین محصولات تجاری بوده و پس از گوجه‌فرنگی، دومین ارزش اقتصادی را دارد (FAO, 2020). این گیاه طعم خاصی دارد و در انواع غذاها، اعم از سوپ، ساندویچ و سالاد استفاده می‌شود و مصرف آن هم در مرحله سبز و هم پس از بلوغ انجام می‌پذیرد (Sherbeny *et al*., 2022). هر دو قسمت پیاز (برگ‌ها و به‌ویژه غده) حاوی منابع غنی از ترکیبات فعال زیستی از جمله پلی‌فنول‌ها و فلاونوئیدها هستند که فعالیت آنتی اکسیدانی و ضد باکتریایی بالایی دارند (Przygocka-Cyna *et al*., 2020). علاوه بر ارزش غذایی، این گیاه به‌دلیل داشتن چندین ترکیب ضد سرطانی در پزشکی نیز کاربرد دارد، به‌طوری‌که گزارش شده است از رشد سلول‌های سرطانی در حیوانات جلوگیری می‌کند (Baghali *et al*., 2012). استان‌های جنوبی کشور حدود ۵۰ درصد از سطح زیر کشت را به کشت پیاز اختصاص داده‌اند. ارقام پیاز روز بلند مورد کشت در ایران توده‌های بومی آزاد گرده‌افشان هستند که سازگاری خوبی به شرایط آب و هوایی منطقه دارند. با این وجود، نیاز به به‌نژادی برخی صفات مطلوب زراعی وجود دارد. علاوه بر عملکرد پیاز صفات ثانویه‌ی دیگر مانند طول پیاز، شکل پیاز، ماندگاری و انبار مانی پیاز، درصد ماده خشک، رنگ و تندی پیاز نیز در برنامه‌های به‌نژادی پیاز مورد توجه هستند (Bagheban *et al*., 2012). برای

۱، ۳ و ۴- به‌ترتیب دانشجوی کارشناسی ارشد، استاد و دکتری ژنتیک و به نژادی گیاهی، گروه تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید باهنر کرمان، کرمان، ایران
۲- استادیار ژنتیک و به نژادی گیاهی، پژوهشکده فناوری تولیدات گیاهی، دانشگاه شهید باهنر کرمان، کرمان، ایران
(*- نویسندهٔ مسئول: Email: sardoueinasabs@gmail.com)
https://doi.org/10.22067/jhs.2024.85799.1310

به‌نژادی عملکرد پیاز و سایر صفات مطلوب زراعی از طریق گزینش ژنوتیپ‌های برتر، داشتن اطلاعات از ماهیت و میزان تنوع این صفات در هر جمعیت پیش شرط اساسی در هر برنامه به‌نژادی نظام‌مند است.

تنوع ژنتیکی قابل ملاحظه‌ای در بین ارقام پیاز در سراسر دنیا گزارش شده است (Rivera *et al.*, Tanikawa *et al.*, 2002; 2016; Manjunathagowda *et al.*, 2021b). روآمبا و همکاران (Rouamba *et al.*, 1994) تنوع ژنتیکی بالایی از نظر تعداد برگ‌ها در شروع تشکیل پیاز، تاریخ تشکیل پیاز، دروه رسیدن، وزن تر و قطر غده را گزارش کردند. مالور و همکاران (Mallor *et al.*, 2014) نیز تنوع ژنتیکی بالایی برای بسیاری از صفات زراعی در پیاز گزارش کرده‌اند. درمطالعه پورتا و همکاران (Porta *et al.*, 2014) برای ارزیابی تنوع ژنتیکی لاین‌های پیاز، تنوع بالایی از نظر صفات کمّی و کیفی مشاهده شد. دی انکین و همکاران (D'Ennequin *et al.*, 1997) با هدف بررسی تنوع ژنتیکی در ۴۱ رقم پیاز تنوع ژنتیکی بالایی از لحاظ صفات تعداد برگ، قطر پیاز، ارتفاع پیاز، وزن تر و خشک پیاز و تعداد روز از کاشت تا آغاز پیازدهی گزارش کردند. با توجه به تاریخچه طولانی کشت و کار پیاز به‌عنوان یکی از گیاهان بومی کشورمان، تنوع ژنتیکی بسیار زیادی در این گیاه وجود دارد. با این وجود، تاکنون برنامه‌های به‌نژادی کافی برای تولید واریته‌های جدید و پر عملکرد در کشور ما انجام نشده است. از این رو، نیاز به طراحی برنامه‌های اصلاحی هدفمند برای تولید واریته‌های جدیدکه از لحاظ پتانسیل عملکرد، طعم و عطر، مقاومت به آفات و بیماری‌ها و دیگر ویژگی‌ها برتری داشته باشند، ضروری است. در این راستا، جمع‌آوری ژرم‌پلاسم متنوع پیاز و ارزیابی تنوع ژنتیکی در آن، یکی از مراحل اساسی برای طراحی به‌نژادی هدفمند است. هدف اصلی از انجام این طرح، ارزیابی تنوع ژنتیکی در ارقام پیاز زرد و سفید از لحاظ صفات مورفولوژیکی و گزینش ژنوتیپ‌های برتر سازگار با مناطق جنوبی استان کرمان است. نتایج حاصل از این طرح پیش نیاز ضروری برای برنامه‌های بلندمدت در راستای تولید واریته‌های جدید در پیاز می‌باشد.

مواد و روش‌ها

این پژوهش در منطقه فاریاب واقع در ۷۶ کیلومتری شهرستان کهنوج در جنوب استان کرمان به مختصات ۵۷ درجه و ۴۲ دقیقه طول شرقی، عرض جغرافیایی ۲۷ درجه و ۲۹ دقیقه شمالی و ارتفاع ۱۱۹۶متر از سطح دریا انجام شد .میانگین سالانه درجه حرارت هوا در منطقه ۲۶ درجه سانتی‌گراد و متوسط بارش سالیانه منطقه ۱۸۰میلی متراست. آب و هوای این منطقه عموماً دارای اقلیم بیابـانی گـرم و خشـک و گاهی شرجی می‌باشد (VakiliShahrbabaki & Rashidi 2018). دراین تحقیق، چهار هیبرید تجاری پیاز زرد شامل ارقام 'ریوبراوو'، 'سوبرانا'، 'آیدن' و 'آسکروگلدنآی' و چهار هیبرید تجاری پیاز سفید شامل ارقام 'مینروا'، 'سایروس'، 'مکران' و '۴۰۴۳' (جدول ۱) در قالب طرح مربع لاتین ۴×۴ در سال زراعی ۱۴۰۱ مورد ارزیابی قرار گرفتند.

جدول ۱- مشخصات ارقام پیاز مورد مطالعه در آزمایش

Table 1- Basic information of onion cultivars used inthe experiment

رقم Cultivar	رنگ پیاز Bulb color	ویژگی‌های برجسته Keycharacteristics	کشور مبدأ Country oforigin
'ریوبراوو' Rio Bravo	زرد Yellow	روز کوتاه و زودرس Short day and early maturity	هلند Netherland
'سوبرانا' Soberana		روز کوتاه و زودرس Short day and early maturity	آفریقای جنوبی South Africa
'آیدن' Eiden		-	آمریکا United States
'آسکروگلدن آی' Ascro Goldeneye		روز کوتاه، زودرس و مقاوم به گل‌دهی Short day, early maturity and resistant to flowering	آمریکا United States
'مینروا' Minerva	سفید White	روز کوتاه، پربازده و زودرس Short day, high-yielding and early maturity	هلند Netherland
'سایروس' Cirrus		روز کوتاه و میان‌رس Short day and middle maturity	آمریکا United States
'۴۰۴۳' 4043		روز کوتاه، میان‌رس و مقاوم به فوزاریوم Short day, middle maturity and resistant to Fusarium	آمریکا United States
'مکران' Macran		-	آفریقای جنوبی South Africa

بذرها در تاریخ اول آذر ماه کشت شدند. هر واحد آزمایشی شامل چهار خط یک متری بود. فاصله بین بوته‌ها ۱۰ سانتی‌متر در نظر گرفته شد. در طول فصل، عملیات زراعی شامل آبیاری (هر ۶-۴ روز یکبار بسته به نیاز) و مبارزه با علف‌های هرز به‌صورت دستی انجام شد. بوته‌ها در اواخر اردیبهشت برداشت شدند. ویژگی‌های مختلف فنوتیپی شامل روز تا شروع سوخدهی، تعداد روز تا رسیدن، قطر پیاز، طول پیاز، ارتفاع بوته، طول برگ، وزن تر و خشک بوته، تعداد لایه‌های خوراکی، درصد آلودگی به فوزاریوم و میانگین عملکرد غده در ارقام مورد مطالعه ارزیابی شدند.

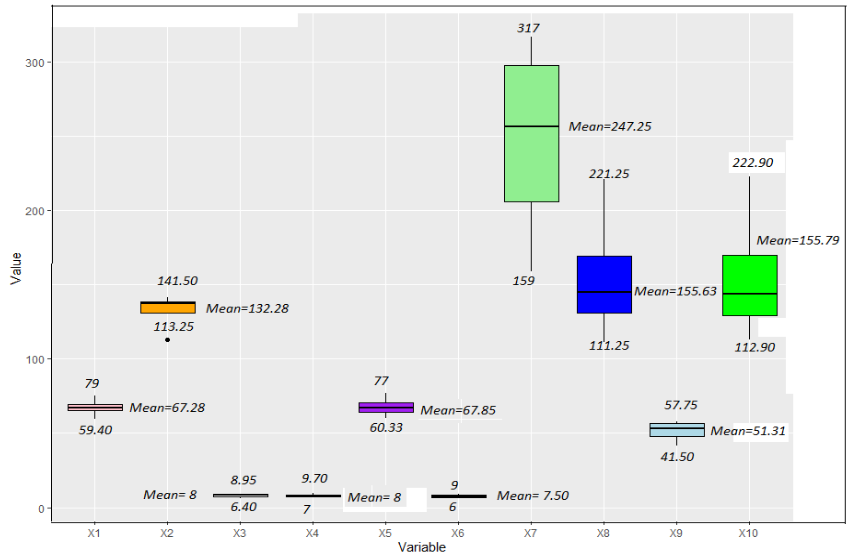
نحوه اندازه‌گیری صفات مورد مطالعه

تعداد روز تا شروع سوخدهی: با محاسبه شاخص نسبت سوخدهی که از تقسیم حداکثر قطر سوخ به حداقل قطر گردن به‌دست می‌آید، هر دو هفته یک بار قطر سوخ و گردن اندازه‌گیری شد. شروع سوخدهی با رسیدن شاخص سوخدهی به عدد ۲ در نظر گرفته شد (Brewster, 2008).

تعداد روز تا رسیدن: تعداد روز از کاشت تا زمانی که ۸۰ درصد برگ‌ها از ناحیه گردن توخالی شده و شروع به پلاسیده شدن نمودند و گیاه تحمل نگهداری برگ‌ها را از دست داد.

قطر پیاز با استفاده از کولیس و بر حسب سانتی‌متر اندازه گیری شد. طول پیاز باخط‌کش بر حسب سانتی‌متر اندازه‌گیری شد. ارتفاع بوته از قاعده تا رأس بوته بر حسب سانتی‌متر اندازه‌گیری شد. طولانی‌ترین طول برگ از اتصال پایه برگ به ساقه تا نوک به‌طور عمودی، با استفاده از خط‌کش و بر حسب سانتی‌متر اندازه‌گیری شد. وزن تر و خشک بوته‌ها با استفاده از ترازوی دیجیتال و بر حسب گرم اندازه‌گیری شدند. وزن غده با میانگین گرفتن وزن پیاز ۱۰ بوته بر حسب گرم اندازه‌گیری شد. برای محاسبه درصد آلودگی به فوزاریوم تعداد بوته‌هایی که به‌طور مشهود آلوده به فوزاریوم بودند، شمارش گردیدند.

پس از جمع‌آوری اطلاعات مزرعه‌ای تجزیه واریانس و مقایسه میانگین صفات به‌روش چنددامنه‌ای دانکن با استفاده از نرم‌افزار SAS انجام شد. محاسبه همبستگی بین صفات و ترسیم نمودار جعبه‌ای به ترتیب با استفاده از بسته‌های آماری corrplot و ggplot2 در نرم افزار R انجام شد.



شکل ۱- نمودار جعبه‌ای و آماره‌های توصیفی شامل میانگین، بیشینه (عدد بالای جعبه) و کمینه (عدد پایین جعبه) برای صفات مورد بررسی در ارقام پیاز زرد

Figure 1- Box plot and descriptive statistics including mean, maximum (number at the top of the box) and minimum (number at the bottom of the box) for the examined traits in yellow onion cultivars

X1: تعداد روز تا سوخدهی، X2: تعداد روز تا رسیدن، X3: قطرغده (سانتی‌متر)، X4: طول غده (سانتی‌متر)، X5: ارتفاع بوته (سانتی‌متر)، X6: تعداد لایه‌های خوراکی، X7: وزن تر بوته (گرم)، X8: وزن خشک بوته (گرم)، X9: طول برگ (سانتی‌متر)، X10: عملکرد غده (گرم)

X1: Days to bulbing, X2: Days to maturity, X3: Bulb diameter (cm), X4: Bulb length (cm), X5: Plant height (cm), X6: Number of edible layers, X7: Plant fresh weight (g), X8: Plant dry weight (g), X9: Leaf length (cm), X10: Bulb yield (g)

نتایج و بحث

پیاز زرد

آمارههای توصیفی شامل میانگین، بیشینه وکمینه برای ارقام پیاز زرد در شکل ۱ آورده شده است. بیشینه و کمینه جمعیت بیانگر وجود تنوع در جوامع مورد ارزیابی است. بهطور کلی، دامنه تغییرات برای بیشتر صفات در ارقام مورد بررسی زیاد بود و تنوع وسیعی از لحاظ صفات مورد بررسی در بین ارقام مورد مطالعه مشاهده گردید. ارقام پیاز زرد بهطور میانگین ۶۷ روز پس از کاشت به مرحله سوخدهی رسیدند و ۱۳۲ روز پس از کاشت به مرحله رسیدگی رسیدند.

نتایج تجزیه واریانس و مقایسه میانگین صفات در ارقام پیاز زرد بهترتیب در جدولهای ۲ و ۳ ارایه شده است. نتایج حاصل از تجزیه واریانس نشان داد، بین ارقام پیاز زرد از نظر تمام صفات مورد مطالعه تفاوت معنیداری در سطح یک درصد وجود داشت. این اختلاف بسیار معنیدار نشاندهنده وجود تنوع قابل ملاحظه در ارقام مورد بررسی میباشد. تعداد لایهی خوردنی و ارتفاع بوته دارای بیشترین تنوع و صفات عملکرد غده و وزن تر بوته دارای کمترین تنوع نسبت سایر صفات بودند.

رقم 'ریوبراوو' با میانگین تعداد روز تا رسیدن ۱۱۳ روز، زودرس ترین و رقم 'آیدن' با میانگین تعداد روز تا رسیدن ۱۴۱ روز دیررس ترین رقم بود (جدول ۳). بیشترین میانگین تعداد روز تا سوخدهی نیز متعلق به رقم 'آیدن' بود. این رقم همچنین از نظر صفات قطر غده، ارتفاع بوته، تعداد لایههای خوراکی، وزن تر بوته، وزن خشک بوته، طول برگ و عملکرد غده دارای کمترین میانگین بود. در مقابل، رقم 'سوبرانا' از نظر همه صفات مورد بررسی نسبت به سایر ارقام دارای بالاترین میانگین بود و بهعنوان بهترین رقم پیاز زرد در این مطالعه معرفی شد.

'ریوبراوو' که زودرسترین رقم بود دارای میانگین کمتری از لحاظ صفات قطر غده، طول غده، ارتفاع بوته، تعداد لایههای خوردنی، وزن تر بوته، وزن خشک بوته و عملکرد غده در مقایسه با رقم 'سوبرانا' بود، درحالیکه از لحاظ صفات قطر غده و طول برگ تفاوت معنیداری با یکدیگر نداشتند.

بررسی نتایج همبستگی بین صفات مورد مطالعه در پیاز زرد (شکل ۲) نشان داد که صفت تعداد روز تا سوخدهی با سایر صفات همبستگی منفی داشت. این نشاندهنده این است که ارقام با تعداد روز تا سوخدهی بیشتر دارای وزن خشک و عملکرد کمتری هستند. مقایسه میانگین صفات نیز نشان داد که رقم 'آیدن' با داشتن بیشترین تعداد روز تا سوخدهی، کمترین وزن خشک بوته و عملکرد غده را داشت. قطر غده با صفات وزن تر بوته و طول برگ همبستگی مثبت و معنیداری داشت. عملکرد غده همبستگی بالا و مثبتی با صفات قطر غده، طول غده، ارتفاع بوته، طول برگ، تعداد لایههای خوراکی، وزن تر و خشک بوته داشت. میزان همبستگی بین روز تا رسیدن و عملکرد غده بسیار پایین بود که این نشان میدهد که تعداد روز از کاشت تا رسیدن تأثیری بر افزایش عملکرد در پیاز زرد نداشته است. موسوی زاده (Mousavizade, 2016) نیز در مطالعه خود همبستگی مثبت و معنیداری بین عملکرد غده با طول غده، طول برگ، قطر غده و تعداد لایههای خوراکی گزارش کرد.

جدول ۲- نتایج تجزیه واریانس صفات فنوتیپی و عملکردی در چهار رقم پیاز زرد

Table 2- ANOVA results for phenotypic and yield traits of four yellow onion cultivars

منابع تغییر S.O.V	درجه آزادی df	میانگین مربعات Mean squares									
		X1	X2	X3	X4	X5	X6	X7	X8	X9	X10
ردیف Row	3	2.83 ns	2.75 ns	0.05 ns	0.06 ns	4.06 ns	1.06 ns	24.83 ns	6.08 ns	15.56 ns	1.68 ns
ستون Column	3	4.16 ns	12.08 ns	0.03 ns	0.04 ns	0.56 ns	1.22 ns	24.16 ns	3.75 ns	5.22 ns	2.1 ns
تیمار Treat	3	70.83**	665.75**	5.43**	5.65**	155.72**	20.39**	20273**	8808.91**	219.39**	9055.64**
خطا Error	6	5.75	4.33	0.05	0.04	10.06	0.31	11.5	4.91	4.14	1.27
ضریب تغییرات CV (%)		3.37	1.57	2.79	2.57	4.68	31	1.37	1.42	3.96	0.72

**، * وns : بهترتیب معنیدار در سطح احتمال ۱ درصد، ۵ درصدو عدم معنیداری.

X۱: تعداد روز تاسوخدهی، X۲: تعداد روز تا رسیدن، X۳: قطر غده، X۴: طول غده، X۵: ارتفاع بوته، X۶: تعداد لایههای خوردنی،X۷: وزن تر بوته، X۸: وزن خشک بوته، X۹: طول برگ، X۱۰: عملکرد غده

*, ** and ns: significant at 1% and 5% of probability levels and non-significant, respectively.

X1: Days to bulbing, X2: Days to maturity, X3: Bulb diameter, X4: Bulb length, X5: Plant height, X6: Number of edible layers, X7: Plant fresh weight, X8: Plant dry weight, X9: Leaf length, X10: Bulb yield

جدول ۳- صفات فنوتیپی و عملکردی در چهار رقم پیاز زرد

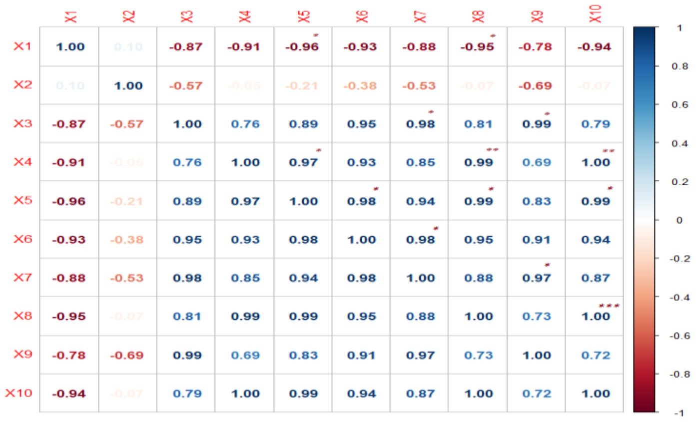
Table 3- The phenotypic and yield traits forfour yellow onion cultivars

ارقام Cultivars	X1	X2	X3	X4	X5	X6	X7	X8	X9	X10
ریوبراوو Rio Bravo	67.75[b]	113.25[c]	8.78[a]	7.9[b]	68.75[b]	8[b]	291[b]	152.25[b]	57.75[a]	152.47[b]
سوبرانا Soberana	74.25[a]	137[b]	8.95[a]	9.7[a]	77[a]	9[a]	317[a]	221.25[a]	56.25[a]	222.9[a]
آیدن Eiden	75[a]	141.5[a]	6.4[c]	7.02[c]	60.33[c]	6[d]	159[d]	111.25[d]	41.5[c]	112.9[d]
آسکروگلدن آی Ascro Goldeneye	67[b]	137.75[b]	7.87[b]	7.37[c]	65.33[bc]	7[c]	222[c]	137.75[c]	49.75[b]	134.87[c]

X۱: تعداد روز تاسوخدهی، X۲: تعداد روز تا رسیدن، X۳: قطر غده (سانتی‌متر)، X۴: طول غده (سانتی‌متر)، X۵: ارتفاع بوته (سانتی‌متر)، X۶: تعداد لایه‌های خوردنی،X۷: وزن تر بوته (گرم)، X۸: وزن خشک بوته (گرم)، X۹: طول برگ (سانتی‌متر)، X۱۰: عملکرد غده (گرم)

مقادیر دارای حداقل یک حرف مشترک، فاقد اختلاف آماری معنی‌دار با استفاده از آزمون چنددامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۵ درصد می‌باشند.

X1: Days to bulbing, X2: Days to maturity, X3: Bulb diameter (cm), X4: Bulb length (cm), X5: Plant height (cm), X6: Number of edible layers, X7: Plant fresh weight (g), X8: Plant dry weight (g), X9: Leaf length (cm), X10: Bulb yield (g)
Values with at least one commonletter have no statistically significant difference based on Duncan’s multiple range test ($p \le 0.05$).



شکل ۲- همبستگی بین صفات فنوتیپی و عملکردی در ارقام پیاز زرد

Figure 2- Correlation between phenotypic and yield traits in yellow onion cultivars

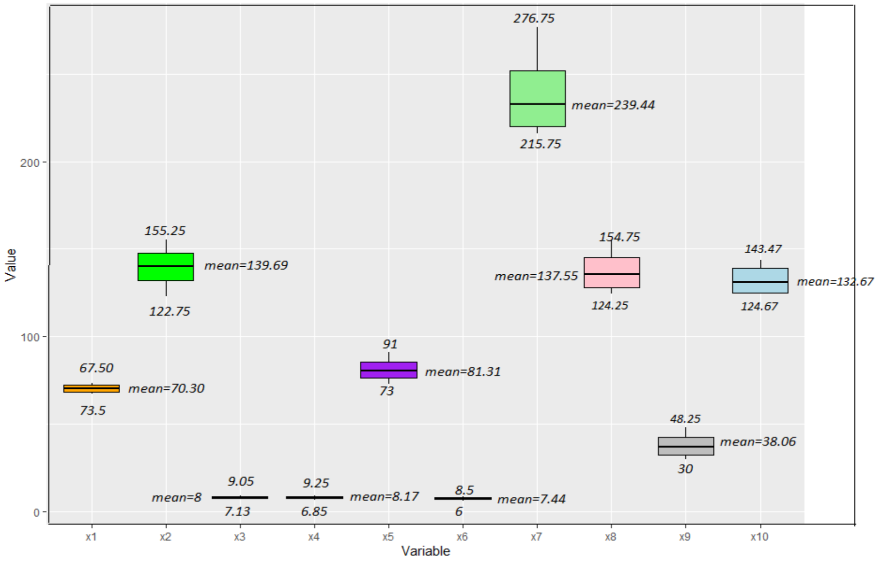
X۱: تعداد روز تا سوخدهی، X۲: تعداد روز تا رسیدن، X۳: قطر غده، X۴: طول غده، X۵: ارتفاع بوته، X۶: تعداد لایه‌های خوراکی، X۷: وزن تر بوته، X۸: وزن خشک بوته، X۹: طول برگ، X۱۰: عملکرد غده

X1: Days to bulbing, X2: Days to maturity, X3: Bulb diameter, X4: Bulb length, X5: Plant height, X6: Number of edible layers, X7: Plant fresh weight, X8: Plant dry weight, X9: Leaf length, X10: Bulb yield

نوربخش و کرامرو (Nourbakhsh & Cramer, 2022) همبستگی مثبت و قوی بین ارتفاع بوته و عملکرد پیاز گزارش کردند و مطرح کردند که گیاهان بزرگ‌تر (طول برگ، تعداد برگ و قطر غلاف بزرگ‌تر) پیازهای بزرگ‌تری تولید می‌کنند.

پیاز سفید

نتایج آمار توصیفی مربوط به ارقام پیاز سفید در شکل ۳ آورده شده است. دامنه تغییرات برای صفات روز تا رسیدن، ارتفاع بوته، وزن خشک بوته و ارتفاع برگ دامنه وسیعی را نشان داد که نشان‌دهنده وجود تنوع بین ارقام مورد مطالعه می‌باشد. پیازهای سفید به‌طور میانگین ۷۰ روز پس از کاشت به مرحله سوخ و ۱۴۰ روز پس از کاشت به مرحله رسیدگی رسیدند. ارقام پیاز سفید از نظر صفات تعداد روز تا سوخدهی، تعداد روز تا رسیدگی و ارتفاع بوته دارای میانگین بیشتری نسبت به ارقام زرد بودند درحالی‌که، از لحاظ صفات وزن تر و خشک بوته، طول برگ و عملکرد غده دارای میانگین پایین‌تری بودند.



شکل ۳- نمودار جعبه‌ای و آماره‌های توصیفی شامل میانگین، بیشینه (عدد بالای جعبه) وکمینه (عدد پایین جعبه) برای صفات فنوتیپی و عملکردی در ارقام پیاز سفید

Figure 3- Box plot and descriptive statistics including mean, maximum (number at the top of the box) and minimum (number at the bottom of the box) for the phenotypic and yield traits in white onion cultivars

X1: تعداد روز تا سوخ‌دهی، X2: تعداد روز تا رسیدن، X3: قطرغده (سانتی‌متر)، X4: طول غده (سانتی‌متر)، X5: ارتفاع بوته (سانتی‌متر)، X6: تعداد لایه‌های خوراکی، X7: وزن تر بوته (گرم)، X8: وزن خشک بوته (گرم)، X9: طول برگ (سانتی‌متر)، X10: عملکرد غده (گرم)

X1: Days to bulbing, X2: Days to maturity, X3: Bulb diameter (cm), X4: Bulb length (cm), X5: Plant height (cm), X6: Number of edible layers, X7: Plant fresh weight (g), X8: Plant dry weight (g), X9:Leaf length (cm), X10: Bulb yield (g)

جدول ٤- نتایج تجزیه واریانس صفات فنوتیپی و عملکردی در چهار رقم پیاز سفید

Table 4- ANOVA results for phenotypic and yield traits of four white onion cultivars

تغییر منابع S.O.V	میانگین مربعات Mean squares										
	X1	X2	X3	X4	X5	X6	X7	X8	X9	X10	X11
ردیف Row	12.89*	19.23^{ns}	0.07^{ns}	0.20^{ns}	8.06^{ns}	0.062^{ns}	64.56^{ns}	37.06^{ns}	9.56^{ns}	0.51^{ns}	8.51^{ns}
ستون Column	0.23^{ns}	0.23^{ns}	0.003^{ns}	0.005^{ns}	3.22^{ns}	0.062^{ns}	18.22^{ns}	3.89^{ns}	0.23^{ns}	9.13^{ns}	1.06^{ns}
تیمار Treat	31.23**	776.72**	2.86**	3.96**	248.89**	4.73**	3058.22**	748.56**	260.72**	355.35**	3.06^{ns}
خطا Error	2.40	19.15	0.11	0.1	10.14	0.22	36.81	41.89	13.89	14.71	0.89
ضریب تغییرات CV (%)	2.20	3.13	4.18	4.06	3.92	6.44	2.53	4.71	9.79	2.89	21.33

**، * و ns: به‌ترتیب معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد و ۵ درصد و عدم معنی‌داری

X1: تعداد روز تاسوخ‌دهی، X2: تعداد روز تا رسیدن، X3: قطر غده، X4: طول غده، X5: ارتفاع بوته، X6: تعداد لایه‌های خوردنی،X7: وزن تر بوته، X8: وزن خشک بوته، X9: طول برگ، X10: عملکرد غده، X11: درصد آلودگی به فوزاریوم

*, ** and ns: significant at 1% and 5% of probability levels, and non-significant, respectively

X1: Days to bulbing, X2: Days to maturity, x3: Bulb diameter, x4: Bulb length, x5: Plant height, x6: Number of edible layers, x7: Plant fresh weight, x8: Plant dry weight, x9: Leaf length, x10: Bulb yield X11: Percentage of contamination with Fusarium

نتایج تجزیه واریانس در ارقام پیاز سفید نشان داد بین ارقام از نظر تمامی صفات مورد مطالعه به‌جز درصد آلودگی به فوزاریوم تفاوت بسیار معنی‌داری وجود داشت (جدول ۴). این نتیجه نشان‌دهنده وجود تنوع ژنتیکی قابل ملاحظه در ارقام مورد مطالعه می‌باشد. کمترین و بیشترین ضریب تغییرات فنوتیپی مربوط به صفات تعداد روز تا سوخ‌دهی و طول برگ (به‌ترتیب ۲/۲۰ و ۹/۷۹) بود.

نتایج مقایسه میانگین صفات برای ارقام پیاز سفید (جدول ۵) نشان داد رقم 'مینروا' زودرس‌ترین رقم از بین ارقام پیاز سفید مورد مطالعه بود و بیشترین میانگین ارتفاع بوته و تعداد لایه‌های خوراکی را داشت. اگرچه رقم 'سایروس' دیررس‌تر از رقم 'مینروا' بود، ولی از لحاظ صفات قطر غده، طول غده، وزن تر بوته، وزن خشک بوته، طول برگ و عملکرد غده دارای بالاترین میانگین در بین ارقام مورد مطالعه بود. کمترین میانگین قطر غده، طول غده، ارتفاع بوته، تعداد لایه‌های خوراکی، وزن تر بوته و وزن خشک بوته متعلق به رقم 'مکران' بود. رقم '۴۰۴۳' کمترین مقدار طول برگ را داشت. دارابی و همکاران در مطالعات خود نیز گزارش کردند که این رقم دارای طول برگ پایینی است (Darabi *et al.*, 2020). معمولاً محصول پیاز براساس قطر غده رتبه‌بندی می‌شود و معمولاً پیازهایی که قطر غده بیشتری دارند عملکرد غده بالاتری نیز دارند. همان‌طور که مشاهده گردید، هم در ارقام پیاز زرد و هم ارقام پیاز سفید، ارقام با عملکرد بالا دارای قطر غده بیشتری بودند (جداول ۳ و ۵). یکی از بیماری‌های مهم پیاز، بیماری پوسیدگی فوزاریوم است که در سرتاسر جهان شیوع دارد و برای رشد و تکثیر تمایل به محدوده‌ی دمایی بین ۳۲-۲۸ درجه سانتی‌گراد (Taylor *et al.*, 2013) دارد.در شروع برنامه به‌نژادی هر گیاه برای یک منطقه خـاص علاوه‌بر عملکـرد بـالا، بـه سـازگاری و مقاومت نسبت به بیماری‌ها و آفات شایع در منطقه نیز باید توجه کرد. گزارش‌ها نشان داده است که ارقام پیاز قرمز و زرد نسبت به بیماری مقاوم‌تر از ارقام پیاز سفید هستند (Darabi *et al.*, 2020). در این مطالعه نیز مشاهده شد که ارقام پیاز سفید حساسیت بیشتری نسبت به ارقام زرد در برابر آلودگی به فوزاریوم داشتند. به‌طوری‌که در پیازهای زرد آلودگی به فوزاریوم مشاهده نشد،درحالی‌که در پیازهای سفید درصدی آلودگی مشاهده شد. با این وجود، تفاوت در آلودگی مشاهده شده در بین ارقام سفید از لحاظ آماری معنی‌داری نبود. از بین ارقام پیاز سفید، رقم 'سایروس' بیشترین درصد آلودگی را نشان داد، درحالی‌که رقم 'مینروا' دارای کمترین درصد آلودگی به فوزاریوم بود.

جدول ۵- صفات فنوتیپی و عملکردی در چهار رقم پیاز سفید

Table 5- Results of averages comparison of the measured traits in four white onion varieties

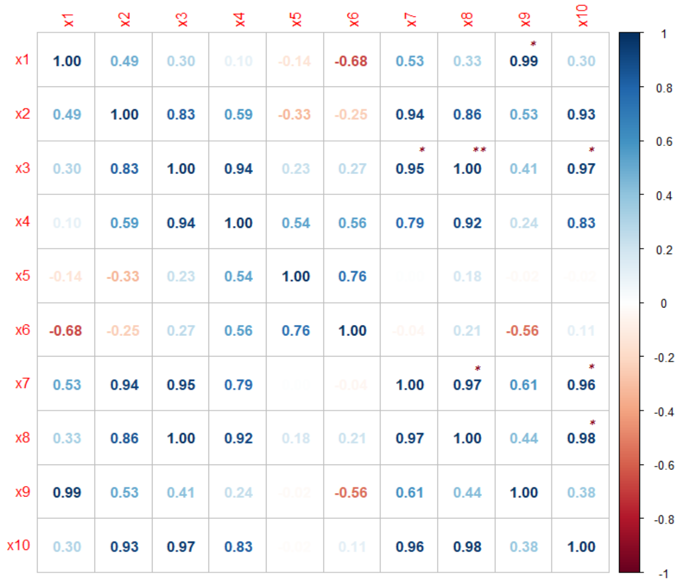
ارقام مورد مطالعه Cultivars	X1	X2	X3	X4	X5	X6	X7	X8	X9	X10	X11
'مینروا' Minerva	68.5^{b}	122.75^{d}	7.55^{c}	8.15^{b}	91^{a}	8.5^{a}	215.75^{c}	129.25^{c}	33.5^{c}	124.63^{b}	3.50^{b}
'سایروس' Cirrus	73.5^{a}	155.25^{a}	9.05^{a}	9.25^{a}	84^{b}	7.25^{b}	267.75^{a}	154.75^{a}	48.25^{a}	143.47^{a}	5.50^{a}
'۴۰۴۳' 4043	67.5^{b}	145.5^{b}	8.275^{b}	8.425^{b}	77.25^{c}	8^{ab}	243.75^{b}	142^{b}	30^{c}	137.65^{a}	4^{ab}
'مکران' Macran	71.75^{a}	135.25^{c}	7.25^{c}	6.85^{c}	73^{c}	6^{c}	221.5^{c}	124.25^{c}	4.05^{b}	124.86^{b}	4.75^{ab}

X1: تعداد روز تا سوخ‌دهی، X2: تعداد روز تا رسیدن، X3: قطر غده، X4: طول غده، X5: ارتفاع بوته، X6: تعداد لایه‌های خوراکی، X7: وزن تر بوته، X8: وزن خشک بوته، X9: طول برگ، X10: عملکرد غده، X11: درصد آلودگی به فوزاریوم

مقادیر دارای حداقل یک حرف‌مشترک، فاقد اختلاف آماری معنی‌دار با استفاده از آزمون چنددامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۵ درصد می‌باشند.

X1: Days to bulbing, X2: Days to maturity, X3: Bulb diameter, X4: Bulb length, X5: Plant height, X6: Number of edible layers, X7: Plant fresh weight, X8: Plant dry weight, X9: Leaf length, X10: Bulb yield X11: Percentage of contamination with Fusarium
Values with at least one common letter have no statistically significant difference based on Duncan's multiple range test ($p \leq 0.05$).

شکل ۴ ضرایب همبستگی مربوط به صفات مورد نظر را در چهار رقم پیاز سفید نشان می‌دهد. در اینجا نیز بین عملکرد و تعداد روز تا رسیدن ($r=0.93^{**}$)، قطر غده ($r=0.97^{**}$)، طول غده ($r=0.83^{**}$)، وزن تر بوته ($r=0.96^{**}$) و وزن خشک بوته ($r=0.98^{**}$) ارتباط مثبت و معنی‌داری وجود داشت. بین ارتفاع، تعداد لایه خوراکی و عملکرد غده ارتباط معنی‌داری مشاهده نشد. رضایی و همکاران (Rezaei *et al.*, 2019) نیز همبستگی مثبت و معنی‌داری بین عملکرد سوخ و قطر سوخ مشاهده کردند. در مطالعه‌ای که روی سیر انجام شد، مشاهده شد که هرچه قطر سوخ بیشتر باشد، عملکرد سوخ نیز افزایش می‌یابد (Baghalian *et al.*, 2005). در گونه‌های جنس پیاز بازده ژنتیکی و وراثت‌پذیری بالایی برای صفات تعداد برگ، طول برگ، وزن سوخ، قطر پیاز و طول پیاز گزارش شده است (Hosamani *et al.*, 2010; Manjunathagowda & Anjanappa 2021a).



شکل ٤- همبستگی بین صفات فنوتیپی و عملکردی در ارقام پیاز سفید

Figure 4- Correlation between the phenotypic and yield traits in white onion cultivars

X۱: تعداد روز تا سوخدهی، X۲: تعداد روز تا رسیدن، X۳: قطر غده، X۴: طول غده، X۵: ارتفاع بوته، X۶: تعداد لایه‌های خوراکی، X۷: وزن تر بوته، X۸: وزن خشک بوته، X۹: طول برگ، X۱۰: عملکرد غده

X1: Days to bulbing, X2: Days to maturity, X3: Bulb diameter, X4: Bulb length, X5: Plant height, X6: Number of edible layers, X7: Plant fresh weight, X8: Plant dry weight, X9: Leaf length, X10: Bulb yield

نتیجه‌گیری

در این پژوهش، تنوع کافی از لحاظ صفات اندازه‌گیری شده بین ارقام پیاز زرد و همچنین پیاز سفید مشاهده شد. در مناطق جنوبی استان کرمان، زودرسی پیاز از اهمیت بسیاری برخوردار است. به دلیل شرایط آب و هوایی گرم و خشک در این منطقه، زمان برداشت محصولات می‌تواند تأثیر قابل توجهی بر روی قیمت و بازارپذیری محصولات و در نتیجه، درآمد کشاورزان داشته باشد. در بین ارقام پیاز زرد، رقم 'ریوبراوو' زودرس‌ترین رقم بود. عملکرد سوخ هم شاخص مهم اقتصادی و هدف اصلی تولید پیاز است. رقم ارقام 'سوبرانا' عملکرد غده بیشتری نسبت به 'ریوبراوو' داشت، ولی حدود ۲۰ روز دیررس‌تر از رقم 'ریوبراوو' بود. آلودگی به فوزاریوم در ارقام پیاز زرد مشاهده نشد. از بین ارقام پیاز سفید نیز رقم 'مینروا' زودرس‌ترین رقم بود. در عین حال، رقم 'سایروس' عملکرد غده بیشتری نسبت به رقم 'مینروا' داشت، امّا در مقایسه با رقم 'مینروا'، هم دیررس‌تر و هم حساسیت بیشتری به بیماری فوزاریوم داشت. توصیه انتخاب بین رقم‌های پیاز می‌تواند به شرایط خاص منطقه و نیازهای کشاورزان بستگی داشته باشد. در صورتی که شرایط زمانی و حساسیت به فوزاریوم مسأله‌ای مهم برای کشاورزان باشد، ارقام 'مینروا' و 'ریوبراوو' با آلودگی کمتر به فوزاریوم ممکن است گزینه مناسبی باشند. اما اگر عملکرد غده و کیفیت محصول در اولویت باشند، و کشاورزان قادر به مدیریت دقیق زمان برداشت و انجام بررسی‌های منظم برای کنترل مشکلات مربوط به آلودگی فوزاریوم باشند، رقم 'سوبرانا' از بین پیازهای زرد و 'سایروس' از بین پیازهای سفید به دلیل عملکرد بالاتر غده، توصیه می‌شوند. همچنین می‌توان با توجه به اهداف به‌نژادی از این ارقام در برنامه‌های به‌نژادی پیاز استفاده نمود. قطر غده، طول غده، وزن تر بوته و وزن خشک بوته نیز به‌عنوان صفات موثر بر افزایش عملکرد پیاز شناسایی شدند.

References

1- Bagali, A.N., Patil, H.B., Chimmad, V.P., Patil, P.L., & Patil, R.V. (2012). Effect of inorganics and organics on growth and yield of onion (*Allium cepa* L.). *Karnataka Journal of Agricultural Sciences*, *25*(1), 112–115.

2- Baghalian, K., Ziai, S.A., Naghavi, M.R., & Naghdi Badi, H. (2005). Pre-planting evaluation of allicin content and botanical traits in Iranian garlic (*Allium sativum* L.) ecotypes. *Journal of Medicinal Plants*, *4*(13), 50-59. (In Persian)

3- Baghban, S.S., Kashi, A., Khalighi, A., Pasban, E.B., & Pasban, O.P. (2012). Inspection of some morphological and physiological traits in twelve Iranian onion population (*Allium cepa* L.). *Journal of Plant Production Research*, *18*(1), 89-104. (In Persian with English abstract)

4- Brewster, J.L. (2008). Onions and other vegetable alliums. (2nd Ed.). CABI Publishing, Wallingford, United Kingdom. https://doi.org/10.1079/9781845933999.0000

5- Darabi, A. (2020). Comparison the qualitative and quantitative characteristics of open-pollinated and hybrid short day onion cultivars in Khuzestan climatic conditions. *Iranian Journal of Horticultural Science*, *51*(3), 691-703. (In Persian with English abstract)

6- D'Ennequin, M.L.T., Panaud, O., Robert, T., & Ricroch, A. (1997). Assessment of genetic relationships among sexual and asexual forms of *Allium cepa* using morphological traits and RAPD markers. *Heredity*, *78*(4), 403-409. https://doi.org/10.1038/hdy.1997.63

7- El-Sherbeny, T.M.S., Mousa, A.M., & El-Sayed, E.S.R. (2022). Use of mycorrhizal fungi and phosphorus fertilization to improve the yield of onion (*Allium cepa* L.). plant. *Saudi Journal of Biological Sciences*, *29*(1), 331-338. https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2021.08.094

8- FAO, 2020. Agriculture statistics database.https://www.fao.org (Accessed May 2020).

9- Hosamani, R.M., Patil, B.C., & Ajjappalavara, P.S. (2010). Genetic variability and character association studies in onion (*Allium cepa* L.). *Karnataka Journal of Agricultural Sciences*, *23*(2), 302-305.

10- Mallor, C., Arnedo-Andrés, M.S., & Garcés-Claver, A. (2014). Assessing the genetic diversity of Spanish *Allium cepa* landraces for onion breeding using microsatellite markers. *Scientia Horticulturae*, *70*, 24-31. https://doi.org/10.1016/j.scienta.2014.02.040

11- Manjunathagowda, D.C., & Anjanappa, M. (2021a). Genetic variability studies for yield and yield contributing traits in onion (*Allium cepa* L.). *Vegetos*, *34*(1), 174-182. https://doi.org/10.1007/s42535-020-00170-1

12- Manjunathagowda, D.C., Anjanappa, M., Jayaswall, K., Venugopalan, R., Kumar, A., Shankarappa, K.S., & Lingaiah, H.B. (2021b). Variability and genetic diversity among selfed lines (S1) of onion (*Allium cepa* L.). *Indian Journal of Traditional Knowledge*, *20*(2), 563–568.

13- Mousavizade, S.A. (2019). Study of morphological diversity and relationships among traits in some long-day morphotypes of Iranian onion (*Allium cepa* L.) landraces. *Journal of Applied Crop Breeding, 4*(1), 61-7. (In Persian with English abstract)

14- Nourbakhsh, S.S., & Cramer, C.S. (2022). Onion plant size measurements as predictors for onion bulb size. *Horticulturae*, *8*(8), 682. https://doi.org/10.3390/horticulturae8080682

15- Porta, B., Rivas, M., Gutiérrez, L., & Galván, G.A. (2014). Variability, heritability, and correlations of agronomic traits in an onion landrace and derived S1 lines. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*, *14*, 29-35. https://doi.org/10.1590/S1984-70332014000100005

16- Przygocka-Cyna, K., Barłóg, P., Grzebisz, W., & Spiżewski, T. (2020). Onion (*Allium cepa* L.) yield and growth dynamics response to in-season patterns of nitrogen and sulfur uptake. *Agronomy*, *10*(8), 1146. https://doi.org/10.3390/agronomy10081146

17- Rezaei, J., ZareMehrjerdi, M., Mastali, H., & Yazdani, N. (2019). Morphological and phytochemical evaluation in some populations of allium from Iran. *Iranian Journal of Horticultural Science and Technology*, *20*(3), 337-348. (In Persian with English abstract). https://doi.org/20.1001.1.16807154.1398.20.3.3.4

18- Rivera, A., Mallor, C., Garcés-Claver, A., García-Ulloa, A., Pomar, F., & Silvar, C. (2016). Assessing the genetic diversity in onion (*Allium cepa* L.) landraces from northwest Spain and comparison with the European variability. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science*, *44*(2), 103-120. https://doi.org/10.1080/01140671.2016.1150308

19- Rouamba, A., Sarr, A., & Ricroch, A. (1994). Dynamic management of genetic resources of *Allium cepa* L. (onion) in West Africa. In *I International Symposium on Edible Alliaceae*, *433*, 185-190. https://doi.org/10.17660/ActaHortic.1997.433.18

20- Tanikawa, T., Takagi, M., & Ichii, M. (2002). Cultivar identification and genetic diversity in onion (*Allium cepa* L.) as evaluated by random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science*, *71*(2), 249-251. https://doi.org/10.2503/jjshs.71.249

21- Taylor, A., Vagany, V., Barbara, D.J., Thomas, B., Pink, D.A.C., Jones, J.E., & Clarkson, J.P. (2013). Identification of differential resistance to six *Fusarium oxysporum* f. sp. cepae isolates in commercial onion cultivars through the development of a rapid seedling assay. *Plant Pathology*, *62*(1), 103-111. https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2012.02624.x

22- Vakilishahrbabaki, S.M.A., & Rashidi, M. (2018). An investigation of the flora of Faryab region of kahnog city in Kerman province. *Journal of Plant Research (Iranian Journal of Biology)*, *31*(3), 721-735. (In Persian)

Journal of Horticultural Science
https://jhs.um.ac.ir

Research Article
Vol. 38, No. 2, Summer 2024, p. 431-449

Effects of Elicitors on Physiological and Phytochemical Characters of Hyssop (*Hyssopus officinalis* L. Subsp. *angustifolius* Bieb.) in Various Irrigation Conditions

M. Yadegari[1*]

1- Associate Professor, Research Center of Nutrition and Organic Products (R.C.N.O.P), Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran.
(*- Corresponding Author Email: Mehrab.Yadegari@iau.ac.ir)

Received:	17-12-2023	**How to cite this article:**
Revised:	05-03-2024	Yadegari, M. (2024). Effects of elicitors on physiological and phytochemical characters of hyssop (*Hyssopus officinalis* L. Subsp. *angustifolius* Bieb.) in various irrigation conditions. *Journal of Horticultural Science*, *38*(2), 431-449. (In Persian with English abstract). https://doi.org/10.22067/jhs.2024.85939.1311
Accepted:	06-03-2024	
Available Online:	06-03-2024	

Introduction

Hyssopus officinalis L. belongs to the family Lamiaceae, and is one of the endangered endemic species in Iran. This plant is rich in essential oil, flavonoids, monoterpene glycosides, trypanocidal terpenoids, rosmarinic acid, and linolenic acid6. The main compounds of the essential oil from *H. officinalis* L. collected from natural habitats are α-pinene, Sabinene, 3-Carene, Beta-Pinene, Cis- Pinocamphone, Myrtenol, Pinocamphone and Camphor. The environmental factors cause changes in the growth, quantity, and quality of active substances (such as alkaloids, glycosides, steroids and volatile oils) in the medicinal and aromatic plants. Among environmental stresses, water deficit stress plays an important role in the biosynthesis of secondary metabolites in medicinal and aromatic plants in arid and semi-arid regions like Iran. Drought stress has detrimental effects on growth and yield and can upset the balance between the antioxidant defense system and free radicals by stimulating a series of biochemical reactions, where free radicals cause cell damage. In sustainable production systems of medicinal and aromatic plants, stable quantitative and qualitative functions can be achieved under conditions of environmental stress and it is possible to improve the production of secondary metabolites in these plants under adverse environmental conditions. Therefore, this study was done to evaluate the organic elicitors on the physiological and phytochemical properties of *H.officinalis* to determine and introduce the best elicitor under water stress.

Materials and Methods

This investigation was done from spring (May) 2022 to fall (September) 2023 at the Research Farm (latitude. 32°20′ N, longitude. 50°51′ E, altitude. 2061 m). Based on the Köppen climate classification, the climate of the area of study is classified as cold and semiarid. The present study was conducted in a randomized complete block design (RCBD) with three replications to investigate the effect of foliar application of different organic elicitors (chitosan, salicylic acid and phenylalanine) with control level (without any spraying) on the physiological and phytochemical characters of *H. officinalis* L. In each year, treatments were performed in 3 stages (end of vegetative, beginning of flowering and 50% of flowering) and in full flowering, harvesting was done. 3 irrigation regimes (4, 6, 8 day interval) in main plots and foliar application of elicitors in sub plots were done. The essential oils were extracted by hydro-distillation and analyzed using GC/MS.

©2024 The author(s). This is an open access article distributed under Creative Commons Attribution 4.0 International License (CC BY 4.0).

https://doi.org/10.22067/jhs.2024.85939.1311

Results and Discussion

According to obtained results, applied organic elicitors significantly influenced the physiological and phytochemical characters of *H. officinalis* L. However the assayed traits showed slightly variation during the studied years. In two years, the highest chlorophyll content (17.12-17.31 $mg.Kg^{-1}$ FW) and total phenol content (1.77-1.81 $mg.g^{-1}$ DW) were obtained in chitosan (0.5 $mg.l^{-1}$) and phenyl alanine (1000 $mg.l^{-1}$) treatments respectively. In most of measured characters, plants treated with chitosan (0.5 $mg.l^{-1}$) and phenyl alanine (1000 $mg.l^{-1}$) were in the same group. Amounts of some characters in plants treated with phenyl alanine (2000 $mg.l^{-1}$) and salicylic acid (3 mM) lesser than control plants. The main constituents of essential oil were Sabinene, 3-Carene, Beta-Pinene, Cis- Pinocamphone, Myrtenol, Pinocamphone and Camphor (cyclic monoterpenes) that made the most components of essential oil plants. Among of elicitors, the chitosan effect on increasing of physiological and phytochemical characters such as the chlorophyll content was higher than other elicitors. Applied elicitors showed significant effects on essential oil content and composition of *H. officinalis* L. The highest essential oil content (0.89-0.91 %) was obtained from the treated plants by chitosan (0.5 $mg.l^{-1}$). According to the biennial results of the chemical analysis of the essential oils from plants treated with treatments by GC/MS, the most important chemical compounds that determine the quality of *H. officinalis* L. essential oil including Beta-Pinene (17.93-18.53 %), Pinocamphone (24.97-25.12 %) and Cis-Pinocamphone (42.87-45.12 %) were identified. Cis-Pinocamphone belonging to bicyclic monoterpene was the predominant constituent of essential oil of *H. officinalis* L.

Conclusion

According to the results of this study, water deficit stress caused significant phytochemical changes in the *H. officinalis* L. essential oil. The main constituents of the volatile oils of *H. officinalis* L. were Sabinene, 3-Carene, Beta-Pinene, Cis- Pinocamphone, Myrtenol, Pinocamphone and Camphor were identified in the *H. officinalis* essential oil. Generally, Foliar application of chitosan and phenyl alanine significantly increased the monoterpenes compounds in essential oils of *Hyssopus officinalis* L., so that the content of these compounds and essential oil content in treated plants by organic elicitors 63% was more than the control plants. Finally, the application of chitosan at 0.5 $mg.l^{-1}$ can be a good strategy to improve physiological and essential oil quantity and quality of *H. officinalis* L. in cold and semi-arid climates.

Keywords: Chitosan, Cis-Pinocamphone, Foliar application, Irrigation, Phenyl alanine

نشریه علوم باغبانی
https://jhs.um.ac.ir

مقاله پژوهشی
جلد ۳۸، شماره ۲، تابستان ۱۴۰۳، ص. ٤٤٩-٤٣١

اثرات محلول‌پاشی محرک‌های رشدی بر ویژگی‌های فیزیولوژیکی و فیتوشیمیایی گیاه دارویی زوفا (*Hyssopus officinalis* L. Subsp. *angustifolius* Bieb.) در شرایط آبیاری مختلف

مهراب یادگاری[1]*

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۹/۲۶
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۱۲/۱۶

چکیده

زوفا با نام علمی *Hyssopus officinalis* L. از گیاهان دارویی با ارزش و بومی ایران و از خانواده نعناعیان است. عدم رعایت اصول بهره‌برداری، از مخاطرات نابودی این گیاه ارزشمند محسوب می‌گردد. این مطالعه از بهار (اردیبهشت ماه) سال ۱۴۰۱ تا پاییز (مهرماه) سال ۱۴۰۲ در مزرعه تحقیقاتی شهرکرد انجام شد. برا ساس طبقه بندی اقلیمی کوپن، این منطقه دارای اقلیم سرد و نیمه خشک ا ست. تحقیق حا ضر در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی با سه تکرار به‌صورت کرت‌های یک بار خرد شده در جهت ارزیابی محرک‌های رشدی آلی بر برخی صفات فیزیولوژیکی، فیتوشیمیایی، اسانس و ترکیبات اسانس گیاه دارویی زوفا انجام گردید. در هر سال، تیمارها در سه مرحله قبل از گل‌دهی، شروع گل‌دهی و ۵۰ درصد گل‌دهی اعمال و در زمان گل‌دهی کامل اقدام به بردا شت شد. تیمارهای دوره آبیاری (چهار، شش و هشت روز یک بار) در کرت‌های ا صلی و محلول‌پا شی برگی (کیتوزان، ا سید سالیسیلیک و فنیل آلانین) در کرت‌های فرعی قرار گرفتند. اسانس‌گیری به‌روش تقطیر با آب، در دستگاه کلونجر و شناسایی ترکیبات با دستگاه GC/MS و GC-FID انجام شد. با توجه به نتایج به‌دست آمده، محرک‌های آلی به‌طور معنی‌داری (p<۰/۰۱) بر صفات فیزیولوژیکی و اسانس گیاه زوفا تأثیر داشتند. در مورد صفات فیزیولوژیکی بالاترین مقادیر در دو سال تحقیق برای صفات محتوای کلروفیل (۱۷/۱۲- ۱۷/۳۱ میلی‌گرم در کیلوگرم وزن تر) و فنول (۱/۷۷- ۱/۸۱ میلی‌گرم در کیلوگرم وزن تر) در تیمارهای کیتوزان (۰/۵ گرم در لیتر) و فنیل آلانین (۱۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر) تحت دور آبیاری چهار و شش روز به‌دست آمد. در بین محرک‌های مورد استفاده، اثر کیتوزان بر افزایش میزان کلروفیل کل بیشتر از سایر محرک‌ها بود. در بیشتر صفات مورد ارزیابی، گیاهان تحت تیمار کیتوزان ۰/۵ گرم در لیتر و فنیل آلانین ۱۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر در یک گروه آماری قرار گرفتند. کاربرد اسید سالیسیلیک و فنیل آلانین در مقادیر بالا بر بسیاری از صفات مورد مطالعه تأثیر معنی‌داری نداشت و با گیاهان شاهد در یک گروه آماری قرار گرفتند. براساس نتایج دو ساله محرک‌های مورد بررسی اثر معنی‌داری بر کمیت و کیفیت اسانس داشتند. بیشترین مقدار اسانس (۰/۸۹- ۰/۹۱ درصد) از گیاهان تیمار شده با کیتوزان (۰/۵ گرم در لیتر) در دور آبی چهار و شش بەد ست آمد که در قیاس با شاهد افزایشی بیش از ۶۳ در صد دا شت. تجزیه ترکیبات ا سانس زوفا بەد ست آمده از GC/MS م شخص نمود که ترکیبات غالب ا سانس در تمامی تیمارها در دو سال انجام تحقیق شامل بتا- پینن، پینوکامفون، سیس- پینوکامفون، میرتنول، سابینن، ۳- کارن، کامفور (مونوترپن‌های حلقوی) بودند. بیشترین مقادیر ترکیبات مهم و تعیین‌کننده کیفیت اسانس شامل بتا- پینن (۱۷/۹۳- ۱۸/۵۳ درصد)، پینوکامفون (۲۴/۹۷- ۲۵/۱۲ درصد)، سیس- پینوکامفون (۴۲/۸۷- ۴۵/۱۲ درصد)، غالباً در تیمارهای کیتوزان در دوره‌های آبیاری چهار و شش روز یک بار بەد ست آمد. ماده مؤثره سیس- پینوکامفون از مونوترپن‌های حلقوی ترکیب غالب در ا سانس تمامی گیاهان بود. براساس نتایج به‌دست آمده، استفاده از کیتوزان با غلظت ۰/۵ گرم در لیتر می‌تواند نقش مؤثری در بهبود صفات فیزیولوژیکی، فیتوشیمیایی و اسانس زوفا تحت شرایط اقلیمی سرد و نیمه خشک داشته باشد.

واژه‌های کلیدی: آبیاری، سیس- پینوکامفون، فنیل آلانین، کیتوزان، محلول‌پاشی

۱- دانشیار مرکز تحقیقات تغذیه و محصولات ارگانیک، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران
(*- نویسندۀ مسئول: Email: Mehrab.Yadegari@iau.ac.ir)

https://doi.org/10.22067/jhs.2024.85939.1311

مقدمه

خانواده نعناعیان، یکی از بزرگ‌ترین خانواده‌های گیاهی است که تاکنون ۲۰۰ جنس و ۲۰۰۰ گونه متعلق به آن شناخته شده است. از این خانواده، زوفا با نام علمی *Hyssopus officinalis* L. از گیاهان دارویی باارزش و بومی ایران است. گیاهی چند ساله، بوته‌ای با ساقه‌های متعدد چوبی است. برگ‌های این گیاه صاف، فاقد دندانه، باریک، کشیده و کم وبیش نیزه‌ای شکل و رنگ آن سبز و روشن است. این گیاه به خشکی مقاوم است، ولی در آغاز رویش و همچنین پس از اولین برداشت به آب کافی نیاز دارد. پس از اولین برداشت چنانچه شرایط اقلیمی مناسب باشد، به‌خصوص اگر آب کافی در اختیار گیاه باشد (در اواخر تابستان)، گیاهان مجدداً به گل می‌روند (Mozaffarian, 2008). مقدار اسانس زوفا بین ۰/۳ تا ۱ درصد و ترکیب‌های اصلی تشکیل‌دهنده اسانس کامفور، بتاکامفون، پینوکامفن، آلفا و بتا- پینن، کامفن، هیسوپین و ایزوپینوکامفون است (Zawislak, 2013).

با توجه به قرار گرفتن ایران در منطقه خشک و نیمه خشک، تنش آب یکی از مسائل محدودکننده رشدونمو گیاهان است. تنش ملایم آب منجر به افزایش مقادیر اسانس گیاهان دارویی آویشن دنایی (*T. daenensis* L.) و آویشن باغی (*T. vulgaris* L.) (Askary *et al.*, 2018)، گیاه ترخون (*Artemisia dracunculus*) (Mumivand et al., 2021)، افزایش مقادیر مالون دی آلدئید و فنول کل همیشه بهار مکزیکی (*Tagetes minuta*) (Babaei *et al.*, 2021)، آنزیم آسکوربات پراکسیداز، گایاکول پراکسیداز و سوپراکسید دیسموتاز گیاه بادرشبویه (*Dracocephalum moldavica*) (Ghanbarzadeh *et al.*, 2019)، راندمان مصرف آب، اسیدهای فنولیک و کربوهیدرات‌های محلول در آب در چچم (*Lolium multiflorum*) و علف بره (*Festuca arundinacea*) (Fariaszewska et al., 2020)، آنزیم‌های کاتالاز و پرولین گیاه سیاه‌دانه (*Nigella sativa* L.) (Hayati *et al.*, 2021)، کاهش پتانسیل آب برگ، هدایت روزنه‌ای، فتوسنتز خالص، تعرق و افزایش سزکویی ترپن‌ها در گیاه دارویی مریم گلی (*Salvia dolomitica* Codd) (Caser *et al.*, 2019) گردید. گیاهان تحت تنش خشکی تولید متابولیت‌هایی را می‌نمایند که از آن‌ها در مقابل رادیکال‌های آزاد از جمله اکسیژن رادیکال محافظت نموده و از کاهش فتوسنتز جلوگیری نمایند (Albergaria *et al.*, 2020). در تنش خشکی اسیدهای آمینه، قندها و متابولیسم تحت تأثیر قرار می‌گیرند. از آنجا که تولید متابولیت‌های ثانویه در گیاهان به‌وسیله عوامل محیطی تغییر می‌یابد و تنش رطوبتی نیز عامل مؤثری در کاهش رشد و همچنین، ساخت ترکیبات طبیعی گیاهان دارویی می‌باشد (Zandalinas *et al.*, 2017)، بنابراین، ارائه روش‌هایی که گیاه بتواند ماده مؤثره بیشتر تولید نماید، ضروری به نظر می‌رسد که باید به‌طور کامل مورد ارزیابی قرار گیرد.

از جمله روش‌هایی که به‌منظور افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه از جمله ترپنوئیدها به‌کار می‌رود، استفاده از محرک‌های زیستی و غیرزیستی می‌باشد (Ghasemi Pirbalouti *et al.*, 2017). کاربرد محرک‌های رشدی به‌میزان محدود و در غلظت‌های پایین، ساخت ترکیبات خاصی را در سلول زنده، تحریک یا بهبود بخشیده و زمان دستیابی به مقادیر بالای متابولیت‌های ثانویه را کاهش می‌دهد. محرک‌های رشدی، ترکیباتی با منشأ زیستی یا غیرزیستی هستند که از طریق القای سیستم دفاعی، باعث بیوسنتز و انباشت متابولیت‌های ثانویه و همچنین تغییرات فیزیولوژیک و مورفولوژیک، در گیاهان می‌شوند (Alavi Samany *et al.*, 2022; Naderi *et al.*, 2017). افزایش راندمان مصرف آب، کاهش تنفس نوری، افزایش سطح و دوام برگ و در نهایت، افزایش عملکرد از اثرات این محرک‌های رشدی است (Kheiri *et al.*, 2020; Yadegari, 2018). تیمار گیاهان با محرک‌ها، مشابه حمله عوامل بیماری‌زا، موجب بروز آرایشی از عکس‌العمل‌های دفاعی، از قبیل تجمع مجموعه‌ای از متابولیت‌های ثانویه‌ی دفاعی در گیاه می‌شود. محرک‌های رشد در گیاه به‌مقدار کمی وجود دارند، امّا برای رشدونمو گیاه ضروری هستند. رفتار رشدونمو گیاهان در معرض محرک‌های طبیعی یا مصنوعی رشد، تغییر می‌کند (Thakur and Kumar, 2020). از محرک‌های رشدی دارای پایه آلی می‌توان اسید سالیسیلیک، فنیل آلانین و کیتوزان را نام برد. کیتوزان از ترکیبات اصلی دیواره سلولی بسیاری از گونه‌های قارچی، میگو و خرچنگ است که برای بهبود بخشیدن ساخت متابولیت‌های ثانویه گیاهان دارویی تأیید شده‌اند (Dzung, 2011). از صفات کیتوزان می‌توان به دارا بودن خاصیت ضدویروسی، ضدقارچی، ضدباکتریایی، غیرسمی، غیرآلرژیک بودن، امکان تشکیل ترکیبات پیچیده با یون‌های فلزی و هیدروکربن آروماتیک، ابرجاذب بودن، قابلیت فوق‌العاده برای تبدیل به مواد و مشتقات متعدد در شرایط مختلف، انحلال در محلول‌های اسید آلی ضعیف مانند اسید لاکتیک و اسید استیک و افزایش عملکرد اشاره نمود (Dzung, 2011). در این راستا، کیتوزان باعث افزایش اسانس گیاهان دارویی ریحان (*Ocimum basilicum*) و بادرنجبویه (*Melissa officinalis* L.) (Hawrylak-Nowak *et al.*, 2021)، مرزه (*Satureja hortensis* L.) (Alizadeh *et al.*, 2020)، مرزنگوش (*Origanum vulgare*) (Heng *et al.*, 2012)، نعناع فلفلی (*Mentha piperita* L.)

(Ahmad *et al.*, 2017) و آویشن دنایی (*Thymus daenensis*) (Emami-Bistgani *et al.*, 2017) گردیده است.

فنیل آلانین یکی از محرک‌های آلی و آروماتیک است و به‌عنوان پیش‌ساز فنیل آلانین آمونیالیاز (PAL) در مسیر فنیل پروپانوئید نقش کلیدی دارد (Govindaraju *et al.*, 2018). نقش بسیار مؤثر این محرک در افزایش عملکرد کمّی و کیفی اسانس گیاهان دارویی گل محمدی (*Rosa damascena* Mill.) (Rajabzadeh *et al.*, 2024)، مریم گلی (*Salvia officinalis* L.) (Rahmani Samani *et al.*, 2019)، زوفا (*Hyssopus officinalis* L.) (Aghaei *et al.*, 2019) و مرزه (*Satureja hortensis*) (Poorghadir *et al.*, 2020) گزارش شده است.

از دیگر محرک‌های آلی اسید سالیسیلیک بوده که کاربرد آن منجر به افزایش مقدار اسانس و تحمل به خشکی آویشن دنایی (*Thymus daenensis* Celak) (Abdi *et al.*, 2022)، افزایش مقادیر فنیل‌پروپانوئیدی کنگرفرنگی (*Cynara scolymus*) (Zamani *et al.*, 2016)، اسانس و ترکیبات اسانس گیاهان دارویی مریم‌گلی (*Salvia officinalis*) (Yadegari, 2018)، بومادران (*Achillea millefolium* L.) (Gorni *et al.*, 2020)، زرین گیاه (*Dracocephalum kotschyi* Boiss) (Shaykh-Samani *et al.*, 2023) و گونه‌های آویشن (*Thymus kotschyanus* و *Thymus vulgaris*) (Mohammadi *et al.*, 2019) شده است. محلول‌پاشی توأم اسید سالیسیلیک، کیتوزان و فنیل آلانین، منجر به افزایش اسانس و ترکیبات اسانس گیاه دارویی گل محمدی (*Rosa damascena* Mill.) (Rajabzadeh *et al.*, 2023) شده است.

از آنجایی که هدف از تولید تجاری گیاهان دارویی، به‌دست آوردن مقدار بیشتری ماده خشک در واحد سطح است که دارای مقادیر بالاتری از مواد مؤثره نیز باشد، آگاهی از عوامل مدیریتی مناسب جهت به‌دست آوردن پتانسیل عملکرد گیاه دارویی زوفا بسیار حائز اهمیت است. لذا، معرفی مناسب‌ترین غلظت از محرک‌های رشدی تحت شرایط کم آبیاری در جهت بالا بردن عملکرد و میزان ماده‌ی مؤثره در گیاه دارویی زوفا امری ضروری به نظر می‌رسد.

مواد و روش‌ها

طرح تحقیق: پژوهش حاضر در مزرعه تحقیقاتی پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد با مشخصات عرض جغرافیایی ۳۲ درجه و ۲۰ دقیقه شمالی و طول جغرافیایی ۵۰ درجه و ۵۱ دقیقه شرقی و ارتفاع ۲۰۶۱ متر از سطح دریا، در طی سال‌های زراعی ۱۴۰۱ و ۱۴۰۲ انجام گردید. طی دو سال زراعی، تیمارهای پایه آلی شامل کیتوزان (۰/۲۵ و ۰/۵ گرم در لیتر)، اسید سالیسیلیک (۱/۵ و ۳ میلی مولار) و فنیل آلانین (۱۰۰۰ و ۲۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر) و شاهد (بدون هر نوع محلول‌پاشی) برای این پژوهش انتخاب شد. محلول‌های کیتوزان و فنیل آلانین براساس غلظت‌های تعیین شده در پایه آب تهیه شد. با توجه به جرم مولکولی اسید سالیسیلیک (۱۳۸/۱۲ گرم بر مول)، برای تهیه اسید سالیسیلیک ۱/۵ میلی‌مولار، ۲۰۷/۱۸ گرم و برای تهیه محلول اسید سالیسیلیک ۳ میلی‌مولار، ۴۱۴/۳۶ گرم، از آن، ابتدا در اتانول۷۰ درصد حل نموده و سپس با آب، به حجم ۱۰۰۰ میلی‌لیتر رسانده شد. پژوهش به‌صورت کرت‌های یک بار خرد شده در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی با سه تکرار و سه سطح آبیاری (چهار، شش و هشت روز یک بار) در کرت‌های اصلی و تیمارهای محلول‌پاشی برگی در سه مرحله (اوج رشد رویشی، شروع گل‌دهی و ۵۰ درصد گل‌دهی) در کرت‌های فرعی انجام شد (Aghaei *et al.*, 2019).

کاشت گیاه زوفا: زمین مورد نظر در پاییز شخم زده شده و سپس در بهار پس از مساعد شدن شرایط آب وهوایی کرت اصلی در هر تکرار (بلوک) به عرض حدود هفت متر و طول دو متر (۲×۷) با فاصله ۱/۵ متر از همدیگر آماده و سپس هرکدام از کرت‌ها به سه قسمت مساوی به عرض حدود دو متر با فاصله ۰/۵ متر از همدیگر مجزا و آماده به کشت شدند. این کار در هر تکرار (بلوک) انجام شده و فاصله هر بلوک از هم دو متر و جهت انجام کار عمود بر شیب زمین بود. نشاهای ۴-۶ برگی زوفا تهیه شده از شرکت پاکان بذر اصفهان، در سال اول در تاریخ ۱۵ اردیبهشت ماه و در سال دوم در ۲۰ اردیبهشت ماه در کرت‌های آزمایشی کاشت شدند و بلافاصله آبیاری انجام شد. مشخصات خاکشناسی و اقلیمی منطقه مورد تحقیق در جدول ۱ و مشخصات آب مورد استفاده جهت آبیاری در جدول ۲ آورده شده است.

برداشت نمونه‌ها: نمونه‌های گیاهی شامل اندام‌های رویشی و گل، در زمان گل‌دهی (باز شدن ۵۰-۷۰ درصد از گل‌ها در هر خوشه) به‌طور جداگانه از هر کدام از تیمارهای تحت آزمایش در سال اول در ۲۴ مرداد ماه و در سال دوم در ۲۸ مرداد ماه جمع‌آوری گردید. همچنین، در همین زمان از برگ‌های جوان کاملاً توسعه یافته گیاهان تیمار شده جهت اندازه‌گیری صفات فیزیولوژیکی و فیتوشیمیایی نمونه‌برداری انجام گرفت و نمونه‌های برداشت شده در مزرعه بلافاصله در فویل آلومینیومی پیچیده و بعد از برچسب زدن نام تیمار در تانک حاوی نیتروژن مایع قرار گرفته، به آزمایشگاه انتقال داده و صفات ذیل مورد محاسبه قرار گرفت.

جدول ۱- مشخصات خاکشناسی و اقلیمی محل پژوهش

Table 1- Physicochemical and climatic properties of experimental field

خصوصیات Properties	سال Year 2022	2023
فسفر P (ppm)	82	83
پتاسیم K (ppm)	209.2	212
نیتروژن N (ppm)	0.09	0.08
هدایت الکتریکی EC ($ds.m^{-1}$)	0.41	0.42
کربن آلی Organic Carbon (%)	0.77	0.85
اسیدیته pH	7.4	7.3
میانگین بارش Average rainfall (mm)	311.1	309.3
میانگین دما Average temperature (^0C)	11.6	11.2
میانگین دمای بیشینه Average maximum temperature (^0C)	22.6	21.8
میانگین دمای کمینه Average minimum temperature (^0C)	-12.4	-12.1

جدول ۲- مشخصات آب مورد استفاده جهت آبیاری

Table 2- The properties of irrigation water

کربنات کلسیم HCO_3^- ($meq.l^{-1}$)	کلر Cl^- ($meq.l^{-1}$)	منیزیم Mg^{2+} ($meq.l^{-1}$)	کلسیم Ca^{2+} ($meq.l^{-1}$)	پتاسیم K^+ ($meq.l^{-1}$)	سدیم Na^+ ($meq.l^{-1}$)	کل مواد محلول TDS ($mg.l^{-1}$)	هدایت الکتریکی E.C ($\mu s.cm^{-1}$)	اسیدیته pH
3.42	0.91	1.43	2.28	0.16	0.763	247.93	387	8.11

ادامه جدول ۲- مشخصات آب مورد استفاده جهت آبیاری

Table 2 Continued- The properties of irrigation water

نیترات NO_3^- ($meq.l^{-1}$)	روی Zn ($meq.l^{-1}$)	منگنز Mn ($meq.l^{-1}$)	مس Cu ($meq.l^{-1}$)	آهن Fe ($meq.l^{-1}$)	کادمیم Cd ($meq.l^{-1}$)	سولفات SO_4^{2-} ($meq.l^{-1}$)	کربنات CO_3^{2-} ($meq.l^{-1}$)
23.67	0.001	0.001	0.001	0.009	0	0.001	0.21

اندازه‌گیری صفات مورد ارزیابی: برای برآورد محتوای نسبی آب برگ، ۰/۵ گرم از جوان‌ترین برگ توسعه یافته هر گیاه (FW) جدا کرده و سپس نمونه‌ها به‌مدت ۲۴ ساعت در آب مقطر شناور گردیدند. پس از گذشت این مدت، وزن اشباع برگ با ترازوی دیجیتال با دقت ۰/۰۰۱ برآورد گردید (TW). سپس برگ‌ها به‌مدت ۲۴ ساعت در آون با دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند و بعد از گذشت این مدت وزن خشک برگ‌ها با ترازوی دیجیتال با دقت ۰/۰۰۱ برآورد گردید (DW).

در نهایت، محتوای آب نسبی با استفاده از معادله زیر محاسبه گردید (Arnon, 1975):

% R.W.C= (FW-DW) / (TW-DW)

جهت اندازه‌گیری کلروفیل کل، ۰/۱۲۵ گرم بافت برگ تازه با ۱۰ میلی‌لیتر استون ۸۰ درصد و ۰/۱ گرم کربنات کلسیم (برای خنثی نمودن حالت اسیدی مایع درون سلولی و ممانعت از تخریب کلروفیل) در یک هاون چینی ساییده شد تا به‌صورت توده یکنواختی درآمد. این عمل در نور کم و محیط خنک انجام شد. پس از سانتریفیوژ کردن

عصاره حاصل به‌مدت ۱۰ دقیقه با دور ۳۵۰۰ در دقیقه، محلول رویی برداشته شد و جذب نور توسط آن در طول موج‌های ۶۶۳ نانومتر (حداکثر جذب نور کلروفیل a) و ۶۴۵ نانومتر (حداکثر جذب نور کلروفیل b) توسط دستگاه اسپکتروفتومتر (مدل CARY-100 ساخت واریان استرالیا) و با استفاده از استون ۸۰ درصد به‌عنوان محلول مرجع قرائت گردید (Dere *et al.*, 1998):

Chl total (mg.Kg Fw^{-1}) = (20.21 × A645) + (8.02 × A663)

محتوای ترکیبات فنول کل با استفاده از معرف فولین- سیوکالتو اندازه‌گیری شد. برای تهیه عصاره متانولی، ۰/۲ گرم (۲۰۰ میلی‌گرم) برگ تازه از برگ‌های جوان کاملاً توسعه یافته جدا شد و در هاون چینی با ۲۰ میلی‌لیتر متانول ۹۹ درصد عصاره‌گیری گردید. سپس به‌مدت پنج دقیقه با سرعت ۴۵۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. بخش شفاف قسمت فوقانی آن برای آزمایش‌ها جداسازی شد. سپس به ۰/۲ میلی لیتر از عصاره متانولی، ۱/۸ میلی‌لیتر آب دوبار تقطیر، ۰/۲ میلی‌لیتر معرف فولین- سیوکالتو (رقیق شده با نسبت ۱ به ۱۵) اضافه و به‌خوبی مخلوط گردید. پس از گذشت پنج دقیقه، ۰/۲ میلی‌لیتر محلول بی کربنات سدیم ۷ درصد و ۰/۸ میلی‌لیتر آب دوبار تقطیر به محلول اضافه شد و۹۰ دقیقه در دمای اتاق و شرایط تاریکی نگهداری شد. سپس جذب نمونه‌ها در ۷۵۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر ساخت کشور آمریکا مدل Perklin elmer قرائت و محتوای ترکیبات فنولی کل عصاره‌ها بر حسب میلی‌گرم اسید گالیک به کیلوگرم وزن تر اندام هوایی محاسبه گردید (Marinova *et al.*, 2005).

جهت تعیین میزان اسید آمینه پرولین، ابتدا ۰/۳ گرم از بافت برگ تازه با ۱۰ میلی‌لیتر اسید سولفوسالیسیلیک سه درصد (وزن به حجم) در هاون چینی ساییده شد. سپس نمونه ساییده شده درون لوله آزمایش ریخته و به‌مدت دو دقیقه به‌شدت تکان داده شد. بدین ترتیب، دو فاز جامد و مایع نمونه‌ها به‌دقت تفکیک گردید. فاز مایع با سرعت ۳۵۰۰ دور در دقیقه، به‌مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ گردید و بخش بالایی آن جدا شد. پس از خنک کردن نمونه‌ها در آب یخ، چهار میلی‌لیتر تولوئن به هر نمونه اضافه و کاملاً تکان داده شد تا پرولین وارد فاز تولوئن گردد. سپس، نمونه‌ها به‌مدت ۳۰ دقیقه به حال سکون رها شدند و در نهایت، میزان جذب نور فاز بالایی نمونه‌ها به کمک دستگاه اسپکتروفتومتر (مدل CARY-100 ساخت واریان استرالیا) در طول موج ۵۱۵ نانومتر و با استفاده از تولوئن به‌عنوان محلول مرجع تعیین گردید. در رابطه ذیل، عدد ۱۱۵/۵ وزن مولکولی پرولین می‌باشد (Bates *et al.*, 1973):

پرولین (میکروگرم در گرم وزن تر)= ۱۱۵/۵(میکروگرم در میکرومول) / حجم عصاره (میلی‌لیتر) × پرولین عصاره (میکروگرم در میلی‌لیتر) × وزن نمونه (گرم) /۵

برای اسانس‌گیری، پس از برداشت نمونه‌های گیاهی، به‌منظور محافظت نوری نمونه‌ها و حداقل آسیب به کیفیت اسانس، ساختارهای هوایی در پاکت‌های کاغذی جمع‌آوری شدند. به‌روش هوای آزاد در سایه با دمای معمولی ۳۰-۲۵ درجه سانتی‌گراد، کاملاً خشک شدند. بعد از خشک شدن ساختارهای هوایی، اقدام به خرد کردن اندام‌های گیاهی گردید. سپس مقدار ۳۰۰ گرم از هر نمونه با ترازوی دیجیتالی مدل Sartorius ساخت کشور آلمان با دقت ۰/۰۰۱ گرم توزین شد. اسانس‌گیری به‌روش تقطیر با آب، در دستگاه کلونجر (بروسیلیکات آلمانی ساخت شیشه آلات ایران) و براساس درصد وزنی ماده خشک، صورت گرفت که برای هر نمونه مدت تقریبی دو ساعت به طول انجامید. اسانس گیاهان مورد نظر پس از آماده‌سازی، جهت شناسایی ترکیبات به دستگاه GC/MS (مدل7890A/5975C ساخت اجیلنت آمریکا) مجهز به ستون موئینه HP-5MS به‌طول ۳۰ متر و قطر داخلی ۰/۲۵ میکرون با محدوده دمایی آون ستون از ۶۰ تا ۲۴۰ درجه سانتی‌گراد تزریق گردید. شناسایی طیف‌ها به کمک شاخص بازداری آن‌ها و مقایسه آن با شاخص‌های موجود درکتب مرجع (Adams, 2007) و با استفاده از طیف‌های جرمی ترکیبات استاندارد و استفاده از اطلاعات موجود در کتابخانه کامپیوتری (Wiley and NIST) صورت گرفت.

روش انجام تجزیه داده‌ها: پس از انجام آزمون همگنی واریانس‌های خطای آزمایشی (بارتلت) و مشخص شدن عدم معنی‌داری در هر دو سال، تجزیه مرکب اطلاعات برآمده از پژوهش به‌واسطه نرم‌افزار آماری $SAS_{ver.9}$ انجام شد. مقایسات میانگین اسانس و ترکیبات اسانس از روش حداقل اختلاف معنی‌دار (L.S.D) در سطح احتمال ۱ درصد انجام شد و برای اطمینان از مقادیر خطای استاندارد (SE)، به‌طور جداگانه نیز با نرم‌افزار Excel ver. 2013، برآورد مجدد انجام شد.

نتایج و بحث

صفات فیزیولوژیکی: تیمارهای مورد استفاده بر صفات فیزیولوژیکی مورد برآورد، اثرات چشم‌گیری داشتند. به‌جز اثر سه گانه آبیاری- محرک- سال، سایر اثرات ساده و متقابل در غالب موارد در سطح ۹۹ درصد اطمینان (p<۰/۰۱) معنی‌دار بودند (جدول ۳). بیشترین مقادیر صفات مورد ارزیابی در دو سال انجام تحقیق در مورد صفات کلروفیل کل (۱۷/۱۲- ۱۷/۳۱ میلی‌گرم در کیلوگرم وزن تر)، کلروفیل a (۱۱/۹۱- ۱۳/۱۲ میلی‌گرم در کیلوگرم وزن تر)، کلروفیل b (۴/۰۱- ۵/۷ میلی‌گرم در کیلوگرم وزن تر)، محتوای نسبی آب برگ (۶۲/۸- ۶۳/۵ درصد)، در دور آبیاری چهار و شش روز یک بار و در گیاهان تحت تیمار با ۰/۵ گرم در لیتر کیتوزان و ۱۰۰۰ میلی‌گرم در

لیتر فنیل آلانین بەدست آمد؛ هر چند که تیمار ۱/۵ میلی‌مولار اسید سالسیلیک نیز در برخی از صفات مورد برآورد در گروه مشابهی قرار گرفت. کمترین مقادیر نیز غالباً در دور آبیاری هشت روز یک بار و در گیاهان شاهد و یا در پاره‌ای از موارد با تیمار اسید سالیسیلیک سه میلی‌مولار بەدست آمد (جداول ۴-۶). مقایسه میانگین داده‌ها نشان داد که با کاهش رطوبت یا به عبارتی، افزایش فواصل آبیاری صفات فیزیولوژیکی و فیتوشیمیایی زوفا کاهش یافت. اثر تنش آبی بر توسعه دیواره سلولی در اثر فشار تورژسانس صورت می‌گیرد. بنابراین، هر کاهش در فشار تورژسانس که ناشی از عدم تعادل در وضعیت آب گیاه باشد، منجر به کاهش رشد و حتی در صورت شدید بودن خشکی موجب توقف رشد می‌شود (Fariaszewska *et al.*, 2020; Kulak, 2020). در شرایط کمبود آب به علت صدمات متابولیکی و تغییر سطح متابولیت های مربوطه، تثبیت دی‌اکسیدکربن کاهش می‌یابد. از طرف دیگر، کمبود آب عموماً باعث تخریب و شکسته شدن کلروپلاست‌ها و کاهش میزان کلروفیل شده و مقدار فعالیت آنزیم‌ها را طی فرآیند فتوسنتز کاهش می‌دهد (Xiaolu *et al.*, 2016; Zandalinas *et al.*, 2017). به نظر می‌رسد کاربرد محرک کیتوزان از طریق افزایش سطح برگ و فراهم نمودن زمینه مناسب جهت دریافت انرژی و نیز شرکت در ساختار کلروفیل و آنزیم‌های درگیر در متابولیسم کربن فتوسنتزی موجب افزایش بازده فتوسنتزی می‌شود (Alavi Samany *et al.*, 2022; Alizadeh *et al.*, 2020). نتایج حاصل از پژوهش حاضر نشان داد که تنش کم‌آبی بر میزان رنگیزه‌های فتوسنتزی (کلروفیل a و b) اثر معنی‌دار داشته است. نتایج بەدست آمده از آنالیز رنگیزه‌های فتوسنتزی نشان داد که با افزایش شدت کمبود آب در غالب موارد به‌طور معنی-داری از میزان رنگیزه‌های کلروفیل a و b کاسته شد (p<۰/۰۱). به‌طور کلی، اولین واکنش گیاهان در برابر کمبود آب کاهش رشد رویشی آن ها است. رشد سلول مهم‌ترین فرآیند است که با تنش آبی تحت تأثیر قرار می‌گیرد. نتایج حاصل از جدول تجزیه واریانس مرکب صفات نشان داد که تنش کم‌آبی بر تمام صفات مورد ارزیابی اثر معنی‌داری داشته است. البته با توجه به تحمل نسبی این گیاه به خشکی، بیشترین مقادیر صفات فیزیولوژیکی در دور آبی شش روز یک بار بەدست آمد و پس از آن کاهش نسبی در مقادیر محرز بود. کاهش کلروفیل در شرایط خشکی تا حدودی به علت افزایش تولید رادیکال‌های اکسیژن است که باعث پراکسیداسیون این رنگیزه‌ها و سرانجام تجزیه شیمیایی آن‌ها می شود. دلیل دیگر کاهش کلروفیل برگ‌ها، تغییر متابولیسم نیتروژن و استفاده بیشتر از گلوتامات (ماده اولیه سنتز کلروفیل و پرولین) در مسیر تولید پرولین است (Caser *et al.*, 2019). محرک‌ها با تحت تأثیر قرار دادن خصوصیات فیزیولوژیکی، رشد و عملکرد گیاه را تحت تأثیر قرار می‌دهند. اسید سالیسیلیک با دو مکانیسم افزایش میزان کلروفیل و بهبود فعالیت آنزیم‌های دخیل در فتوسنتز نقش مهمی در متابولیسم کربوهیدرات‌ها و بهبود رشد زایشی گیاهان تیمار شده دارد (Ali *et al.*, 2021). محرک‌های آلی از جمله کیتوزان منجر به، بهبود سنتز و تجمع کلروفیل می‌شوند و کارایی فتوسیستم‌ها را افزایش می‌دهند و همچنین از طریق افزایش رشد ریشه، جذب عناصر غذایی و میزان سنتز کلروفیل در گیاهان را بهبود می‌بخشند که منجر به افزایش رشد و عملکرد می‌گردند (Abdul-Hafeez & Ibrahim, 2020).

صفات فیتوشیمیایی: تیمارهای مورد استفاده، اثرات معنی‌داری بر صفات فیتوشیمیایی داشتند. به‌جز اثر سه گانه آبیاری- محرک- سال، سایر اثرات ساده و متقابل در سطح ۹۹ درصد اطمینان (p<۰/۰۱) معنی‌دار بودند (جدول ۳). بیشترین مقادیر فنول کل (۱/۷۷- ۱/۸۱ میلی‌گرم در کیلوگرم وزن تر)، در دور آبیاری چهار و شش روز یک بار و در گیاهان تحت تیمار با ۰/۵ گرم در لیتر کیتوزان و ۱۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر فنیل آلانین بەدست آمد. بیشترین مقادیر پرولین در دو سال انجام تحقیق (۳۲/۷۷- ۳۴/۱ میکروگرم در گرم وزن تر) در تیمارهای تحت دور آبیاری هشت روز و در محلول‌پاشی اسید سالیسیلیک سه مولار و یا شاهد بەدست آمد. کمترین مقادیر پرولین (۱۶/۵۶- ۱۵/۹۹ میکروگرم در گرم وزن تر) نیز در تیمارهای تحت دور آبیاری چهار روز و در محلول‌پاشی کیتوزان ۰/۵ گرم در لیتر ایجاد شد (جداول ۴-۶). کاهش مقدار کلروفیل به هنگام تنش کمبود آب می‌تواند به‌دلیل تحریک آنزیم بیوسنتز پرولین یعنی گلوتامیل کیناز در پتانسیل آبی پایین باشد. با افزایش تبدیل گلوتامات به پرولین در هنگام تنش خشکی، در واقع گلوتامات که پیش‌ساز کلروفیل نیز می‌باشد، از دسترس خارج شده و سنتز کلروفیل‌ها دچار نقصان می‌شود. به عبارتی، کاهش سنتز کلروفیل می‌تواند به علت کاهش تجمع اسید آمینولوولیئیک باشد. این اسید پیش‌ساز همه تتراپیرول‌ها و پیش‌ساز پروتوکلروفیلید است که در معرض نور به کلروفیل تبدیل می‌شود و در تنش خشکی کاهش می‌یابد. از طرف دیگر، فعالیت آنزیم گلوتامات‌کیناز که اولین آنزیم مسیر بیوسنتز کلروفیل است، با تنش خشکی بسیار کاهش می‌یابد (Caser *et al.*, 2019; Esch *et al.*, 2019). از سوی دیگر، فنولیک اسیدها با داشتن ساختار ویژه دارای پتانسیل بالایی برای برهمکنش با پروتئین‌های مختلف از جمله آنزیم‌ها می‌باشند. به همین دلیل آن‌ها می‌توانند باعث ممانعت از فعالیت آنزیم‌هایی مانند ایزوفرم‌های مختلف سیتوکرم P_{450}، سیکلواکسیژناز، الکل دهیدروژناز، لیپواکسیژناز و زانتین‌اکسیداز شوند که در طی فعالیت خود مقادیر بالای رادیکال‌های آزاد تولید می کنند و از طرفی، میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی را افزایش دهند (Abdi *et al.*, 2022; Abdul-Hafeez & Ibrahim, 2021).

محرک‌ها با افزایش ظرفیت فتوسنتزی و کربوهیدرات‌ها، مواد اولیه را برای سنتز ترکیبات فنولی، فلاونوئیدی و آنتوسیانین‌ها فراهم می

آورند. علت افزایش ترکیبات فنولی در تیمار با محرک‌های مختلف، اثر این ترکیبات بر فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیالیاز و افزایش فعالیت این آنزیم است (Alizadeh & Fattahi, 2021). از آنجا که این آنزیم یک آنزیم کلیدی در بیوسنتز همه ترکیبات فنولی است، به نظر می‌رسد که در تحقیق حاضر نیز تغییر فعالیت این آنزیم یکی از دلایل افزایش مقدار ترکیبات فنولی در گیاهان زوفا باشد. سنتز ترکیبات فنولی در بافت‌های گیاهی وابسته به کربوهیدرات‌ها می‌باشد. به نظر می‌رسد که افزایش جذب عناصر غذایی در تیمارهای محلول‌پاشی به‌طور غیرمستقیم با تحت تأثیر قرار دادن متابولیسم کربوهیدرات‌ها، این ترکیبات را به‌سمت سنتز ترکیبات فنولی هدایت می‌کند که نتیجه آن افزایش مقدار این ترکیبات می‌باشد (Ghasemi Pirbalouti *et al.*, 2017). گزارش‌های دیگر نشان داد که کاهش میزان کلروفیل در اثر تنش خشکی مربوط به افزایش تولید گونه‌های واکنش‌گر اکسیژن می‌باشد که موجب پراکسیداسیون و در نتیجه، تجزیه این رنگیزه‌ها می‌شود. همان‌طور که اشاره شد، کاهش مقدار کلروفیل در اثر تنش خشکی در سایر گونه‌های گیاهی نیز گزارش شده است (Emami-Bistgani *et al.*, 2017; Fariaszewska *et al.*, 2020). با توجه به وجود عنصر نیتروژن در محرک کیتوزان و نقش ساختاری این عنصر در حلقه‌های تتراپیرولی کلروفیل، چنین افزایشی توجیه‌پذیر می‌باشد. از طرف دیگر، احتمالاً مصرف کیتوزان با تأثیر بر روی ژن‌های مسئول سازنده کلروفیل، تولید کلروفیل را زیاد نموده است (Dzung, 2011). میزان رنگیزه‌های کلروفیلی تحت تأثیر کیتوزان افزایش یافت. از نتایج حاصل از این پژوهش نیز می‌توان نتیجه گرفت که محرکی مثل کیتوزان با افزایش محتوای رنگیزه‌ها، روی رشد، متابولیسم و فتوسنتز گیاه زوفا تأثیر مثبتی دارد (Khosh Eqbal *et al.*, 2020).

پرولین مکانیسم‌هایی مثل تشکیل باندهای هیدروژنی آبی در اطراف پروتئین‌ها را برای حفاظت ساختار آن‌ها و زدودن رادیکال‌های آزاد فعال می‌کند. به¬طور کلی،گیاهان می‌توانند خودشان را تا اندازه‌ای در مقابل تنش خشکی ملایم توسط تجمع اسمولیت‌ها به‌خصوص پرولین محافظت کنند. با کاهش پتانسیل آب، میزان سنتز پرولین از اسید گلوتامیک افزایش می‌یابد (Caser *et al.*, 2019; Esch *et al.*, 2019). تجمع پرولین در زمان تنش، به علت تغییر در سرعت اکسیداسیون پرولین به گلوتامات یا عدم دخالت آن در سنتز پروتئین و یا مجموعه این عوامل می‌باشد. از طرف دیگر، در گیاهان مقاوم به خشکی میزان اکسیداسیون مولکول‌ها کاهش می‌یابد که یکی از پیامدهای آن افزایش پرولین است (Shaykh-Samani *et al.*, 2023). به‌طور کلی، متابولیت‌های ثانویه به گیاهان دارویی و معطر کمک می‌کنند تا گیاه به شرایط و تنش‌های محیطی مانند خشکی سازگاری بیشتری پیدا کند. به‌علاوه، تأثیرات ناشی از تنش در افزایش اسانس عمدتاً به علت اثر آن بر رشدونمو گیاه است. گیاهان غلظت بالایی از متابولیت‌ها را تحت شرایط کمبود آب تولید می‌کنند و مقدار کمتری از کربن را به رشد تخصیص می دهند که نشان از یک تعادل بین دفاع و رشد می‌باشد (Babaei *et al.*, 2021). به‌طور کلی، نتایج تحقیقات نشان داده است که تنش‌های محیطی غیرزنده مانند تنش خشکی اثرات مهمی بر صفات فیتوشیمیایی گیاهان دارویی ایجاد می‌نمایند (Ghasemi Pirbalouti *et al.*, 2017). افزایش تنش خشکی در گیاهان، منجر به افزایش اسید آمینه پرولین گردیده و میزان ذخیره آن در سیتوپلاسم سلولی بیشتر می‌شود. این اسید آمینه در حفاظت سلولی نقش دارد و می‌تواند تا اندازه‌ای موجب ادامه جذب آب از محیط ریشه شود، لیکن اتکای گیاه به این ترکیبات آلی برای تنظیم اسمزی هزینه‌بر بوده و گیاه از طریق کاهش عملکرد این هزینه را جبران می‌نماید. تنش خشکی منجر به کاهش میزان کلروفیل کل گیاه گردیده و از این طریق، منجر به کاهش اسانس نیز می‌شود. افزایش صفات مورفولوژیکی از جمله ارتفاع، وزن خشک گیاه در اثر کاربرد مواد محرک گیاهی را می‌توان به افزایش تولید فیتوهورمون‌ها به‌خصوص ایندول استیک اسید نسبت داد (Zakerian *et al.*, 2020).

اسانس و ترکیبات اسانس: نتایج نشان داد که اثرگذاری تیمارهای آزمایشی در هر دو سال بر میزان اسانس و ترکیبات غالب اسانس، معنی‌دار بود (جدول ۷). در سال نخست پژوهش حاضر، دور آبیاری شش روز یک بار و محلول‌پاشی کیتوزان (۰/۵ گرم در لیتر) و در سال دوم، دور آبیاری چهار روز یک بار و محلول‌پاشی کیتوزان (۰/۵ گرم در لیتر) مقدار اسانس استخراج شده از ساختار هوایی گیاهان زوفا را به‌میزان ۰/۸۹ و ۰/۹۱ درصد رسانید که بیانگر کارایی بالاتر تیمار کیتوزان در افزایش سنتز و تجمع اسانس گیاه زوفا است، هر چند که تیمار فنیل آلانین (۱۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر) نیز در گروه آماری مشابه قرار گرفت. در دور آبیاری بیش از شش روز یک بار، کاهش کلی اسانس و ترکیبات اسانس روی داد و بر این اسانس کمترین مقادیر اسانس و ترکیبات اسانس در دور آبیاری هشت روز یک بار و در گیاهان شاهد به‌دست آمد که در بسیاری از موارد با تیمار اسید سالیسیلیک (۳ میلی مولار) و فنیل آلانین (۲۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر) در یک گروه آماری قرار گرفتند. در این دور آبیاری نیز در سال اول تیمار فنیل آلانین و کیتوزان (به‌خصوص در غلظت کم) توانست درصد اسانس را به‌طور معنی‌داری افزایش دهد (جداول ۸–۱۰).

جدول ۳- تجزیه واریانس مرکب (میانگین مربعات) صفات فیزیولوژیکی گیاه زوفا در سال‌های اجرای تحقیق

Table 3- Combined ANOVA (mean squares) for physiological properties in *Hyssopus officinalis* L. subsp. *angustifolius* Bieb.

منابع تغییرات S.O.V$_z$	درجه آزادی df$_y$	پرولین Proline	کلروفیل کل Total chlorophyll	کلروفیل b Chlorophyll b	کلروفیل a Chlorophyll a	فنول کل Total phenol	محتوای نسبی آب R.W.C
سال Year (Y)	1	14.1^{**}	9.28^{**}	0.93^{ns}	11.5^{**}	0.14^{ns}	11.4^{**}
تکرار (سال) R (Y)	4	0.8	0.86	1.17	0.15	1.22	0.6
آبیاری Irrigation (A)	2	18.2^{**}	8.9^{**}	14.6^{**}	7.9^{**}	26.05^{**}	15.9^{**}
A × Y	2	11.08^{**}	3.88^{**}	7.65^{**}	17.77^{**}	12.88^{**}	21.04^{**}
خطای کرت‌های‌اصلی E_a	8	1.01	0.17	0.17	0.56	1.21	0.17
محرک Elicitor (B)	6	22.8^{**}	3.2^{**}	12.09^{**}	15.87^{**}	15.77^{**}	16.1^{**}
A × B	12	10.92^{**}	1.1^{**}	8.8^{**}	20.14^{**}	14.89^{**}	19.3^{**}
B × Y	6	9.67^{**}	1.07^{**}	6.34^{**}	15.22^{**}	11.96^{**}	9.89^{**}
A × B × Y	12	0.82^{ns}	0.07^{ns}	0.9^{ns}	1.09^{ns}	1.1^{ns}	0.09^{ns}
خطای کرت‌های فرعی E_b	72	0.5	0.09	0.8	1.1	0.87	0.11
ضریب تغییرات CV (%)		3.74	5.12	8.6	6.53	5.88	4.45

ns، ** و * به‌ترتیب عدم معنی‌داری، معنی‌داری در سطح احتمال ۱ و ۵ درصد.

^{z} SOV: source of variation, ^{y}df: degree of freedom, ^{x}CV: coefficient of variation, *, ** significant at P=0.05 and P=0.01 levels of probability respectively, ns: not significant.

جدول ٤- صفات فیزیولوژیکی و فیتوشیمیایی زوفا تحت تأثیر محرک‌های رشد و دور آبیاری چهار روز

Table 4- The physiological and phytochemical properties in *Hyssopus officinalis* L. subsp. *angustifolius* Bieb. plants affected by Elicitors by irrigation interval 4 day

سال Year	تیمارها Treatment*		پرولین Proline (μg.g^{-1} FW)	کلروفیل کل Total chlorophyll (mg.kg^{-1} FW)	کلروفیل b Chlorophyll b (mg.kg^{-1} FW)	کلروفیل a Chlorophyll a (mg.kg^{-1} FW)	فنول کل Total phenol (mg.kg^{-1} FW)	محتوای نسبی آب R.W.C (%)
2022	کنترل Control		22.77 ± 0.6^{de}	13.99 ± 0.8^{cd}	4.01 ± 0.01^{b}	9.99 ± 0.7^{c}	1.14 ± 0.02^{c}	58.99 ± 1.2^{b}
	اسید سالیسیلیک Salicylic acid	1	21.89 ± 0.5^{e}	14.55 ± 0.6^{b}	4.02 ± 0.02^{b}	10.4 ± 0.5^{bc}	1.16 ± 0.03^{c}	59.11 ± 1.1^{b}
		2	19.1 ± 0.9^{f}	14.1 ± 0.8^{cb}	5.01 ± 0.02^{ab}	9.1 ± 0.6^{cd}	1.17 ± 0.01^{c}	59.1 ± 1.3^{b}
	فنیل آلانین Phenylalanine	1	16.58 ± 0.6^{fg}	13.58 ± 0.5^{c}	4.02 ± 0.01^{b}	9.58 ± 0.9^{c}	1.77 ± 0.02^{a}	60.22 ± 1.4^{ab}
		2	17.66 ± 0.5^{f}	13.78 ± 0.7^{c}	5.02 ± 0.01^{ab}	8.78 ± 0.4^{d}	1.21 ± 0.01^{de}	60.32 ± 1.5^{ab}
	کیتوزان Chitosan	1	18.82 ± 0.4^{f}	14.82 ± 0.8^{b}	4.01 ± 0.02^{b}	10.82 ± 0.7^{b}	1.22 ± 0.01^{d}	61.42 ± 1.1^{a}
		2	16.56 ± 0.9^{g}	15.11 ± 0.6^{b}	5.02 ± 0.03^{ab}	10.11 ± 0.8^{bc}	1.21 ± 0.01^{de}	63.5 ± 0.9^{a}
	LSD		0.78	1.00	1.00	0.97	0.99	0.66
2023	کنترل Control		23.21 ± 0.3^{d}	12.87 ± 0.3^{c}	4.12 ± 0.02^{b}	8.75 ± 0.2^{d}	1.16 ± 0.01^{e}	54.02 ± 0.8^{c}
	اسید سالیسیلیک Salicylic acid	1	22.4 ± 0.4^{de}	13.64 ± 0.5^{c}	4.34 ± 0.01^{b}	9.31 ± 0.1^{cd}	1.17 ± 0.02^{e}	59.23 ± 1.3^{b}
		2	20.31 ± 0.5^{e}	14.23 ± 0.6^{bc}	4.42 ± 0.01^{b}	9.81 ± 0.2^{b}	1.18 ± 0.02^{e}	58.31 ± 1.1^{b}
	فنیل آلانین Phenylalanine	1	17.63 ± 0.6^{f}	17.31 ± 0.7^{a}	5.7 ± 0.02^{a}	11.63 ± 0.3^{b}	1.21 ± 0.01^{de}	57.91 ± 1.2^{b}
		2	18.71 ± 0.4^{f}	16.82 ± 0.4^{ab}	4.91 ± 0.01^{ab}	11.91 ± 0.2^{ab}	1.18 ± 0.01^{e}	60.55 ± 1.3^{ab}
	کیتوزان Chitosan	1	17.65 ± 0.3^{f}	16.91 ± 0.3^{a}	5.22 ± 0.01^{a}	11.71 ± 0.4^{b}	1.23 ± 0.02^{d}	61.64 ± 1.4^{a}
		2	15.99 ± 0.4^{g}	14.53 ± 0.5^{b}	4.51 ± 0.02^{b}	10.03 ± 0.3^{c}	1.19 ± 0.02^{e}	62.8 ± 0.9^{a}
	LSD		0.91	1.00	0.95	1.00	0.97	0.74

اسید سالیسیلیک ۱: ۱/۵ میلی مولار، اسید سالیسیلیک ۲: ۳ میلی مولار، فنیل آلانین ۱: ۱ گرم در لیتر، فنیل آلانین ۲: ۲ گرم در لیتر، کیتوزان ۱: ۰/۲۵ گرم در لیتر، کیتوزان ۲: ۰/۵ گرم در لیتر

اعدادی که در هر ستون دارای حروف مشابه هستند، دارای گروه مشابه هستند.

*Salicylic Acid 1: 1.5 mM, Salicylic Acid 2: 3 mM, Phenylalanine 1: 1 g.l^{-1}, Phenylalanine 2: 2 g.l^{-1}, Chitosan 1: 0.25 g.l^{-1}. Chitosan 2: 0.5 g.l^{-1}

Numbers in each column that have same word, have same group.

جدول ۵- صفات فیزیولوژیکی و فیتوشیمیایی زوفا تحت تأثیر محرک‌های رشد و دور آبیاری شش روز

Table 5- The physiological and phytochemical properties in *Hyssopus officinalis* L. subsp. *angustifolius* Bieb. plants affected by Elicitors by irrigation interval 6 day

سال Year	تیمارها Treatment*		پرولین Proline ($\mu g.g^{-1}$ FW)	کلروفیل کل Total chlorophyll ($mg.kg^{-1}$ FW)	کلروفیل b Chlorophyll b ($mg.kg^{-1}$ FW)	کلروفیل a Chlorophyll a ($mg.kg^{-1}$ FW)	فنول کل Total phenol ($mg.kg^{-1}$ FW)	محتوای نسبی آب R.W.C (%)
2022	کنترل (Control)		27.91±1.1^{c}	14.12±0.8^{bc}	2.02±0.03^{d}	12.1±0.5^{ab}	1.15±0.2^{e}	52.9±1.1^{c}
	اسید سالیسیلیک	1	28.65±1.3^{bc}	15.55±0.6^{b}	3.02±0.04^{c}	12.53±0.4^{a}	1.17±0.1^{e}	55.38±1.2^{bc}
	Salicylic acid	2	27.73±0.8^{c}	15.1±0.8^{b}	3.01±0.05^{c}	12.1±0.3^{ab}	1.18±0.1^{e}	56.42±0.9^{b}
	فنیل آلانین	1	28.63±1.1^{c}	14.58±0.5^{b}	3.08±0.02^{c}	11.5±0.5^{b}	1.21±0.2^{de}	57.39±0.8^{b}
	Phenylalanine	2	29.71±0.9^{ab}	15.78±0.7^{b}	3.02±0.03^{c}	12.71±0.4^{a}	1.34±0.1^{d}	58.44±0.7^{b}
	کیتوزان	1	27.07±0.8^{c}	16.82±0.8^{ab}	3.81±0.02^{bc}	13.01±0.6^{a}	1.51±0.2^{c}	59.55±0.8^{b}
	Chitosan	2	28.63±0.7^{cd}	17.12±0.6^{a}	4.01±0.03^{b}	13.12±0.7^{a}	1.26±0.2^{d}	59.64±1.1^{b}
	LSD		0.94	0.95	1.00	0.99	1.00	0.86
2023	(Control) کنترل		28.12±0.8^{bc}	14.25±0.7^{bc}	2.15±0.02^{d}	12.1±0.3^{ab}	1.23±0.01^{de}	52.43±1.2^{c}
	اسید سالیسیلیک	1	28.92±0.9^{bc}	15.14±0.8^{b}	3.15±0.05^{c}	12.01±0.4^{b}	1.29±0.02^{d}	55.62±1.4^{bc}
	Salicylic acid	2	28.82±0.7^{bc}	15.82±0.8^{b}	3.8±0.04^{bc}	12.02±0.3^{b}	1.49±0.03^{c}	56.55±1.3^{b}
	فنیل آلانین	1	29.02±0.8^{ab}	14.93±0.9^{b}	3.9±0.03^{bc}	11.04±0.5^{b}	1.81±0.02^{a}	58.39±1.1^{b}
	Phenylalanine	2	29.17±0.7^{ab}	15.94±0.9^{b}	3.82±0.03^{bc}	12.12±0.4^{ab}	1.72±0.01^{ab}	58.12±1.1^{b}
	کیتوزان	1	28.11±0.9^{c}	16.92±0.8^{a}	3.52±0.02^{c}	13.41±0.6^{a}	1.66±0.02^{b}	54.15±1.2^{c}
	Chitosan	2	28.54±1.1^{c}	16.25±0.7^{ab}	4.15±0.01^{b}	12.11±0.7^{ab}	1.54±0.01^{bc}	57.22±0.9^{b}
	LSD		0.84	0.98	1.00	1.00	0.89	0.95

اسید سالیسیلیک ۱: ۱/۵ میلی مولار، اسید سالیسیلیک ۲: ۳ میلی مولار، فنیل آلانین ۱: ۱ گرم در لیتر، فنیل آلانین ۲: ۲ گرم در لیتر، کیتوزان ۱: ۰/۲۵ گرم در لیتر، کیتوزان ۲: ۰/۵ گرم در لیتر

اعدادی که در هر ستون دارای حروف مشابه هستند، دارای گروه مشابه هستند.

*Salicylic Acid 1: 1.5 mM, Salicylic Acid 2: 3 mM, Phenylalanine 1: 1 $g.l^{-1}$, Phenylalanine 2: 2 $g.l^{-1}$, Chitosan 1: 0.25 $g.l^{-1}$. Chitosan 2: 0.5 $g.l^{-1}$

Numbers in each column that have same word, have same group.

جدول ٦- صفات فیزیولوژیکی و فیتوشیمیایی زوفا تحت تأثیر محرک‌های رشد و دور آبیاری هشت روز

Table 6- The physiological and phytochemical properties in *Hyssopus officinalis* L. subsp. *angustifolius* Bieb. plants affected by Elicitors by irrigation interval 8 day

سال Year	تیمارها Treatment*		پرولین Proline ($\mu g.g^{-1}$ FW)	کلروفیل کل Total chlorophyll ($mg.kg^{-1}$ FW)	کلروفیل b Chlorophyll b ($mg.kg^{-1}$ FW)	کلروفیل a Chlorophyll a ($mg.kg^{-1}$ FW)	فنول کل Total phenol ($mg.kg^{-1}$ FW)	محتوای نسبی آب R.W.C (%)
2022	کنترل (Control)		28.98±0.9^{bc}	11.01±0.5^{d}	2.01±0.2^{d}	9.01±0.3^{d}	1.15±0.02^{e}	50.02±0.9^{c}
	اسید سالیسیلیک	1	31.92±0.8^{ab}	12.62±0.6^{c}	3.11±0.1^{c}	9.51±0.4^{c}	1.28±0.02^{d}	51.52±0.9^{cd}
	Salicylic acid	2	32.77±1.1^{ab}	13.55±0.7^{c}	3.65±0.2^{bc}	9.89±0.3^{c}	1.12±0.01^{e}	52.55±0.8^{c}
	فنیل الانین	1	30.02±0.7^{b}	12.74±0.5^{c}	3.64±0.05^{c}	9.11±0.5^{cd}	1.55±0.03^{bc}	51.41±0.7^{cd}
	Phenylalanine	2	30.69±0.8^{b}	12.63±0.7^{c}	3.13±0.1^{c}	9.53±0.4^{c}	1.58±0.01^{b}	53.62±0.9^{c}
	کیتوزان	1	30.11±0.9^{b}	13.57±0.6^{c}	3.17±0.1^{c}	10.4±0.6^{bc}	1.63±0.01^{b}	52.31±0.8^{c}
	Chitosan	2	31.88±0.8^{ab}	13.44±0.6^{c}	4.14±0.2^{b}	9.31±0.7^{c}	1.59±0.01^{b}	53.44±1.1^{c}
	LSD		0.95	1.00	0.88	0.95	0.96	1.00
2023	کنترل (Control)		29.55±0.9^{b}	11.14±0.3^{d}	2.14±0.01^{d}	9.01±0.2^{cd}	1.17±0.03^{e}	48.91±1.1^{d}
	اسید سالیسیلیک	1	32.62±0.8^{ab}	10.92±0.4^{d}	2.02±0.02^{d}	8.91±0.3^{d}	1.23±0.02^{de}	50.52±0.9^{d}
	Salicylic acid	2	34.1±1.1^{a}	11.55±0.2^{d}	2.56±0.03^{d}	9.01±0.3^{cd}	1.25±0.01^{d}	49.55±0.7^{d}
	فنیل آلانین	1	32.39±0.7^{ab}	11.74±0.6^{d}	2.75±0.02^{cd}	9.02±0.4^{cd}	1.59±0.02^{c}	52.69±0.7^{c}
	Phenylalanine	2	29.58±0.8^{b}	12.22±0.5^{cd}	2.23±0.01^{d}	10.02±0.4^{c}	1.61±0.01^{bc}	49.98±1.1^{d}
	کیتوزان	1	33.25±0.9^{a}	12.57±0.7^{cd}	2.47±0.0^{d}	10.11±0.5^{c}	1.63±0.03^{b}	51.48±0.7^{cd}
	Chitosan	2	31.63±0.8^{ab}	13.14±0.3^{c}	3.01±0.04^{c}	10.14±0.4^{c}	1.55±0.02^{b}	50.37±0.9^{d}
	LSD		1.00	1.00	0.95	1.00	0.95	1.00

اسید سالیسیلیک ۱: ۱/۵ میلی مولار، اسید سالیسیلیک ۲: ۳ میلی مولار، فنیل آلانین ۱: ۱ گرم در لیتر، فنیل آلانین ۲: ۲ گرم در لیتر، کیتوزان ۱: ۰/۲۵ گرم در لیتر، کیتوزان ۲: ۰/۵ گرم در لیتر

اعدادی که در هر ستون دارای حروف مشابه هستند، دارای گروه مشابه هستند.

*Salicylic Acid 1: 1.5 mM, Salicylic Acid 2: 3 mM, Phenylalanine 1: 1 $g.l^{-1}$, Phenylalanine 2: 2 $g.l^{-1}$, Chitosan 1: 0.25 $g.l^{-1}$. Chitosan 2: 0.5 $g.l^{-1}$

Numbers in each column that have same word, have same group.

نتایج برآمده از تجزیه فیتوشیمیایی اسانس، وجود ۱۵ ترکیب در اسانس این گیاه را نشان داد. بیشترین اجزای موجود در اسانس شامل کامفور، بتا- پین، سیس- پینوکامفون، میرتنول، پینوکامفون، سابینن و ۳- کارن بود. در بین اجزای اسانس، ماده مؤثره سیس- پینوکامفون بیشترین میزان را در تمامی گیاهان تحت تیمار در هر دو سال تحقیق، به خود اختصاص داد (جداول ۸-۱۰). مشخص گردید که اثرگذاری تیمارهای آزمایشی بر مواد مؤثره مونوترپن‌های حلقوی و نیز میزان اسانس، معنی‌دار و در گروه‌های مختلفی قرار گرفتند. با اعمال تیمارهای پایه آلی و مقایسه با نمونه شاهد، روند افزایشی در میزان کمّی و کیفی اسانس مشاهده گردید (جداول ۸-۱۰). میزان ترکیبات غالب اسانس از جمله میرتنول و کامفور به‌ویژه در دور آبیاری هشت روز یک بار در سطوح تیماری اسید سالیسیلیک ۳ میلی‌مولار و فنیل آلانین ۲۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر در کمترین مقادیر و در گروه یکسان با شاهد قرار گرفتند. در سال اول تیمار کیتوزان در دور آبیاری شش روز و در سال دوم تمامی غلظت‌های کیتوزان و فنیل آلانین در دور آبیاری چهار روز بیشترین تاثیر را در افزایش درصد اسانس داشتند. تیمارهای کیتوزان (۰/۵ گرم در لیتر) و فنیل آلانین (۱۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر) بیشترین اثر را بر افزایش میزان ماده مؤثره سیس- پینوکامفون و سایر ترکیبات غالب اسانس تمامی گیاهان در هر دو سال، ایجاد نمودند. در بسیاری از مواد مؤثره غالب اسانس، کمترین مقادیر در شاهد به‌وجود آمد. افزایش ناشی از اعمال تیمارهای کیتوزان (۰/۵ گرم در لیتر) و فنیل آلانین (۱۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر) بر مقدار اسانس و ترکیبات غالب اسانس در قیاس با گیاهان شاهد، بیش از ۶۳ درصد افزایش نشان دادند (جداول ۸-۱۰).

جدول ۷- تجزیه واریانس مرکب (میانگین مربعات) اسانس و ترکیبات غالب اسانس گیاهان زوفا

Table 7- Combined ANOVA (mean squares) for the essential oil content and main constituents in *Hyssopus officinalis* L. subsp. *angustifolius* Bieb.

منابع تغییرات S.O.V$_z$	درجه آزادی df $_y$	اسانس Essential oil	سابینن Sabinene	۳-کارن 3-Carene	بتا-پینن Beta-Pinene	سیس-پینوکامفون Cis-pinocamphone	میرتنول Myrtenol	پینوکامفون Pinocamphone	کامفور Camphor
سال Year (Y)	1	22.1**	7.44**	2.93^{ns}	8.95**	0.22^{ns}	15.1**	11.93**	7.93**
تکرار (سال) R (Y)	4	1.8	0.55	0.11	0.12	0.51	0.72	0.24	0.45
آبیاری Irrigation (A)	2	25.2**	5.61**	14.6**	10.9**	14.11**	14.9**	21.1**	17.6**
آبیاری× سال A × Y	2	37.12**	4.33**	5.44**	22.51**	11.12**	19.11**	5.99**	10.04**
خطای کرت‌های اصلی E$_a$	8	2.34	0.21	0.11	0.33	1.01	0.22	0.21	0.24
محرک Elicitor (B)	6	31.8**	4.11**	14.11**	21.1**	14.1**	14.1**	24.11**	24.32**
آبیاری × محرک A × B	12	29.54**	3.32**	10.8**	19.1**	12.4**	22.3**	14.8**	21.8**
محرک × سال B × Y	6	15.44**	2.55**	9.88**	18.8**	9.88**	11.12**	10.14**	11.08**
آبیاری × محرک × سال A × B × Y	12	1.02^{ns}	0.09^{ns}	0.12^{ns}	0.05^{ns}	0.91^{ns}	0.15^{ns}	0.09^{ns}	0.42^{ns}
خطای کرت‌های فرعی E$_b$	72	1.5	0.11	0.43	0.43	0.65	0.24	0.12	0.55
ضریب تغییرات CV (%)		10.12	6.34	8.6	4.22	4.33	6.11	6.6	7.15

ns، ** و * به‌ترتیب عدم معنی‌داری، معنی‌داری در سطح احتمال ۱ و ۵ درصد.

^{z} SOV: source of variation, ^{y}df: degree of freedom, ^{x}CV: coefficient of variation, *, ** significant at P=0.05 and P=0.01 levels of probability respectively, ns: not significant.

جدول ۸- اسانس و ترکیبات عمده اسانس زوفا تحت تأثیر محرک‌های رشد و دور آبیاری چهار روز

Table 8-The essential oil content and main chemical composition (%) in *H.officinalis* L. plants affected by elicitors with irrigation interval 4 day

سال Year	تیمار Treatment*		اسانس Essential oil	سابینن Sabinene	۳- کارن 3-Carene	بتا- پینن Beta-pinene	سیس- پینوکامفون Cis-Pinocamphone	میرتنول Myrtenol	پینوکامفون Pinocamphone	کامفور Camphor
2022	کنترل (Control)		0.69±0.05^{d}	1.69±0.05^{d}	1.2±0.1^{d}	14.1±0.1^{cd}	35. 4±0.5 ^{d}	3.9±0.05^{d}	18.9±0.9^{c}	1.5±0.01^{b}
	اسید سالیسیلیک Salicylic acid	1	0.7±0.02^{d}	1.94±0.1 ^{d}	1.2±0.1^{d}	14.5±0.2 ^{c}	36.4±0.6 ^{d}	4.7±0.01^{b}	20.8±0.8^{b}	1.6±0.02^{b}
		2	0.71±0.01^{d}	1.97±0.2^{c}	1.3±0.1^{cd}	15.3±0.3 ^{c}	37.1±0.8 ^{c}	4.79±0.0^{ab}	19.7±0.7^{bc}	1.71±0.03^{a}
	فنیل آلانین Phenylalanine	1	0.71±0.03^{d}	1.99±0.3 ^{c}	1.5±0.2 ^{c}	16.2±0.2 ^{b}	38.1±0.5 ^{c}	4.85±0.03^{a}	24.97±0.6 ^{a}	1.89±0.01^{a}
		2	0.72±0.03^{cd}	2.03±0.1 ^{c}	1.5±0.1 ^{c}	16.4±0.5 ^{b}	38.7±0.7 ^{c}	4.91±0.05 ^{a}	23.72±0.7^{ab}	1.72±0.02^{a}
	کیتوزان Chitosan	1	0.74±0.04^{d}	2.11±0.1 ^{c}	1.6±0.1 ^{c}	15.1±0.2 ^{c}	39.1±0.8^{bc}	5.01±0.01^{a}	22.4±0.6^{ab}	1.74±0.01^{a}
		2	0.76±0.02^{d}	2.17±0.1 ^{c}	2.1±0.1 ^{b}	15.4±0.3 ^{c}	39.76±0.6^{bc}	5.12±0.02^{a}	23.6±0.6^{a}	1.76±0.02^{a}
	LSD		0.95	1.00	1.00	0.9	1.00	0.95	0.98	1.00
2023	کنترل (Control)		0.71±0.01^{d}	2.69±0.05^{b}	2.06±0.02^{b}	14.22±0.4^{c}	36.4±1.1^{cd}	4.85±0.1^{a}	18.42±0.7^{c}	1.52±0.01^{b}
	اسید سالیسیلیک Salicylic acid	1	0.74±0.01^{c}	3.21±0.1^{a}	2.14±0.11^{b}	14.59±0.5^{c}	38.4±1.4 ^{c}	4.12±0.1^{d}	22.1±0.8^{b}	1.2±0.01 ^{d}
		2	0.72±0.02^{d}	2.97±0.1^{ab}	1.93±0.1^{b}	16.03±0.2^{b}	35.1±1.2 ^{d}	4.44±0.05^{c}	23.14±0.65^{ab}	1.25±0.02^{d}
	فنیل آلانین Phenylalanine	1	0.89±0.03^{a}	3.44±0.1^{a}	2.66±0.1^{a}	16.09±0.3^{b}	41.2±1.2 ^{b}	4.32±0.1^{c}	24.01±0.64^{a}	1.33±0.01 ^{c}
		2	0.85±0.02^{ab}	2.95±0.2^{ab}	2.51±0.1^{a}	16.24±0.5^{b}	39.7±1.4^{bc}	4.55±0.1^{b}	24.31±0.65 ^{a}	1.41±0.03 ^{c}
	کیتوزان Chitosan	1	0.88±0.03^{a}	3.11±0.1 ^{a}	2.55±0.05^{a}	15.56±0.4^{bc}	39.78±1.1^{bc}	4.22±0.1^{c}	22.5±0.6 ^{b}	1.45±0.02 ^{c}
		2	0.91±0.02^{a}	2.85±0.1^{b}	2.11±0.1^{b}	15.49±0.6 ^{c}	42.87±1.5^{ab}	3.99±0.05^{d}	24.1±0.7 ^{a}	1.5±0.01 ^{b}
	LSD		0.88	1.00	0.95	1.00	0.95	1.00	1.00	0.95

اسید سالیسیلیک۱: ۱/۵ میلی مولار، اسید سالیسیلیک ۲: ۳ میلی مولار، فنیل آلانین ۱: ۱ گرم در لیتر، فنیل آلانین ۲: ۲ گرم در لیتر، کیتوزان ۱: ۰/۲۵ گرم در لیتر، کیتوزان ۲: ۰/۵ گرم در لیتر

اعدادی که در هر ستون دارای حروف مشابه هستند، دارای گروه مشابه هستند.

*Salicylic Acid 1: 1.5 mM, Salicylic Acid 2: 3 mM, Phenylalanine 1: 1 $g.l^{-1}$, Phenylalanine 2: 2 $g.l^{-1}$, Chitosan 1: 0.25 $g.l^{-1}$. Chitosan 2: 0.5 $g.l^{-1}$
Numbers in each column that have same word, have same group.

جدول ۹- اسانس و ترکیبات عمده اسانس زوفا تحت تأثیر محرک‌های رشد و دور آبیاری شش روز

Table 9-The essential oil content and main chemical composition (%) in *H.officinalis* L. plants affected by elicitors with irrigation interval 6 day

سال Year	تیمار Treatment*		اسانس Essential oil	سابینن Sabinene	۳-کارن 3-Carene	بتا-پینن Beta-pinene	سیس‌پینوکامفون Cis-Pinocamphone	میرتنول Myrtenol	پینوکامفون Pinocamphone	کامفور Camphor
2022	کنترل (Control)		0.69±0.01^{d}	2.69±0.01^{b}	1.9±0.02^{b}	15.69±1.1^{b}	35.4±1.1 ^{d}	4.17±0.1^{cd}	15.42±0.7 ^{d}	1.55±0.01^{b}
	اسید سالیسیلیک Salicylic acid	1	0.75±0.02^{c}	3.01±0.02^{a}	2.22±0.02^{ab}	16.86±1.2^{b}	38.53±1.2^{c}	4.23±0.2^{c}	17.1±0.9 ^{c}	1.51±0.02^{b}
		2	0.71±0.03^{d}	2.55±0.01^{b}	1.98±0.03^{b}	16.01±0.9^{b}	36.1±1.1^{cd}	4.13±0.05^{d}	15.14±0.8 ^{d}	1.21±0.02 ^{d}
	فنیل آلانین Phenylalanine	1	0.84±0.04^{b}	3.12±0.02^{a}	2.51±0.01^{a}	17.98±0.8^{a}	44.63±1.4 ^{a}	4.55±0.1^{b}	20.01±0.7^{b}	1.42±0.02^{c}
		2	0.79±0.01^{b}	2.9±0.01^{b}	2.43±0.02 ^{a}	16.99±1.1^{b}	42.7±1.5^{ab}	3.88±0.05^{d}	23.31±0.85^{ab}	1.49±0.01 ^{bc}
	کیتوزان Chitosan	1	0.85±0.03^{ab}	3.11±0.01^{a}	2.31±0.04 ^{a}	17.56±0.9^{a}	43.92±1.2^{ab}	3.92±0.1^{d}	20.5±0.9 ^{b}	1.45±0.02 ^{c}
		2	0.89±0.04^{a}	2.91±0.02^{b}	2.05±0.02 ^{b}	18.53±0.8a	45.12±1.1^{a}	3.99±0.05^{d}	23.1±1.1^{ab}	1.59±0.02 ^{b}
	LSD		1.00	1.00	1.00	0.95	0.95	0.95	1.00	1.00
2023	کنترل (Control)		0.61±0.01^{e}	2.12±0.01^{c}	1.7±0.02^{bc}	14.77±0.9^{c}	36.4±1.1^{cd}	3.99±0.1^{d}	19.77±1.1^{bc}	1.43±0.01^{c}
	اسید سالیسیلیک Salicylic acid	1	0.72±0.01^{cd}	2.32±0.01^{b}	2.32±0.02^{a}	16.94±0.8^{b}	39.1±0.9 ^{c}	4.01±0.1^{d}	21.1±1.1^{b}	1.29±0.01 ^{c}
		2	0.71±0.02 ^{d}	2.21±0.02^{c}	1.77±0.01^{b}	16.54±1.1^{b}	37.1±1.1^{c}	3.77±0.2^{d}	20.88±0.7^{b}	1.22±0.03 ^{d}
	فنیل آلانین Phenylalanine	1	0.82±0.02^{b}	2.58±0.03^{b}	2.42±0.01^{a}	17.03±0.9^{ab}	42.85±0.8^{ab}	4.2±0.2^{ab}	23.53±0.6 ^{a}	1.55±0.03 ^{b}
		2	0.81±0.01^{b}	2.4±0.01^{bc}	2.43±0.01^{a}	16.55±1.1 ^{b}	42.11±1.2 ^{b}	3.92±0.2^{d}	22.2±0.6^{ab}	1.32±0.01 ^{c}
	کیتوزان Chitosan	1	0.73±0.04^{c}	3.2±0.02 ^{a}	2.12±0.02^{b}	17.11±0.8^{ab}	39.5±1.1^{bc}	4.2±0.1^{ab}	23.5±0.7 ^{a}	1.45±0.04 ^{c}
		2	0.86±0.02^{a}	3.3±0.03 ^{a}	2.09±0.01^{b}	17.93±1.1 ^{a}	42.12±1.3 ^{b}	4.87±0.1^{a}	25.12±0.8^{a}	1.19±0.04 ^{d}
	LSD		0.95	1.00	0.95	1.00	1.00	0.95	0.95	0.87

اسید سالیسیلیک ۱: ۱/۵ میلی مولار، اسید سالیسیلیک ۲: ۳ میلی مولار، فنیل آلانین ۱: ۱ گرم در لیتر، فنیل آلانین ۲: ۲ گرم در لیتر، کیتوزان ۱: ۰/۲۵ گرم در لیتر، کیتوزان ۲: ۰/۵ گرم در لیتر

اعدادی که در هر ستون دارای حروف مشابه هستند، دارای گروه مشابه هستند.

*Salicylic Acid 1: 1.5 mM, Salicylic Acid 2: 3 mM, Phenylalanine 1: 1 $g.l^{-1}$, Phenylalanine 2: 2 $g.l^{-1}$, Chitosan 1: 0.25 $g.l^{-1}$. Chitosan 2: 0.5 $g.l^{-1}$ Numbers in each column that have same word, have same group.

جدول ۱۰- اسانس و ترکیبات عمده اسانس زوفا تحت تأثیر محرک‌های رشد و دور آبیاری هشت روز

Table 10-The essential oil content and main chemical composition (%) in *H.officinalis* L. plants affected by elicitors with irrigation interval 8 day

سال Year	تیمار Treatment*		اسانس Essential oil	سابینن Sabinene	۳-کارن 3-Carene	بتا-پینن Beta-pinene	سیس-پینوکامفون Cis-pinocamphone	میرتنول Myrtenol	پینوکامفون Pinocamphone	کامفور Camphor
2022	کنترل (Control)		0.65±0.02^{de}	1.92±0.02^{cd}	1.12±0.04^{d}	12.59±1.1^{d}	33.89±1.4^{d}	3.77±0.1^{d}	19.1±0.7^{c}	1.12±0.01^{d}
	اسید سالیسیلیک	1	0.69±0.01^{d}	2.02±0.01^{c}	2.21±0.04^{ab}	14.88±0.8^{c}	37.1±1.2^{c}	4.01±0.2^{d}	18.1±0.8^{c}	1.22±0.02^{d}
	Salicylic acid	2	0.72±0.03^{cd}	2.11±0.03^{c}	2.01±0.01^{b}	15.59±1.2^{b}	39.77±0.9^{bc}	3.99±0.2^{d}	13.14±0.9^{e}	1.33±0.03^{c}
	فنیل آلانین	1	0.84±0.02^{b}	2.44±0.04^{bc}	1.51±0.03^{c}	17.11±0.9^{a}	38.88±0.8^{c}	4.55±0.1^{b}	15.53±0.8^{d}	1.41±0.04^{c}
	Phenylalanine	2	0.75±0.03^{c}	2.55±0.01^{b}	1.88±0.01^{b}	17.55±0.8^{a}	40.12±1.1^{b}	4.77±0.2^{b}	20.2±0.7^{b}	1.29±0.01^{cd}
	کیتوزان	1	0.81±0.02^{b}	3.01±0.03^{a}	1.99±0.03^{b}	17.86±0.9^{a}	41.16±1.2^{b}	4.81±0.3^{a}	19.5±0.8^{c}	1.67±0.03^{b}
	Chitosan	2	0.71±0.01^{d}	2.95±0.04^{ab}	2.23±0.01^{b}	17.91±1.2^{a}	42.55±0.9^{b}	4.31±0.2^{c}	18.12±0.6^{c}	1.65±0.03^{b}
	LSD		0.95	0.98	0.95	0.95	0.95	1.00	1.00	1.00
2023	کنترل (Control)		0.65±0.01^{de}	2.21±0.01^{c}	1.71±0.02^{bc}	12.59±1.2^{d}	36.8±1.1^{cd}	4.39±0.02^{c}	14.17±1.1^{d}	1.23±0.01^{d}
	اسید سالیسیلیک	1	0.61±0.01^{e}	2.37±0.01^{c}	1.69±0.04^{bc}	14.45±0.8^{c}	35.1±1.1^{d}	4.11±0.02^{d}	18.96±0.8^{c}	1.17±0.02^{d}
	Salicylic acid	2	0.59±0.02^{e}	2.21±0.02^{c}	1.55±0.02^{c}	12.83±1.4^{d}	34.12±0.9^{d}	3.92±0.03^{d}	17.14±1.2^{c}	1.18±0.01^{d}
	فنیل آلانین	1	0.63±0.02^{e}	2.44±0.04^{b}	1.71±0.03^{bc}	15.01±1.1^{c}	37.71±0.7^{c}	4.43±0.03^{c}	19.53±0.9^{c}	1.32±0.04^{c}
	Phenylalanine	2	0.61±0.01^{e}	2.63±0.03^{b}	1.82±0.02^{b}	14.91±0.8^{c}	38.81±1.1^{c}	4.12±0.04^{d}	21.2±0.7^{b}	1.29±0.02^{cd}
	کیتوزان	1	0.7±0.03^{d}	3.19±0.02^{a}	1.92±0.02^{b}	15.21±1.2^{c}	39.12±0.9^{c}	4.41±0.04^{c}	19.81±1.2^{bc}	1.51±0.01^{b}
	Chitosan	2	0.65±0.02^{de}	2.91±0.03^{b}	2.02±0.01^{b}	15.11±0.9^{c}	38.91±0.7^{c}	4.22±0.03^{d}	21.12±0.9^{b}	1.42±0.02^{c}
	LSD		1.00	0.95	0.95	1.00	0.98	0.95	0.96	0.88

اسید سالیسیلیک ۱: ۱/۵ میلی مولار، اسید سالیسیلیک ۲: ۳ میلی مولار، فنیل آلانین ۱: ۱ گرم در لیتر، فنیل آلانین ۲: ۲ گرم در لیتر، کیتوزان ۱: ۰/۲۵ گرم در لیتر، کیتوزان ۲: ۰/۵ گرم در لیتر اعدادی که در هر ستون دارای حروف مشابه هستند، دارای گروه مشابه هستند.

*Salicylic Acid 1: 1.5 mM, Salicylic Acid 2: 3 mM, Phenylalanine 1: 1 $g.l^{-1}$, Phenylalanine 2: 2 $g.l^{-1}$, Chitosan 1: 0.25 $g.l^{-1}$. Chitosan 2: 0.5 $g.l^{-1}$ Numbers in each column that have same word, have same group.

کاهش سطح برگ در اثر تنش خشکی ملایم، موجب بالا رفتن تراکم غده‌های روغنی در برگ شده و مقدار تجمع اسانس را افزایش می‌دهد (Pradhan *et al.*, 2017). تغییرات بیوسنتز ترکیبات ترپنوئیدی از جمله مونوترپن‌ها و سزکوئی‌ترپن‌ها ممکن است به علت تغییرات بیوانرژیتیک سلول‌های گیاهی در پاسخ به عناصر مغذی باشد و به نظر می‌رسد که یکی از دلایل اختلاف در مقدار و نوع برخی از ترکیبات اسانس گیاه مورد آزمایش، مربوط به اختلاف جایگاه‌های بیوسنتزی ترکیبات از نظر بهره‌گیری از منابع انرژی باشد (Sasani *et al.*, 2021). محرک‌ها برای گیاه، پیام‌های شیمیایی ارسال می‌کنند که سبب پاسخ‌های فیزیولوژیکی و مورفولوژیکی و تجمع فیتوآلکسین می‌شود. طی پاسخ به محرک، سیستم دفاعی گیاه فعال شده و در نتیجه بیان ژن‌های دفاعی، متابولیت‌های ثانویه و محتوای اسانس، افزایش می‌یابند (Ali, 2021; Babaei *et al.*, 2021). ترکیبات اسانس با محلول‌پاشی ترکیبات آلی به‌ویژه اسید سالیسیلیک و فنیل آلانین به دلیل راه‌اندازی چرخه سنتز اسید آمینه و آنزیم‌های پروتئینی در افزایش ترکیبات اسانس مؤثرند. به‌طور کلی، هر افزایشی در کل کربوهیدرات‌های گیاه موجب افزایش سنتز اسانس در بافت مسئول سنتز این ترکیبات می‌شود (Caser *et al.*, 2019; Kulak, 2020). یکی از دلایل بیشتر شدن مقدار اسانس را می‌توان به‌دلیل افزایش فعالیت فتوسنتزی گیاه و تأثیر افزایش جذب عناصر غذایی در ساختمان و کارکرد کلروپلاست دانست که این افزایش ممکن است به تولید بیشتر غده‌های ترشح‌کننده اسانس در برگ منجر می‌شود. از آنجایی که غده-های ترشح‌کننده اسانس گیاهان نعناعیان در برگ‌ها قرار دارند، هر عاملی که سبب افزایش سطح و وزن برگ‌ها شود، مقدار اسانس را نیز افزایش خواهد داد. ازاین‌رو، به نظر می‌رسد افزایش تولید کلروفیل، سبب افزایش بافت‌های فتوسنتزی، افزایش رشد برگ‌ها و در نهایت، منجر به افزایش عملکرد اسانس خواهد شد (Ali *et al.*, 2021; Abdul-Hafeez & Ibrahim, 2021). از سوی دیگر، بیوسنتز ترپنوئیدها با اتصال سر به دم ایزوپنتیل دی‌فسفات به ایزومر دی‌متیل آلیل دی‌فسفات ادامه می‌یابد که با این اتصال ژرانیل دی‌فسفات (GPP) حاصل می‌شود. تشکیل مونوترپنه‌های الکلی با مونوترپن گاماترپینن (GT) شروع شده و در ادامه از طریق پی‌سایمن آروماتیک، واکنش‌ها به‌سمت سنتز آن‌ها پیش می‌رود. گاماترپینن که به‌وسیله آنزیم گاماترپینن‌سنتاز (GTS) کاتالیز می‌شود، پیش ماده مونوترپن‌های آروماتیک، در ادامه مسیر بوده و بنابراین، نقش اساسی را در این مسیر ایفا می‌نماید (Thakur & Kumar, 2020; Bohlman & Keeling, 2008). بنابراین، به نظر می‌رسد که تیمارهای به‌کار رفته در این پژوهش، میزان رنگیزه‌های فتوسنتزی و در نتیجه، بازده فتوسنتزی در زوفا را افزایش داده و از این طریق بر ترکیبات تشکیل‌دهنده اسانس نیز تأثیرگذار بوده‌اند. با توجه به اینکه بیوسنتز ترپنوئیدها در تریکوم‌ها، توسط ژن‌ها کنترل می‌شوند اثر اصلی محرک‌ها بر تولید اسانس به تأثیر آن‌ها بر ژن‌ها و آنزیم‌های درگیر در متابولیسم ثانویه گیاه مربوط می‌شود (Pandey *et al.*, 2017).

به‌طور کلی، محرک‌های مختلف از جمله کیتوزان (Alizadeh *et al.*, 2020) و اسید سالیسیلیک (Abdi *et al.*, 2022; Momeni *et al.*, 2020) نقش مهمی در فعال کردن آنزیم‌های مسیر متابولیسم

ثانویه گیاهان می‌کنند. کاربرد کیتوزان احتمالاً به‌دلیل افزایش جذب CO_2، کاهش تعرق، تنظیم ژن و القای آنزیم‌های مرتبط با بیوسنتز ترپنوئیدها، محتوای اسانس را تغییر می‌دهد (Hawrylak-Nowak *et al.*, 2021; Abdul-Hafeez & Ibrahim, 2021). بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه تحت تأثیر رشدونمو گیاه است که به رفتارهای فیزیولوژیکی گیاه به‌ویژه ظرفیت فتوسنتز بستگی دارد. تغییرات مشاهده شده در کیفیت اسانس گیاهان تیمار شده را می‌توان به تفاوت در اثرات هر یک از محرک‌ها بر رشد گیاه، پاسخ گیاه به عوامل زیستی و غیرزیستی که منجر به افزایش مواد مؤثره گیاه می‌شود، نسبت داد (Hawrylak-Nowak *et al.*, 2021).

تحت تنش خشکی مقادیر مواد مؤثره گیاهان دارویی رفتار مختلفی دارند. چنانچه در زمان رسیدگی و بروز تنش خشکی میزان ماده آلفا-پینن در گیاه رزماری (*Rosmarinus officinalis*) کاهش، ولی در اسطوخودوس (*Lavandula angustifolia*) افزایش یافت. ترکیبات مؤثره آلفا-پینن، لیمونن و اوکالیپتول در مریم گلی (*Salvia officinalis*) کاهش یافت درحالی‌که این ترکیبات در ریحان (*Ocimum basilicum*) افزایش یافتند (Kulak, 2020). در گیاهان دارویی قدومه (*Alyssum desertorum*)، آویشن (*Thymus vulgaris*)، همیشه بهار (*Calendula officinalis*)، گاوزبان (*Borago officinalis*) (Yadegari, 2017) و گونه‌های مرزه (*Satureja*) (Yadegari, 2022)، تنش آبی منجر به کاهش درصد اسانس و نیز برخی از مواد مؤثره اسانس می‌گردد. کاهش رنگیزه‌های فتوسنتزی در هنگام کمبود آب همچنین ممکن است به‌دلیل تغییر در مجموعه‌های لیپید- پروتئین رنگیزه‌ها و کاهش سنتز کمپلکس‌های رنگدانه‌ای و یا تخریب کمپلکس‌های پروتئین- رنگدانه به دام اندازنده نور و یا به‌دلیل تخریب اکسیداتیو لیپیدها و پروتئین‌های کلروپلاست باشد (Caser *et al.*, 2019; Esch *et al.*, 2019).

تنش خشکی با تحریک سنتز متابولیت‌های ثانویه از طریق مسیرهای متابولیکی در گیاهان دارویی و معطر که برخی از آن‌ها ناشناخته هستند، سبب تغییرات میزان کمّی و کیفی متابولیت‌های ثانویه می‌شود (Emami Bistgani *et al.*, 2017). بهبود در عملکرد اسانس با استفاده از کیتوزان ممکن است به‌دلیل افزایش در رشد، جذب مواد غذایی و یا تغییر در تعداد غده‌های ترشحی برگ و یا بیوسنتز مونوترپن ها باشد (Ghasemi Pirbalouti *et al.*, 2017; Hawrylak-Nowak *et al.*, 2021). براساس نتایج تجزیه فیتوشیمیایی اسانس، ترکیبات مهم اسانس زوفا در این تحقیق پینوکامفون، سیس-پینوکامفون، میرتنول و بتاپینن بودند. شناسایی ترکیبات شیمیایی اسانس زوفا توسط بسیاری از پژوهشگران مورد بررسی قرار گرفته است. در تحقیقی مشخص شد که مهم‌ترین ترکیبات اسانس زوفا، سیس پینوکامفن و بتا پینن است (Khosh Eqbal *et al.*, 2020). در برخی پژوهش‌ها، ترکیبات متفاوتی به‌عنوان ترکیب غالب گزارش شده است، میرتنیل استات از شمال ایران (Fathiazad *et al.*, 2011)، تیمول و بیزابولول از استان فارس (Saebi *et al.*, 2021) گزارش شده است.

در پژوهشی گزارش گردید که میزان ماده مؤثره سیس پینوکامفن در تنش خشکی شدید نسبت به شاهد به‌طور معنی‌داری کاهش پیدا کرد، ولی بتا پینن در هر دو سطح تنش نسبت به شاهد افزایش قابل توجه داشت و افزایش آن در تنش خشکی ملایم بیشتر بود (Khosh Eqbal *et al.*, 2020). تنش خشکی با اختلال در فتوسنتز و تنفس، درصد و ترکیب شیمیایی اسانس را تحت تأثیر قرار می دهد (Pradhan *et al.*, 2017). در مطالعه‌ای مشابه مشخص شد که تنش خشکی اثر افزایش و معنی‌داری بر روی میزان متیل کاویکول به‌عنوان یکی از ترکیبات مهم اسانس در ریحان بنفش (*Ocimum basilicum*) داشته است (Malekpoor *et al.*, 2017). تنش خشکی در حد ملایم و متوسط توانسته است میزان برخی ترکیبات مؤثره و مهم نظیر تیمول یک ترکیب فنلی را در گیاه دارویی آویشن دنایی (*Thymus daenensis* L.) افزایش دهد (Abdi *et al.*, 2022; Askary *et al.*, 2018). گزارش شده است که کاربرد کیتوزان منجر به افزایش پلی فنول در گیاه مرزنگوش (*Origanum vulgare* ssp. *hirtum*) گردید. به نظر می رسد که افزایش در پلی فنول‌ها به علت تحریک آنزیم‌های بیوسنتزی از قبیل فنیل آلانین آمونیالیاز و کالکون سنتتاز پلی فنل باشد (Heng *et al.*, 2012). آزمایش دیگری مشخص کرد که کاربرد کیتوزان منجر به افزایش ترکیبات فلاونوئیدی در گیاه آویشن دنایی گردید (Emami Bistgani *et al.*, 2017).

نتیجه‌گیری

از نتایج به‌دست آمده در پژوهش حاضر می‌توان دریافت که صفات فیزیولوژیکی و فیتوشیمیایی مورد بررسی در این تحقیق تحت محلول‌پاشی تیمارهای کیتوزان و فنیل آلانین در غلظت‌های اندک در دوره‌های آبیاری چهار و شش روز یک بار، افزایش چشم‌گیری نسبت به شاهد نشان دادند. عملکرد اسانس گیاه زوفا با استفاده از محرک کیتوزان تحت شرایط تنش رطوبتی افزایش یافت. بالاترین میزان اسانس در تیمار دوره آبیاری شش روز یک بار و به‌کارگیری ۰/۵ گرم در لیتر کیتوزان مشاهده شد. نه تنها عملکرد اسانس، بلکه درصد ترکیبات شیمیایی اسانس نیز تحت تأثیر محرک قرار گرفت، برخی از ترکیبات افزایش و برخی ترکیبات تحت تأثیر غلظت‌های بالای محرک‌های مورد استفاده در گروه مشابه با شاهد قرار گرفتند. در نهایت، می‌توان نتیجه گرفت که تحت شرایط تنش رطوبتی، محلول‌پاشی کیتوزان و نیز فنیل آلانین (۱۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر) به‌عنوان یک روش

می‌تواند برای کاهش اثرات تنش و به دنبال آن افزایش عملکرد کمّی و کیفی اسانس گیاه زوفا مورد استفاده قرار گیرد.

References

1. Abdi, L., Asghari, H.R., Tolyat Abolhasani, M., Amerian, M.R., & Naghdi badi, H. (2022). Effect of salicylic acid on growth and phytochemical characteristics of *Thymus daenensis* under drought irrigation. *Plant Process and Function*, *11*(48), 195-210. (In Persian)
2. Abdul-Hafeez, E.Y., & Ibrahim, O.H.M. (2021). Effects of chitosan and BABA foliar application on flowering and chemical characteristics of German chamomile 'Bode-gold'. *South African Journal of Botany*, *139*, 241-245. https://doi.org/10.1016/j.sajb.2021.01.037
3. Adams, R.P. (2007). *Identification of essential oil components by gas chromatography/ quadrupole mass spectroscopy*. Allured Publishing Corporation, Carol Stream, IL.
4. Aghaei, K., Ghasemi Pirbalouti, A., Mousavi, A., Naghdi Badi, H., & Mehnatkesh, A. (2019). Effects of foliar spraying of L-phenylalanine and application of bio-fertilizers on growth, yield, and essential oil of hyssop (*Hyssopus officinalis* L. Subsp. *Angustifolius*). *Biocatalyst Agriculture Biotechnology*, *21*, 101318. https://doi.org/10.1016/j.bcab.2019.101318
5. Ahmad, B., Khan, M.M.A., Jaleel, H., Sadiq, Y., Shabbir, A., & Uddin, M. (2017). Exogenously sourced γ-irradiated chitosan-mediated regulation of growth, physiology, quality attributes, and yield in *Mentha piperita* L. *Turkish Journal of Biology*, *41*, 388-401. https://doi.org/10.3906/biy-1608-64
6. Alavi Samany, S.M., Ghasemi Pirbalouti, A., & Malekpoor, F. (2022). Phytochemical and morpho-physiological changes of hyssop in response to chitosan-spraying under different levels of irrigation. *Industrial Crops and Products*, *176*, 114330. https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2021.114330
7. Albergaria, E.T., Oliveira, A.F., & Albuquerque, U.P. (2020). The effect of water deficit stress on the composition of phenolic compounds in medicinal plants. *South African Journal of Botany*, *131*, 12-17. https://doi.org/10.1016/j.sajb.2020.02.002
8. Ali, B. (2021). Salicylic acid: an efficient elicitor of secondary metabolite production in plants. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, *31*, 101884. https://doi.org/10.1016/j.bcab.2020.101884
9. Alizadeh, Z., & Fattahi, M. (2021). Essential oil, total phenolic, flavonoids, anthocyanins, carotenoids and antioxidant activity of cultivated damask rose (*Rosa damascena*) from Iran: With chemotyping approach concerning morphology and composition. *Scientia Horticulturae*, *288*, 110341. https://doi.org/10.1016/j.scienta.2021.110341
10. Alizadeh, A., Moghaddam, M., Asgharzade, A., & Mahmoodi Sourestani, M. (2020). Phytochemical and physiological response of *Satureja hortensis* L. to different irrigation regimes and chitosan application. *Industrial Crops and Products*, *158*, 112990. https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2020.112990
11. Arnon, D.I. (1975). *Physiological principles of dry land crop production*. In: U.S. Gupta (Ed.) Physiological Aspects of Dry Land Farming. pp. 3-14. Oxford Press.
12. Askary, M., Behdani, M.A., Parsa, S., Mahmoodi, S., & Jamialahmadi, M. (2018). Water stress and manure application affect the quantity and quality of essential oil of *Thymus daenensis* and *Thymus vulgaris*. *Industrial Crops and Products*, *111*, 336-344. https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.09.056
13. Babaei, K., Moghaddam, M., & Farhadi, N. (2021). Morphological, physiological and phytochemical responses of Mexican marigold (*Tagetes minuta* L.) to drought stress. *Scientia Horticulturae*, *284*, 110-116. https://doi.org/10.1016/j.scienta.2021.110116
14. Bates, L.S., Waldren, R.P., & Teare, I.D. (1973). Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant and Soil*, *39*(1), 205-207. https://doi.org/10.1007/BF00018060
15. Bohlman, J., & Keeling, C.I. (2008). Terpenoid biomaterials. *Plant Journal*, *54*, 656-669. https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2008.03449.x
16. Caser, M., Chitarra, W., Angiolillod, F., & Perrone, I. (2019). Drought stress adaptation modulates plant secondary metabolite production in *Salvia dolomitica* Codd. *Industrial Crops and Products*, *129*, 85-96. https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.11.068
17. Dere, S., Güneş, T., & Sivaci, R. (1998). Spectrophotometric determination of chlorophyll-A, B and total carotenoid contents of some algae species using different solvents. *Turkish Journal of Botany*, *22*(1), 13-17.
18. Dzung, N.A. (2011). *Enhancing crop production with chitosan and its derivatives*. In: Chitin, Chitosan, Oligosaccharides and Their Derivatives, Kim, Se -kwon. Taylor and Francis. Boca Raton London New York.
19. Emami-Bistgani, Z., Siadat, SA., Bakhshandeh, A., & Ghasemi-Pirbalouti, A. (2017). Interactive effects of drought stress and chitosan application on physiological characteristics and essential oil yield of *Thymus daenensis* Celak. *The Crop Journal*, *5*(5), CJ-00231. https://doi.org/10.1016/j.cj.2017.04.003

20. Esch, E.H., Lipson, D.A., & Cleland, E.E. (2019). Invasion and drought alter phenological sensitivity and synergistically lower ecosystem production. *Ecology*, *100*(10), 34-45. https://doi.org/10.1002/ecy.2802
21. Fariaszewska, A., Aper, J., Van Huylenbroeck, J., & De Swaef, T. (2020). Physiological and biochemical responses of forage grass varieties to mild drought stress under field conditions. *International Journal of Plant Production, 14,* 335–353. https://doi.org/10.1007/s42106-020-00088-3
22. Fathiazad, F., Mazandarani, M., & Hamedeyazdan, S. (2011). Phytochemical analysis and antioxidant activity of *Hyssopus officinalis L.* from Iran. *Advanced Pharmaceutical Bulletin, 1*(2), 63-67. https://doi.org/10.5681/apb.2011.009
23. Ghanbarzadeh, Z., Mohsenzadeh, S., Rowshan, V., & Moradshahi, A. (2019). Evaluation of the growth, essential oil composition and antioxidant activity of *Dracocephalum moldavica* under water deficit stress and symbiosis with *Claroideoglomus etunicatum* and *Micrococcus yunnanensis*. *Scientia Horticulturae, 256,* 108652. https://doi.org/10.1016/j.scienta.2019.108652
24. Ghasemi Pirbalouti, A., Malekpoor, F., Salimi, A., & Golparvar, A. (2017). Exogenous application of chitosan on biochemical and physiological characteristics, phenolic content and antioxidant activity of two species of basil (*Ocimum ciliatum* and *Ocimum basilicum*) under reduced irrigation. *Scientia Horticulturae, 217,* 114–22. https://doi.org/10.1016/j.scienta.2017.01.031
25. Gorni, P.H., Pacheco, A.C., Moro, A.L., Albuquerque Silva, J.F., Moreli, R.R., & Rodrigues de Miranda, G. (2020). Salicylic acid foliar application increases biomass, nutrient assimilation, primary metabolites and essential oil content in *Achillea millefolium* L. *Scientia Horticulturae, 270,* 109436. https://doi.10.1016/j.scienta.2020.109436
26. Govindaraju, S., & Indra Arulselvi, P. (2018). Effect of cytokinin combined elicitors (L-phenylalanine, salicylic acid and chitosan) on *in vitro* propagation, secondary metabolites and molecular characterization of medicinal herb-*Coleus aromaticus* Benth (L). *Journal of Saudi Society Agriculture Science, 17*(4), 435-44. https://doi.org/10.1016/j.jssas.2016.11.001
27. Hayati, A., Rahimi, M.M., Kelidari, A., & Hosseini, S.M. (2021). Effects of humic acid and iron nanochelate on osmolytes content of black cumin (*Nigella sativa* L.) under drought stress conditions. *Journal of Medicinal and Aromatic Plants Research, 37*(5), 809-821. (In Persian). https://doi.org/10.22092/ijmapr.2021.354715.2995
28. Hawrylak-Nowak, B., Dresler, S., Rubinowska, K., & Matraszek-Gawron, R. (2021). Eliciting effect of foliar application of chitosan lactate on the phytochemical properties of *Ocimum basilicum* L. and *Melissa officinalis* L. *Food Chemistry, 342,* 128358. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.128358
29. Heng, Y., Xavier, C., Frette, S., Lars, P., Christensen, S., & Kai, G. (2012). Chitosan oligosaccharides promote the content of polyphenols in Greek oregano (*Origanum vulgare* ssp. *hirtum*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 60,* 136−143. https://doi.org/10.1021/jf204376j
30. Kheiri, A., Mohajjel Shoja, H., & Sarajoughi, M. (2020). Study on the effect of drought stress and methanol spraying on dehydrine1 gene expression in *Carthamus tinctorius*. *Genetic Engineering and Biosafety Journal, 9,* 67-75.
31. Khosh Eqbal, F., Ghasemi Pirbalouti, A., Enteshari, S., & Davarpanah, S.J. (2020). Qualitative and quantitative effects of drought stress on essential oil compositions of hyssop (*Hyssopus officinalis* L.). *Journal of Plant Research, 33*(2), 292-303. (In Persian)
32. Kulak, M. (2020). Recurrent drought stress effects on essential oil profile of Lamiaceae plants: An approach regarding stress memory. *Industrial Crops and Products, 154,* 1-17. https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2020.112695
33. Malekpoor, F., Ghasemi Pirbalouti, A., Salimi, A., & Momtaz, H. (2017). Effects of chitosan on gene expression of chavicol-O-methyl transferase and phenylpropanoid components of *Ocimum basilicum* (purple cultivar) under water deficit. *Journal of Biology Society, 30,* 391-401.
34. Marinova, D., Ribarova, F., & Atanassaova, M. (2005). Total phenolics and total flavonoids in Bulgarian fruits and vegetables. *Journal University of Chemistry Technology Metallurgy, 40*(3), 255-260.
35. Mohammadi, H., Amirikia, F., Ghorbanpour, M., Fatehi, F., & Hashempour, H. (2019). Salicylic acid induced changes in physiological traits and essential oil constituents in different ecotypes of *Thymus kotschyanus* and *Thymus vulgaris* under well watered and water stress conditions. *Industrial Crops and Products, 129,* 561–574. https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.12.046
36. Momeni, M., Ghasemi Pirbalouti, A., Mousavi, A., & Badi, H.N. (2020). Effect of foliar applications of salicylic acid and chitosan on the essential oil of *Thymbra spicata* L. under different soil moisture conditions. *Journal of Essential Oil Bearing Plants, 23*(5), 1142-1153. https://doi.org/10.1080/0972060X.2020.1801519
37. Mozaffarian, V. (2008). *A pictorial dictionary of botanical taxonomy*. Latin-English-French-Germany-Persian. Germany: Koeltz Scientific Books.
38. Mumivand, H., Ebrahimi, A., Morshedloo, M.R., & Shayganfar, A. (2021). Water deficit stress changes in drug yield, antioxidant enzymes activity and essential oil quality and quantity of tarragon (*Artemisia dracunculus* L.). *Industrial Crops and Products, 164,* 113381. https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2021.113381

39. Naderi, S., Fakheri, B.A., & Seraji, M. (2014). The effect of chitosan on some physiological and biochemical characteristics of ajowan (*Carum copticum* L.). *Crop science Research in the Dry Areas 1*(1),101-117. https://doi.org/10.22034/csrar.01.01.05. (In Persian)
40. Pandey, P., Irulappan, V., Bagavathiannan, M.V., & Senthil-Kumar, M. (2017). Impact of combined abiotic and biotic stresses on plant growth and avenues for crop improvement by exploiting physio-morphological traits. *Front Plant Science, 8*, 1–15. https://doi.10.3389/fpls.2017.00537
41. Poorghadir, M., Mohammadi Torkashvand, A., Mirjalili, S.A., & Moradi, P. (2020). Interactions of amino acids (proline and phenylalanine) and biostimulants (salicylic acid and chitosan) on the growth and essential oil components of Savory (*Satureja hortensis* L.). *Biocatalyst Agriculture Biotechnology, 30,* 101815. https://doi.org/10.1016/j.bcab.2020.101815
42. Pradhan, J., Sahoo, S.K., Lalotra, S., & Sarma, R.S. (2017). Positive impact of abiotic stress on medicinal and aromatic plants. *International Journal of Plant Sciences, 12*(2), 309-313. https://doi.10.15740/HAS/IJPS/12.2/309-313
43. Rahmani Samani, M., Ghasemi Pirbalouti, A., Moattar, F., & Golparvar, A.R. (2019). L-phenylalanine and bio-fertilizers interaction effects on growth, yield and chemical compositions and content of essential oil from the Sage (*Salvia officinalis* L.) leaves. *Industrial Crops and Products, 137,* 1-8. https://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2019.05.019
44. Rajabzadeh, Sh., Ghasemi Pirbalouti, A., Yadegari, M., & Rahimi, T. (2024). Physiological and phytochemical responces of *Rosa damascena* Mill. To the foliar application of different elicitors. *Journal of Essential Oil Bearing Plants, 27*. https://doi.org/10.1080/0972060X.2023.2255613
45. Rajabzadeh, S., Ghasemi Pirbalouti, A., Yadegari, M., & Rahimi, T. (2023). Evaluation of the foliar application effect on the chemical compositions of *Rosa damascena* Mill. essential oil of Chaharmahal va Bakhtiari province. *Eco-phytochemical Journal of Medicinal Plants, 10*(2), 80-95. (In Persian). https://doi.org/10.30495/ejmp.2022.1954175.1682
46. Saebi, A., Minaei, S., Mahdavian, A.R., & Taghi Ebadi, M. (2021). Quantity and quality of hyssop (*Hyssopus officinalis* L.) affected by precision harvesting. *International Journal of Horticultural Science and Technology, 8*(3), 291-304. https://doi.org/10.22059/ijhst.2020.298266.346
47. Sasani, N., Pâques, L.E., Boulanger, G., & Singh, A.P. (2021).Physiological and anatomical responses to drought stress differ between two larch species and their hybrid. *Trees, 35*, 1467-1484. https://doi.org/10.1007/s00468-021-02129-4
48. Shaykh-Samani, A., Ghasemi Pirbalouti, A., Yadegari, M., & Rajabzadeh, F. (2023). Foliar application of salicylic acid improved the yield and quality of the essential oil from *Dracocephalum kotschyi* Boiss. under water deficit Stress. *Journal of Essential Oil Bearing Plants, 26,* 769-779. https://doi.10.30495/iper.2022.1952014.1771
49. Thakur, M., & Kumar, R. (2020). Foliar application of plant growth regulators modulates the productivity and chemical profile of damask rose (*Rosa damascena* Mill.) under mid hill conditions of the western Himalaya. *Industrial Crops and Products, 158,* 113024. https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2020.113024
50. Xiaolu, W., Jie, Y., Aoxue, L., & Yu, C. (2016). Drought stress and re-watering increase secondary metabolites andenzyme activity in *Dendrobium moniliforme*. *Industrial Crops and Products, 94,* 385-393. https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2016.08.041
51. Yadegari, M. (2022). Effects of NPK, botamisol, and humic acid on morphophysiological traits and essential oil of three *Satureja* species under drought stress. *Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants Research, 38*(1), 61-80. (In Persian). https://doi.org/10.22092/ijmapr.2022.356264.3073
52. Yadegari, M. (2018). Foliar application effects of salicylic acid and jasmonic acid on the essential oil composition of *Salvia officinalis*. *Turkish Journal of Biochemistry, 43*(4), 417-424. https://doi.org/10.1515/tjb-2017-0183
53. Yadegari, M. (2017). Irrigation periods and Fe, Zn foliar application on agronomic characters of *Borago officinalis, Calendula officinalis, Thymus vulgaris* and *Alyssum desertorum*. *Communication in Soil Science and Plant Analysis, 48*(3), 307–315. https://doi.org/10.1080/00103624.2016.1269796
54. Zakerian, F., Sefidkon, F., Abbaszadeh, A., & Kalateh, S. (2020). Drought stress and *micorrhiza* fungi effects on physiologic and essential oil characters of *Thymus sahandica* Bornm. *Iranian Journal of Horticultural Science, 51*(1), 189-201. (In Persian). https://doi.org/10.22059/ijhs.2018.267489.1521
55. Zamani, S., Ghasemnejad, A., Alizadeh, M., & Alami, M. (2016). Investigating the effect of salinity and salicylic acid on the activity of phenylalanine ammonialyase enzyme and Phenylpropanoids compounds of *Cynara scolymus* L. in vitro. *Eco-phytochemical Journal of Medicinal Plants, 3*(4), 28-39. (In Persian). https://doi.org/10.30495/ejmp.2016.694504
56. Zandalinas, S.I., Mittler, R., Balfagon, D., Arbona, V., & Gomez-Cadenas, A. (2017). Plant adaptations to the combination of drought and high temperatures. *Physiology of Plant, 162*(1), 2–12. https://doi.org/10.1111/ppl.12540

57. Zawislak, G. (2013). Morphological characters of *Hyssopus officinalis* L. and chemical composition of its essential oil. *Modern Phytomorphology*, *4*, 93–95. https://doi.org/10.5281/zenodo.161195

Journal of Horticultural Science
https://jhs.um.ac.ir

Research Article
Vol. 38, No. 2, Summer 2024, p. 451-463

Application of Gamma Aminobutyric Acid Treatment on Frost Damage and Antioxidant Properties of Cavendish Banana (*Musa acuminata* cv. Cavendish) during Cold Storage

Z. Pakkish[1]*, S. Mohajerpour[2], S. Saadati[3]

1, 2 and 3- Associate Professor, Graduated M.Sc. and Assistant Professor, Department of Horticultural Sciences, Faculty of Agriculture, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran, respectively.
(*- Corresponding Author Email: zahrapakkish@uk.ac.ir)

Received:	30-12-2023	**How to cite this article:**
Revised:	25-02-2024	Pakkish, Z., Mohajerpour, S., & Saadati, S. (2024). Application of gamma aminobutyric acid treatment on frost damage and antioxidant properties of cavendish banana (*Musa acuminata* cv. Cavendish) during cold storage. *Journal of Horticultural Science*, *38*(2), 451-463. (In Persian with English abstract). https://doi.org/10.22067/jhs.2024.86061.1314
Accepted:	02-03-2024	
Available Online:	02-03-2024	

Introduction

Fresh fruits and vegetables are physiologically active and perishable after harvest. Continued metabolic processes such as transpiration or respiration may significantly affect their quality and thus shorten their useful life. Since keeping at low temperatures and without freezing for a long time effectively reduces the physiological activity of the products, it can be used as a strategy to maintain the quality of the products and increase their life after harvesting. Among the most economically important tropical fruits, ripe green bananas are very sensitive to cold and when stored below the threshold temperature, they show all the symptoms of frost damage. While banana cultivars, maturity stage, and ripening all influence cold sensitivity, there's a growing interest in extending the shelf life of produce using natural, plant-friendly compounds. Gamma-aminobutyric acid (GABA), a naturally occurring four-carbon, non-protein amino acid found in plants, animals, and bacteria, is a promising candidate in this area.Abiotic stresses such as cold, heat, drought, ultraviolet rays and low oxygen can cause the accumulation of GABA in plants. Generally, the purpose of this research was to investigate the effect of gamma-aminobutyric acid treatment to improve freezing and antioxidant properties of Cavendish banana at 5 degrees Celsius for 24 days in 90% relative humidity.

Materials and Methods

Cavendish banana fruits (*Musa acuminata* cv. Cavendish) at the time of commercial maturity (ripe green) were obtained from a banana garden in Kerman and immediately transferred to the horticultural science laboratory of Shahid Bahoner University, Kerman. Healthy and uniform fruits were selected in terms of size, shape, color, and degree of ripening, and after washing with water and drying them, frost tolerance, malondialdehyde, and antioxidants were measured for zero day. GABA (Sigma-Aldrich, USA) required after weighing was dissolved in water and prepared in two concentrations of 2.5 and 5 mM. The fruits were divided into three groups of 54 and each repetition included 18 fruits. The first and second groups were immersed in GABA solution of 2.5 mM and 5 mM for 5 minutes, respectively. The third group was immersed in distilled water for 5 minutes and was used as a control (Khaliq *et al.*, 2023). Each treatment was repeated three times. Then, all the fruits were dried in the air for one hour and kept for 24 days at 5 degrees Celsius and relative humidity of 85-90%. Biochemical observations were measured on days 0, 4, 8, 12, 16, 20 and 24 of storage.

©2024The author(s). This is an open access article distributed under Creative Commons Attribution 4.0 International License (CC BY 4.0).
https://doi.org/10.22067/jhs.2024.86061.1314

Results and Discussion

The results of this research showed that frost damage gradually increased during the storage period and the control fruits showed significantly more frost damage symptoms than the fruits treated with GABA. GABA treatments of 2.5 and 5 mM at the end of the storage period reduced the amount of frost damage by 55.64 and 69.95%, respectively, compared to control fruits. As shown in Figure 1b, MDA content as an index of membrane lipid peroxidation in the control and GABA-treated fruit showed an upward trend, which was associated with the destruction of banana fruit membrane under cold stress. Compared to control, banana fruits treated with GABA showed lower MDA accumulation during the entire storage period at 4 degrees Celsius. On the last day of storage, GABA treatment with a concentration of 2.5 mM and 5 mM reduced the amount of MDA in banana fruits by 30.99% and 59.80%, respectively, compared to the control. Post-harvest treatment with GABA reduced frostbite, ion leakage and MDA levels in banana fruits, thereby maintaining fruit quality during low temperature storage. GABA treatment increased the activity of catalase (CAT), ascorbate peroxidase (APX), peroxidase (POD) and superoxide dismutase (SOD) enzymes in banana fruit compared to the control under low temperature storage. The activity of antioxidant enzymes CAT, APX, POD and SOD increased significantly until the 20th day of storage at low temperature, especially in the 5 mM GABA treatment compared to the other two treatments, and then decreased slightly at the end of the storage period. An increase in the concentration of oxygen free radicals, including hydrogen peroxide, leads to an increase in catalase enzyme activity. Catalase enzyme is often present in the peroxisome and causes the decomposition of hydrogen peroxide into water and oxygen. The specific activity of catalase enzyme increased during cold storage, especially in GABA treatments, so it seems that this enzyme is an efficient scavenger for removing hydrogen peroxide and thus causes better protection of cells against peroxidation. In the ascorbate-glutathione cycle, the ascorbate peroxidase enzyme reduces the amount of hydrogen peroxide by using ascorbate as an electron donor. In the present study, the activity of ascorbate peroxidase enzyme in GABA treatment was significantly higher than the control, which indicates the importance of the role of ascorbate peroxidase in plant tissues against oxidative damage. Guaiacol peroxidase enzyme is another antioxidant enzyme that decomposes hydrogen peroxide into water and oxygen. Peroxidase enzyme plays a role in the oxidation of precursors of phenolic compounds, lignin production, and removal of free radicals. The activity of peroxidase enzyme showed a similar trend in all three treatments, although its activity in GABA treatments was more than the control. Therefore, this enzyme effectively eliminated free radicals in banana fruits. In confirmation of these findings, it was reported in research that the activity of peroxidase enzyme increased in fir cuttings during the cold period. In research, post-harvest treatment of GABA with a concentration of 5 mM reduced frostbite and increased the activity of antioxidant enzymes such as CAT, APX, POD and SOD in peach fruits.

Conclusion

The results of this research showed that the applied post-harvest treatments reduced the signs of frostbite and preserved the antioxidant properties of banana fruits. Among the treatments, 5 mM concentration of GABA was the most effective treatment in the storage period. Therefore, GABA treatment can be used as a practical solution to reduce frostbite and preserve the antioxidant properties of Cavendish bananas during long-term storage.

Keywords: Antioxidant enzymes, GABA, Ion leakage, Malondialdehyde

نشریه علوم باغبانی
https://jhs.um.ac.ir

مقاله پژوهشی

جلد ۳۸، شماره ۲، تابستان ۱۴۰۳، ص. ٤٦٣-٤٥١

کاربرد تیمار گاما آمینو بوتیریک اسید بر آسیب سرمازدگی و خواص آنتی‌اکسیدانی موز رقم کاوندیش (*Musa acumin*ata cv. Cavendish) در طی انبارمانی سرد

زهرا پاک کیش[1]*- سمیه مهاجرپور[2]- صفورا سعادتی[3]

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۱۰/۰۹
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۱۲/۱۲

چکیده

در این پژوهش، تأثیر تیمار پس از برداشت گاما آمینو بوتیریک اسید (گابا) با غلظت‌های (صفر، ۲/۵ و ۵ میلی‌مولار) به‌صورت غوطه‌وری به‌مدت پنج دقیقه بر سرمازدگی و خواص آنتی‌اکسیدانی میوه موز در طی نگهداری در دمای پنج درجه سلسیوس مورد ارزیابی قرار گرفت. نمونه‌برداری هر چهار روز یک بار در روزهای صفر، ۴، ۸، ۱۲، ۱۶، ۲۰ و ۲۴ انبارمانی انجام گرفت. آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی در سه تکرار انجام گرفت. صفات مختلفی از قبیل آسیب سرمازدگی، مالون دی آلدهید، آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت شامل کاتالاز، آسکوربات پراکسیداز، پراکسیداز، سوپراکسید دیسموتاز، ظرفیت مهار رادیکال‌های DPPH و میزان تجمع H_2O_2 مورد ارزیابی قرار گرفتند. نتایج این پژوهش نشان داد که میزان سرمازدگی در میوه‌های موز در پاسخ به تیمار ۵ میلی‌مولار گابا کمتر بود که با کاهش نشت یونی و تجمع مالون دی آلدهید همراه بود. میوه‌های شاهد، بیشترین میزان نشت یونی و آسیب سرمازدگی را داشتند. میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و همچنین ظرفیت آنتی‌اکسیدانی در میوه‌های موز در طی دوره انبارمانی سرد تحت تأثیر تیمارهای گابا در مقایسه با شاهد افزایش یافت. میزان تجمع H_2O_2 که از مهم‌ترین شاخص‌های تنش اکسیداتیو در سلول است، تحت انبارمانی در دمای پایین در شاهد بیش از تیمارهای گابا افزایش یافت. در تیمار ۵ میلی‌مولار گابا میزان H_2O_2 در طی دوره انبارمانی تقریباً ثابت ماند. به‌طور کلی، تیمار ۵ میلی‌مولار گابا مؤثرترین تیمار برای کاهش اثرات سرمازدگی و حفظ خواص آنتی‌اکسیدانی میوه‌های موز رقم کاوندیش[4] در دوره انبارمانی طولانی‌مدت بود.

واژه‌های کلیدی: آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان، گابا، مالون دی آلدهید، نشت یونی

مقدمه

موز (*Musa* spp.) گیاهان غول‌پیکر تک‌لپه‌ای چند ساله از خانواده Musaceae و راسته Zingiberales هستند. موز برای امنیت غذایی در بسیاری از کشورهای گرمسیری و نیمه گرمسیری حیاتی است و محبوب‌ترین میوه در کشورهای صنعتی است (D'hont *et al.*, 2012). این میوه به‌دلیل داشتن مقادیر بالایی نشاسته، شکر، ویتامین‌های A وC، پتاسیم، سدیم و منیزیم از ارزش تغذیه‌ای بالایی برخوردار است و منبع مناسبی از انرژی است (Fernandes *et al.*, 2006). در ایران، موز به‌صورت گسترده در استان‌های سیستان و بلوچستان، هرمزگان، کرمان و برخی مناطق دیگر کشت می‌شود. ایران با سطح زیر کشت ۴۱۲۷ هکتار مقام ۶۶ و با میزان تولید ۱۳۲۲۷۷/۹ تن مقام ۵۸ تولید موز جهان را به خود اختصاص داده است (FAOSTAT, 2022). میوه‌ها و سبزیجات تازه، پس از برداشت از نظر فیزیولوژیکی بسیار فعال و فاسدشدنی هستند. ادامه فرآیندهای متابولیکی مانند تعرق یا تنفس ممکن است به‌طور قابل توجهی بر کیفیت آن‌ها تأثیر بگذارد و در نتیجه، عمر مفید آن‌ها را کوتاه کند. ازآنجایی‌که نگهداری در دماهای پایین و بدون انجماد به‌مدت طولانی، به‌طور مؤثری فعالیت فیزیولوژیکی محصولات را کاهش می‌دهد، می‌تواند به‌عنوان یک راهکار به‌منظور حفظ کیفیت محصول و افزایش عمر پس از برداشت آن‌ها مورد استفاده قرار گیرد (Billiard, 1997; Herppich & Zsom, 2021).

۱، ۲ و ۳- به‌ترتیب دانشیار، دانش آموخته کارشناسی ارشد و استادیار بخش علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید باهنر کرمان، کرمان، ایران
(*- نویسندهٔ مسئول: Email: zahrapakkish@uk.ac.ir)

https://doi.org/10.22067/jhs.2024.86061.1314

میوه‌ها و سبزیجات نیمه گرمسیری و یا گرمسیری به دماهای پایین (کمتر از ۱۰ درجه سلسیوس) بسیار حساس هستند و قرارگیری آن‌ها در معرض چنین تنش سرمایی در حین انبارمانی، حمل‌ونقل و یا بازاررسانی، به آن‌ها آسیب‌های جدی وارد می‌کند. گزارش‌ها میزان تلفات محصولات فاسدشدنی، مانند میوه‌ها و سبزیجات، به‌طور میانگین ۶/۴ درصد را در مقایسه با ۳/۸-۲/۷ درصد برای سایر محصولات نشان می‌دهد. هم‌چنین میزان تلفات میوه‌ها و سبزیجات در مناطق با درآمد متوسط پایین، با میانگین ۱۰ تا ۱۵ درصد در مقایسه با چهار تا هفت درصد برای اروپا و آمریکای شمالی، است. اگرچه نقصان آمار و اطلاعات قابل توجهی باقی مانده است و مقایسه نتایج در بین کشورها یا حتی بین بخش‌های درون آن‌ها همچنان چالش‌برانگیز است (Fabi *et al.*, 2021).

در بین مهم‌ترین میوه‌های استوایی از نظر اقتصادی، موز سبز رسیده بسیار حساس به سرماست و هنگامی که زیر دمای آستانه (تقریباً ۱۳ درجه سلسیوس) نگهداری شوند، تمام علائم صدمه سرمازدگی (Chilling injury) را بروز می‌دهند (Zsom *et al.*, 2018). اگرچه حساسیت به سرما در میوه موز به رقم، مرحله بلوغ و وضعیت رسیدگی (به‌عنوان مثال، تیمار شده با اتیلن یا خیر) بستگی دارد (Pongprasert *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2015). شرایط بهینه برای نگهداری و حمل‌ونقل موز سبز رسیده ۱۳ تا ۱۴ درجه سلسیوس و رطوبت نسبی ۹۰ تا ۹۵ درصد و ۱۵ تا ۲۰ درجه سلسیوس برای رسیدن است (Elbagoury *et al.*, 2021; Hardenburg *et al.*, 1986). اگرچه نگهداری در دماهای پایین‌تر از حد آستانه باعث کاهش ازدست‌دهی وزن میوه، تنفس و بیوسنتز اتیلن میوه می‌شود، امّا CI را نیز القا می کند. علائم منحصربه‌فرد قابل مشاهده (تغییر رنگ سطح پوست و تغییر رنگ بافت زیر اپیدرمی) نشان می‌دهد که CI عمدتاً امّا نه منحصراً یک عارضه پوستی است. در موارد شدید، پوست می‌تواند قهوه‌ای تیره یا سیاه شود و در این صورت، گوشت میوه قهوه‌ای و بد طعم می‌شود (Luyckx *et al.*, 2016; Zhu *et al.*, 2018). علائم CI به عوامل مختلفی مانند حساسیت یک گونه یا رقم خاص به دماهای پایین، شدت کاهش دما، مدت قرارگیری در معرض دماهای پایین، وضعیت فیزیولوژیکی و مرحله بلوغ محصول بستگی دارد. بااین‌حال، علائم آسیب سرمازدگی معمولاً در خرده‌فروشی پس از رفع دمای پایین، به‌شدت قابل مشاهده است و بر کیفیت و بازارپسندی محصول تأثیر منفی می‌گذارد (Aghdam & Bodbodak, 2014; Murata, 1969). غشای سلولی اولین جایی است که تحت تأثیر عوامل نامساعد محیطی قرار می‌گیرد. در شرایط تنش سرما فعالیت بخش‌های ساختاری غشا مانند فعالیت آنزیم‌های چسبیده به غشا و آنزیم‌هایی که محل حضورشان در غشا است، دچار اختلال می‌شوند (Wisniewski *et al.*, 2003). یکی از مهم‌ترین آسیب‌ها در مواجهه با سرما، وقوع پراکسیداسیون در چربی‌های غشا است که طی آن رادیکال‌های هیدروکسیل باعث تغییر در سیالیت، انسجام و نفوذپذیری غشا می‌شوند. مالون دی آلدئید یکی از محصولات سمی حاصل از تخریب غشاها است که به‌عنوان یک نشانگر زیستی حاصل از تخریب غشاها به‌طور وسیع برای بررسی مقاومت به سرما استفاده شده است (Saadati *et al.*, 2019).

تحت شرایط تنش سرما، تولید گونه‌های واکنش‌پذیر اکسیژن اجتناب‌ناپذیر است (Suzuki & Mittler, 2006). تجمع گونه‌های فعال اکسیژن (Reactive oxygen species) برای سلول‌ها سمّی و مخرب است، زیرا باعث ایجاد صدمه به غشاهای سلولی، کلروپلاست، پروتئین‌ها و اسیدهای نوکلئیک می‌شود و متابولیسم عادی سلول را مختل می‌کند (Campos *et al.*, 2003). گیاهان در هنگام مواجهه با سرما مجهز به سازوکارهایی برای از بین بردن ROS از قبیل آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان (مانند سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز، پراکسیداز و آسکوربات پراکسیداز)، هستند (Janeczko *et al.*, 2009).

روش‌های مختلف پس از برداشت (تیمارهای شیمیایی، مدیریت زمان- دمای وابسته به محصول، تیمارهای دمایی کوتاه‌مدت مانند قرارگیری در معرض آب گرم، هوای گرم یا بخار گرم) برای کاهش علائم CI پیشنهاد شده است (Khademi *et al.*, 2019; Promyou *et al.*, 2008). امروزه افزایش عمر پس از برداشت محصولات باغی با استفاده از ترکیب‌های طبیعی و سازگار با گیاه، توجه زیادی را به خود معطوف کرده است. گاما آمینو بوتیریک اسید (GABA) یک ترکیب آمینو اسیدی چهار کربنه غیرپروتئینی است که به‌طور طبیعی در گیاهان، جانوران و باکتری‌ها یافت می‌شود (Heli *et al.*, 2022). گابا به‌عنوان یک نوع انتقال‌دهنده عصبی مهم در گیاهان و جانوران، در تنظیم انواع مسیرهای سیگنالینگ عصبی و عملکردهای فیزیولوژیکی شرکت می کند. در فعالیت‌های بیولوژیکی مختلف از جمله کاهش فشار خون، ضد درد، ضد اضطراب، کاهش اوره خون و بهبود فعالیت مغز نقش دارد و مشارکت در تنظیم فعالیت قلبی عروقی تأیید شده است (Ma *et al.*, 2015). تنش‌های غیرزیستی مانند سرما، گرما، خشکی، پرتو فرابنفش و اکسیژن کم، می‌تواند باعث انباشت GABA در گیاهان شود (Deewatthanawong *et al.*, 2010). گاما آمینو بوتیریک اسید در کاهش سرمازدگی پس از برداشت محصولات باغبانی نقش دارد و تیمار برون‌زاد آن موجب افزایش عمر انبارمانی میوه‌ها و سبزی‌ها و گل‌ها شده است. تیمار پس از برداشت GABA باعث کاهش سرمازدگی در میوه‌های هلو (Shang *et al.*, 2011; Yang *et al.*, 2011) و موز (Wang *et al.*, 2014) گردید.

بنابراین، هدف از انجام این پژوهش، بررسی تأثیر تیمار گاما آمینو بوتیریک اسید به‌منظور بهبود سرمازدگی و ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی موز رقم کاواندیش در دمای پنج درجه سلسیوس به‌مدت ۲۴ روز در رطوبت نسبی ۹۰ درصد بوده است.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی

میوه‌های موز رقم' کاوندیش' (*Musa acuminata* cv. Cavendish) در زمان بلوغ تجاری (سبز رسیده) در فصل پاییز از یک باغ موز در کرمان تهیه و بلافاصله به آزمایشگاه علوم باغبانی دانشگاه شهید باهنر کرمان منتقل شد. میوه‌های سالم و یکنواخت از لحاظ اندازه، شکل، رنگ و درجه رسیدگی انتخاب شدند.

پیاده کردن طرح آزمایشی و معرفی تیمارها

گابا (سیگما- آلدریچ، آمریکا) مورد نیاز پس از توزین در آب حل شده و در دو غلظت ۲/۵ و ۵ میلی‌مولار تهیه شد. میوه‌ها به سه گروه ۵۴ تایی تقسیم شدند و هر تکرار شامل ۱۸ میوه بود. گروه اول و دوم به‌ترتیب در محلول گابا ۲/۵ میلی‌مولار و ۵ میلی‌مولار به‌مدت پنج دقیقه غوطه‌ور شدند. گروه سوم به‌مدت پنج دقیقه در آب مقطر غوطه‌ور شد و به‌عنوان شاهد استفاده شد (Khaliq *et al*., 2023). هر تیمار سه بار تکرار شد. سپس، تمام میوه‌ها به‌مدت یک ساعت در هوا خشک شدند و به‌مدت ۲۴ روز در دمای پنج درجه سلسیوس و رطوبت نسبی ۹۰-۸۵ درصد نگهداری شدند. مشاهدات بیوشیمیایی در روزهای صفر، ۴، ۸، ۱۲، ۱۶، ۲۰ و ۲۴ نگهداری اندازه‌گیری شد.

صفات اندازه‌گیری شده

آسیب سرمازدگی

آسیب سرمازدگی میوه‌ها در هر یک از زمان‌های نمونه‌برداری مورد بررسی قرار گرفت. میوه‌های دارای لکه‌های پوستی و اختلال-های ظاهری ناشی از سرمازدگی شمارش شدند. نمره آسیب سرمازدگی به‌صورت صفر (بدون صدمه)، ۱ (ملایم با تعداد لکه‌های پوستی کم)، ۲ (متوسط) و ۳ (شدید) گروه‌بندی شد. اندازه‌گیری آسیب سرمازدگی از تقسیم مجموع کل میوه‌هایی که آسیب سرمازدگی ظاهری نشان داده‌اند (لکه پوستی) بر کل میوه در هر تیمار به‌دست آمد و میزان آسیب سرمازدگی با استفاده از معادله زیر محاسبه شد.

$$\text{آسیب سرمازدگی} = \frac{\sum \text{(تعداد میوه‌ها در هر گروه × نمره سرمازدگی گروه)}}{\text{کل میوه‌های بررسی شده}}$$

مالون دی آلدهید

ابتدا ۱۰۰ میلی‌گرم نمونه با دو میلی‌لیتر بافر استخراج تری کلرو استیک اسید (TCA) یک درصد هموژنه شده و به‌مدت ۱۵ دقیقه در سانتریفیوژ با سرعت ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه قرار داده شد. یک میلی‌لیتر از محلول رویی به‌دست آمده با چهار میلی‌لیتر محلول تیوباربیتوریک اسید (TBA) ۰/۵ درصد حاوی TCA ۲۰ درصد مخلوط و در حمام آب جوش (۹پنج درجه سلسیوس) به‌مدت ۳۰ دقیقه قرار داده شد. سپس، نمونه‌ها سریعاً سرد و مجدداً به‌مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شد. برای حذف اثر ترکیبات مزاحم، جذب نمونه‌ها در طول موج ۶۰۰ نانومتر ($A_{۶..}$) قرائت شده و از مقدار جذب آن‌ها در طول موج ۵۳۲ نانومتر ($A_{۵۳۲}$) کم شد (Buege, 1978).

استخراج عصاره‌های آنزیمی

برای اندازه‌گیری فعالیت ویژه آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان، ابتدا ۰/۵ گرم بافت میوه توزین و سپس با یک میلی‌لیتر بافر استخراج به‌طور کامل همگن شد. بافر استخراج شامل یک میلی‌لیتر بافر فسفات سدیم ۵۰ میلی‌مولار با pH ۷/۸ حاوی دو میلی‌مولار اتیل دی آمین تترا استیک اسید، چهار درصد تریتون، ۵۰ میلی‌مولار تریس و دو میلی‌مولار دی تیوتریتول (در آب دیونیزه استریل) بود. عصاره حاصل در ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه در چهار درجه سلسیوس به‌مدت ۳۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. بخش شفاف واقع در بالای عصاره برای سنجش آنزیم‌های آنتی-اکسیدان و پروتئین‌های محلول به‌کار گرفته شد.

فعالیت ویژه آنزیم کاتالاز

برای این منظور، سه میلی‌لیتر بافر واکنش شامل بافر فسفات سدیم ۵۰ میلی‌مولار (pH ۷) و پراکسید هیدروژن ۱۵ میلی‌مولار، با ۰/۰۵ میلی‌لیتر عصاره آنزیم مخلوط شد. با ردیابی اسپکتروفتومتری تجزیه H_2O_2 در طول موج ۲۴۰ نانومتر، فعالیت آنزیم کاتالاز اندازه‌گیری شد (Aebi, 1983).

فعالیت ویژه آنزیم آسکوربات پراکسیداز

برای شروع واکنش، سه میلی‌لیتر بافر واکنش شامل بافر فسفات سدیم ۵۰ میلی‌مولار (pH ۷)، پراکسید هیدروژن ۰/۵ میلی‌مولار، آسکوربات پنج میلی‌مولار با ۰/۰۵ میلی‌لیتر عصاره آنزیم مخلوط شد. فعالیت آسکوربات پراکسیداز با استفاده از اسپکتروفتومتر و با اندازه‌گیری کاهش جذب در طول موج ۲۹۰ نانومتر محاسبه شد (Nakano & Asada, 1980).

فعالیت ویژه آنزیم پرکسیداز

به این منظور، به سه میلی‌لیتر بافر فسفات سدیم حاوی ۴/۵ میکرولیتر هیدروژن پراکسید، ۳/۳۵ میکرولیتر گایاکول و ۵۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی اضافه و در طول موج ۴۷۰ نانومتر در مدت دو دقیقه قرائت شد (Maehly & Chance, 1954).

فعالیت ویژه آنزیم سوپراکسید دیسموتاز

برای تهیه ترکیب واکنش، سه میلی‌لیتر بافر فسفات عمومی، ۳۳ میکرولیتر نیتروبلوتترازولیوم، ۳۳ میکرولیتر ریبوفلاوین و ۵۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی داخل لوله آزمایش استریل ریخته و بلافاصله به‌مدت ۱۵ دقیقه زیر نور لامپ فلورسانس ۱۵ وات قرار داده شد. جهت تعیین میزان فعالیت آنزیم، مخلوط حاصل با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۶۰ نانومتر طیف‌سنجی شد (Sairam & Saxena, 2000).

پروتئین‌های محلول

بدین منظور، غلظت‌های صفر، ۱۰، ۲۰، ۳۰، ۴۰ و ۵۰ گرم در لیتر سرم آلبومین گاوی (BSA) در آب مقطر تهیه شد و منحنی استاندارد آن در طول موج ۵۹۵ نانومتر رسم شد. میزان پروتئین‌های محلول پس از قرائت میزان جذب در طول موج ۵۹۵ نانومتر و مقایسه با منحنی استاندارد برحسب میلی‌گرم بر گرم وزن تر تعیین شد (Bradford, 1976).

ظرفیت آنتی‌اکسیدانی

به‌منظور اندازه‌گیری فعالیت آنتی‌اکسیدانی از روش درصد مهار رادیکال‌های DPPH (۲، ۲- دی فنیل-۱- پیکریل هیدرازید) استفاده شد (Sanna *et al.*, 2012). ابتدا به‌منظور تهیه عصاره گیاهی ۰/۵ گرم از بافت میوه با پنج میلی‌لیتر متانول ۸۰ درصد ترکیب و روی شیکر با سرعت ۱۵۰ دور بر دقیقه برای مدت ۲۴ ساعت در دمای محیط قرار داده شد. سپس ۰/۱ میلی‌لیتر از عصاره رویی با پنج میلی‌لیتر از محلول DPPH ۰/۱ میلی‌مولار (چهار میلی‌گرم پودر DPPH در ۱۰۰ میلی‌لیتر متانول ۸۰ درصد) مخلوط شد. بعد از گذشت ۳۰ دقیقه جذب نمونه گیاهی و شاهد (پنج میلی‌لیتر DPPH + ۰/۱ میلی‌لیتر متانول ۸۰ درصد) در طول موج ۵۱۷ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر قرائت شد.

پراکسید هیدروژن

میزان پراکسید هیدروژن بر اساس واکنش H_2O_2 با پتاسیم یدید (KI) تعیین گردید. در این روش، ۵۰۰ میلی‌گرم از نمونه در پنج میلی لیتر تری کلرو استیک اسید ۰/۱ درصد در حمام آب یخ ساییده شد. عصاره حاصل به‌مدت ۱۵ دقیقه در ۱۲۰۰۰ دور سانتریفیوژ گردید. سپس، به ۰/۵ میلی‌لیتر از محلول رویی، ۰/۵ میلی‌لیتر بافر فسفات پتاسیم ۱۰ میلی‌مولار و اسیدیته ۷/۵ و یک میلی‌لیتر پتاسیم یدید یک مولار اضافه گردید. مخلوط واکنش به‌مدت یک ساعت در تاریکی در دمای اتاق قرار گرفت. جذب نمونه‌ها نیز در طول موج ۳۹۰ نانومتر اندازه‌گیری شد (Alexieva *et al.*, 2001).

تجزیه و تحلیل داده‌ها

آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی در سه تکرار انجام گرفت. آنالیز آماری با نرم‌افزار SAS و مقایسه میانگین‌ها بر اساس آزمون LSD در سطح احتمال پنج درصد انجام شد.

نتایج و بحث

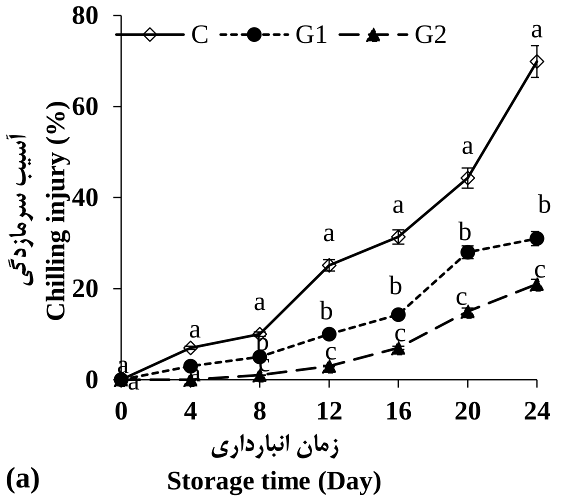
آسیب سرمازدگی

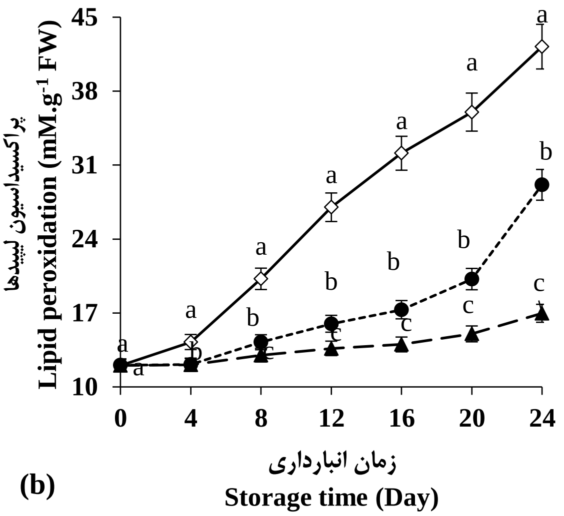
نتایج این پژوهش نشان داد که آسیب سرمازدگی در طی دوره انبارمانی به‌تدریج افزایش یافت و میوه‌های شاهد به‌طور معنی‌داری ($P<0.05$) نشانه‌های سرمازدگی بیشتری نسبت به میوه‌های تیمار شده با گابا نشان دادند (شکل ۱a). تیمارهای گابا ۲/۵ و ۵ میلی‌مولار در انتهای دوره انبارمانی (روز بیست و چهارم)، به‌ترتیب میزان آسیب سرمازدگی را ۵۵/۶۴ و ۶۹/۹۵ درصد نسبت به میوه‌های شاهد کاهش دادند. بنابراین، علائم آسیب سرما به‌وضوح در میوه‌های موز تیمار شده با گابا مهار شد. پژوهش‌های مشابهی در سایر میوه‌های تیمار شده با گابا مانند هلو (Shang *et al.*, 2011)، موز (Ngaffo Mekontso *et al.*, 2021; Wang *et al.*, 2014; Zhou *et al.*, 2022) و خیار (Malekzadeh *et al.*, 2017) مشاهده شده است. غشای سلولی، اولین خط دفاعی برای محافظت از سلول در هنگام تنش است. رخداد اولیه‌ای که در طی تنش سرمایی رخ می‌دهد، تخریب غشای پلاسمایی است (Mditshwa *et al.*, 2023). هنگامی که گیاهان حساس به سرما تحت تنش دمای پایین قرار می‌گیرند، غشای سلولی از یک ساختار انعطاف‌پذیر به یک ساختار سفت تغییر می‌کند و این می‌تواند باعث ایجاد ترک و نشت آب، یون‌ها و متابولیت‌ها شود (Wolfe, 1978). تحت تنش سرما، تغییرات در ساختار غشای سلولی بر سیالیت و عملکرد غشا تأثیر می‌گذارد (Liang *et al.*, 2020). نشت الکترولیت به‌عنوان پارامتری برای ارزیابی پایداری و نفوذپذیری غشای سلولی استفاده می شود. تخریب ساختار غشای سلولی با تغییر نسبت اسیدهای چرب غیر اشباع/اشباع و افزایش سطح نشت الکترولیت اتفاق می‌افتد (Marangoni et al., 1996). نقش گابا در حفظ یکپارچگی و سیالیت غشای سلولی به‌طور گسترده مورد مطالعه قرار گرفته است. به‌عنوان مثال، تیمارهای گابا با محافظت از ساختار غشای سلولی، تحمل سرما

را در میوه‌های پرتقال خونی بهبود بخشید (Habibi *et al.*, 2019). تیمار گابا ممکن است نشت الکترولیت را مهار کند و متعاقباً یکپارچگی غشای سلولی را در میوه موز تیمار شده حفظ کند.

مالون دی آلدهید

همان‌طور که در شکل 1b نشان داده شده است، محتوای MDA به‌عنوان شاخص پراکسیداسیون لیپیدهای غشا در میوه شاهد و تیمار شده با گابا روند صعودی را نشان دادند که با از بین رفتن غشای میوه موز تحت تنش سرما همراه بود. میوه‌های موز تیمار شده با گابا در مقایسه با شاهد، تجمع MDA کمتری را در کل مدت نگهداری در دمای چهار درجه سلسیوس نشان دادند. در روز آخر انبارمانی (روز بیست و چهارم) تیمار گابا با غلظت ۲/۵ میلی‌مولار و ۵ میلی‌مولار به‌ترتیب ۳۰/۹۹ درصد و ۸۰/ درصد۵۹ مقدار MDA را در میوه‌های موز نسبت به شاهد کاهش داد. مالون دی آلدهید، محصول جانبی پراکسیداسیون لیپیدی و نشانگر آسیب اکسیداتیو سلولی است. پراکسیداسیون لیپیدهای غشای سلولی یکی از علائم اولیه بیوشیمیایی آسیب سرمازدگی است و افزایش تولید MDA نشانه آسیب غشای سلولی است (Ramos-Ruiz *et al.*, 2019). تخریب لیپیدها و پراکسیداسیون اسیدهای چرب غیراشباع از دلایل اصلی تجزیه غشا هستند. پژوهش‌های پیشین نشان داده است که افزایش تجمع MDA و نشت یون همبستگی نزدیکی با تنش سرما در گیاهان دارد (Ding *et al.*, 2007). افزایش نشت یون و MDA در بسیاری از میوه‌ها و سبزیجاتی که از آسیب ناشی از سرما رنج می‌برند، مشاهده شده است (Valenzuela *et al.*, 2017). در این پژوهش نیز تیمار پس از برداشت گابا باعث کاهش سرمازدگی، نشت یونی و میزان مالون دی آلدهید در میوه‌های موز شد و از این طریق، موجب حفظ کیفیت میوه در طی دوره انبارمانی در دمای پایین شد.





شکل ۱- اثر تیمار گابا (G1 =۲/۵ mM و G2 =۵ mM) بر میزان آسیب سرمازدگی (a) و محتوی مالون دی آلدهید (b) میوه‌های موز طی انبارمانی در دمای ۵ °C

Figure 1- The effect of GABA treatment (G1 = 2.5 mM and G2 = 5 mM) on the chilling injury (a) and lipid peroxidation content (b) of banana fruits during storage at 5 °C

میانگین های دارای حداقل یک حرف مشترک در هر زمان نمونه‌گیری در سطح احتمال ۵ درصد با استفاده از آزمون LSD تفاوت معنی‌داری ندارند.

The averages with at least one common letter in each sampling time have no significant difference at the 5% probability level using the LSD test.

ظرفیت آنتی‌اکسیدانی

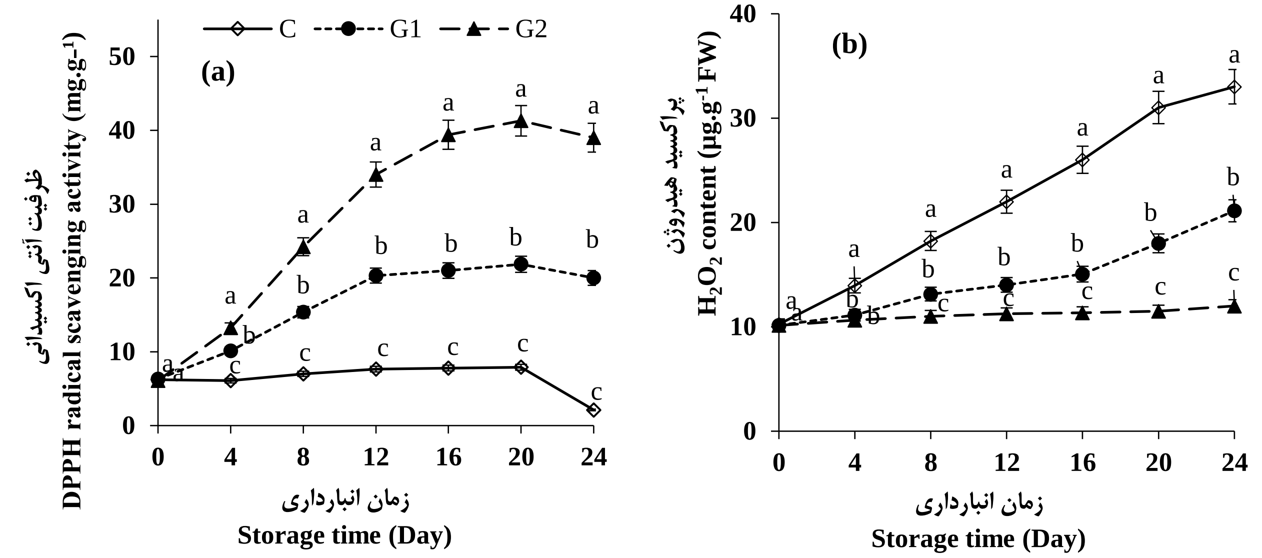
میوه‌های موز تیمار شده با گابا و شاهد با زمان نگهداری افزایش در ظرفیت آنتی‌اکسیدانی نشان دادند. در مقایسه با گروه شاهد، میوه تیمار شده با گابا ظرفیت آنتی‌اکسیدانی بیشتری را در کل انبار حفظ کرد. در روز آخر انبارمانی کاهش در ظرفیت آنتی‌اکسیدانی تمام تیمارها مشاهده شد، اگرچه این کاهش در شاهد شدیدتر بود (شکل 2a). انواع مختلفی از ترکیبات آنتی‌اکسیدانی غیرآنزیمی وجود دارد که می‌توانند به ظرفیت کل آنتی‌اکسیدانی کمک کنند. بااین‌حال، مشخص نیست که کدام ترکیبات عمدتاً مسئول افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدانی هستند. در پژوهشی گزارش داده شد که میوه‌های موز تیمار شده با گابا تجمع ترکیبات فنولی بالاتری را نشان دادند که ناشی از فعالیت آنزیم پلی فنل آمونیالیاز بالاتر است که باعث افزایش ظرفیت DPPH می‌شود که نه تنها برای سلامت مصرف‌کننده مفید است، بلکه برای حفظ یکپارچگی غشاء نیز حیاتی است (Wang *et al.*, 2014). همچنین

در پژوهشی دیگر، افزایش فعالیت آنزیم‌های پلی فنل آمونیالیاز نسبت به پلی فنول اکسیداز در گل‌های آنتوریم در پاسخ به تیمار کاربرد خارجی گابا، مسئول افزایش ترکیبات فنولی شده که در نتیجه باعث افزایش ظرفیت مهار DPPH می‌شود (Aghdam *et al.*, 2015).

میزان تجمع H2O2

میزان تجمع H_2O_2 که از مهم‌ترین شاخص‌های تنش اکسیداتیو در سلول است، تحت انبارمانی در دمای پایین در شاهد بیش از تیمارهای گابا افزایش یافت (شکل ۲b). بنابراین، درجه خسارت ناشی از تجمع گونه‌های اکسیژن فعال و در نتیجه آن درجه تحمل به تنش سرما در تیمارهای گابا با شاهد متفاوت است. در تیمار ۵ میلی‌مولار گابا میزان H_2O_2 در طی دوره انبارمانی تقریباً ثابت ماند، این نتایج بیانگر ارتباط احتمالی تأثیر پاسخ‌های دفاعی در تیمار گاباست.

هم متابولیسم منظم سلولی و هم شرایط تنش زیستی و غیرزیستی متعدد منجر به تولید ROS می‌شود (Hilal *et al.*, 2023). ROS بسته به غلظت آن‌ها در سلول‌های گیاهی، نقش دوگانه مفید و یا مضر دارند. غلظت‌های پایین ROS به‌عنوان یک پیام‌رسان ثانویه در مسیرهای انتقال سیگنال که واسطه پاسخ‌های فیزیولوژیکی متعدد در گیاهان است، عمل می‌کند (Apel & Hirt, 2004). بااین‌حال، تولید بیش از حد ROS در طی تنش می‌تواند هموستاز سلولی را مختل کند و حتی منجر به مرگ سلولی شود (Aghdam *et al.*, 2016). بنابراین، برای اطمینان از متابولیسم سلولی طبیعی، لازم است سطوح متعادل ROS در یک محدوده مشخص حفظ شود. در طی تنش سرما، تولید بیش از حد ROS باعث آسیب اکسیداتیو به کلروپلاست، میتوکندری و آپوپلاست و کاهش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی می‌شود، در نتیجه سیستم غشایی را از بین می‌برد، باعث اختلالات متابولیکی می‌شود و در نهایت، منجر به تجزیه سلول می‌شود (Blokhina *et al.*, 2003).



شکل ۲- اثر تیمار گابا (G_1 =۲/۵ mM و G_2 =۵ mM) بر ظرفیت آنتی‌اکسیدانی (a) و پراکسید هیدروژن (b) میوه‌های موز طی انبارمانی در دمای ۵ °C

Figure 2- The effect of GABA treatment (G1 = 2.5 mM and G2 = 5 mM) on the DPPH radical scavenging activity (a) and hydrogen peroxide (b) of banana fruits during storage at 5 °C

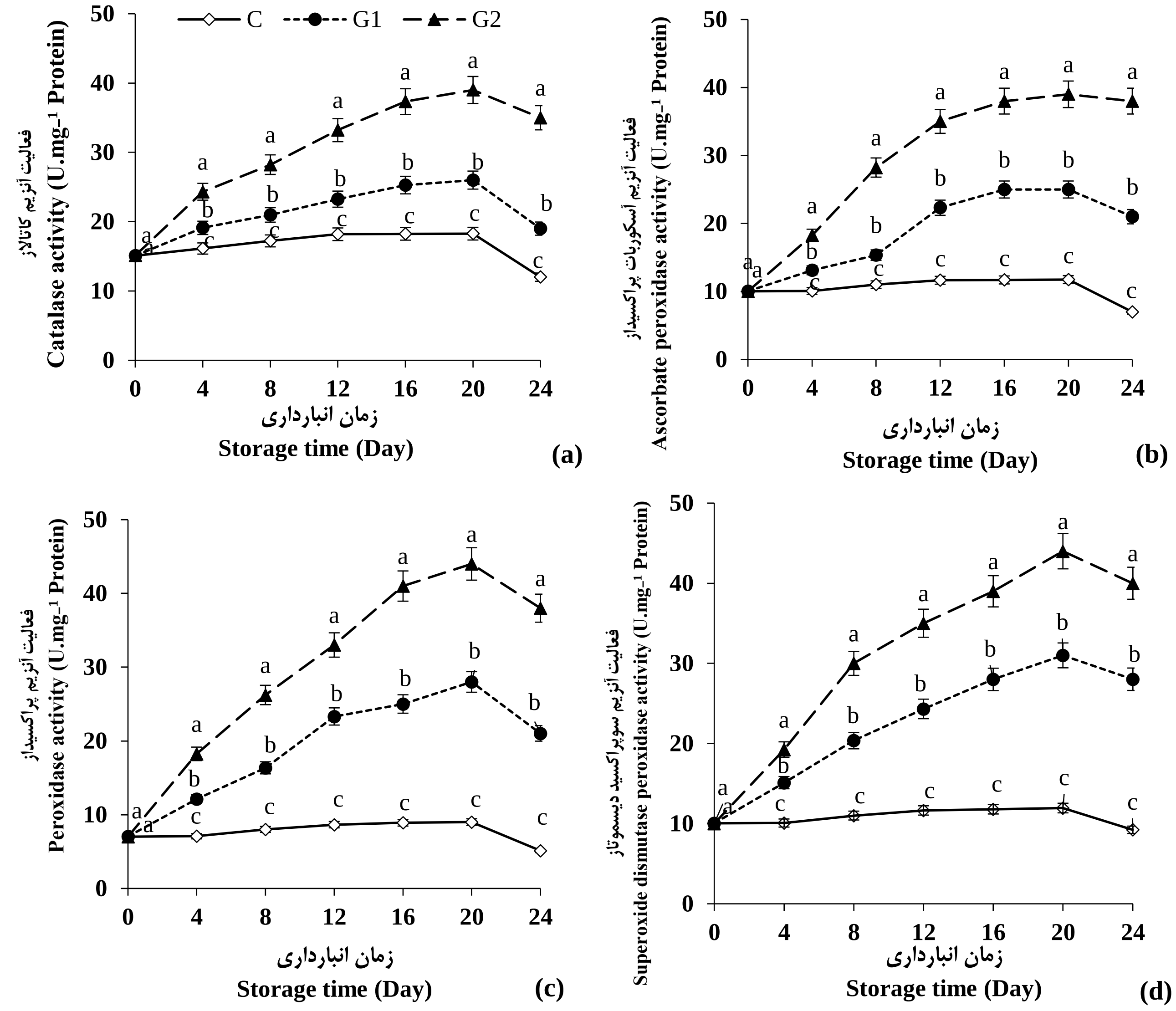
میانگین های دارای حداقل یک حرف مشترک در هر زمان نمونه‌گیری در سطح احتمال ۵ درصد با استفاده از آزمون LSD تفاوت معنی‌داری ندارند.

The averages with at least one common letter in each sampling time have no significant difference at the 5% probability level using the LSD test.

شواهد متعددی نشان داده‌اند که آسیب ناشی از سرما در میوه‌ها می‌تواند تا حدی به عدم تعادل تولید ROS در طی دوره تنش نسبت داده شود. تنش سرمایی سطوح ROS را افزایش می‌دهد که پراکسیداسیون لیپیدی را تحریک می‌کند و در نهایت، منجر به تخریب غشای سلولی می‌شود (Mohammadrezakhani *et al.*, 2019).

ROS با تولید رادیکال‌های هیدروکسیل پراکسیداسیون لیپیدهای غشا و آسیب اکسیداتیو را افزایش می‌دهد (Malekzadeh *et al.*, 2017). تیمار گابا، تجمع H_2O_2 را کاهش داد و مکانیسم سازگاری با سرما را در گل‌های بریده پرتقال خونی افزایش داد (Habibi *et al.*, 2019). روند H_2O_2 در پژوهش حاضر مشابه نتایجی بود که در آن میوه‌های

گیلاس تیمار شده با گابا تولید H_2O_2 را به تاخیر انداختند (Rabiei *et al.*, 2019). ازاین‌رو، نتایج نشان می‌دهد که تیمار گابا ممکن است H_2O_2 و سایر ROS را از بین ببرد و در نتیجه، آسیب اکسیداتیو کمتری در میوه‌های موز تیمار شده ایجاد کند.



شکل ۳- اثر تیمار گابا (G1 =۲/۵ mM و G2 =۵ mM) روی فعالیت آنزیم کاتالاز (a)، فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز (b)، فعالیت آنزیم پراکسیداز (c) و فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز (d) میوه‌های موز طی انبارمانی در دمای ۵ °C

Figure 3- The effect of GABA treatment (G1 = 2.5 mM and G2 = 5 mM) on catalase enzyme activity (a), ascorbate peroxidase enzyme activity (b), peroxidase enzyme activity (c) and superoxide dismutase enzyme activity (d) of fruit Bananas during storage at 5 °C

میانگین های دارای حداقل یک حرف مشترک در هر زمان نمونه‌گیری در سطح احتمال ۵ درصد با استفاده از آزمون LSD تفاوت معنی‌داری ندارند.

The averages with at least one common letter in each sampling time have no significant difference at the 5% probability level using the LSD test.

آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان

تیمار گابا فعالیت آنزیم‌های کاتالاز (CAT)، آسکوربات پراکسیداز (APX)، پراکسیداز (POD) و سوپراکسید دیسموتاز (SOD) را در میوه موز در مقایسه با شاهد تحت انبارمانی در دمای پایین افزایش داد (شکل ۳ a-d). فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان CAT، APX، POD و SOD تا روز بیستم انبارمانی در دمای پایین مخصوصاً در تیمار ۵

میلی‌مولار گابا نسبت به دو تیمار دیگر، به‌طور چشمگیری افزایش یافت و پس از آن در پایان دوره انبار مانی اندکی کاهش پیدا کرد.

افزایش غلظت رادیکال‌های آزاد اکسیژن از جمله پراکسید هیدروژن منجر به افزایش فعالیت آنزیم کاتالاز می‌شود (Renaut et al., 2006). آنزیم کاتالاز غالباً در پروکسی‌زوم وجود دارد و سبب تجزیه پراکسید هیدروژن به آب و اکسیژن می‌شود (Sudhakar et al., 2001). فعالیت ویژه آنزیم کاتالاز در دوره انبارمانی سرد مخصوصاً در تیمارهای گابا افزایش یافت، بنابراین به نظر می‌رسد که این آنزیم، جاروبگر کارآمدی برای حذف پراکسید هیدروژن است و در نتیجه، باعث حفاظت بهتر سلول‌ها در برابر پراکسیداسیون می‌شود. مشابه با نتایج این تحقیق، در پژوهشی گزارش داده شد که تیمار گابا، سرمازدگی پس از برداشت میوه گوجه فرنگی را در طی نگهداری از طریق تحریک فعالیت سیستم آنتی‌اکسیدانی کاهش داد که در حفظ انسجام غشای سلولی مؤثر است (Moradi et al., 2019).

در چرخه آسکوربات- گلوتاتیون، آنزیم آسکوربات پراکسیداز با مصرف آسکوربات به‌عنوان دهنده الکترون، مقدار پراکسید هیدروژن را کاهش می‌دهد (Shi et al., 2007). در پژوهش حاضر، فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز در تیمار گابا به‌طور معنی‌داری بالاتر از شاهد بود که بیانگر اهمیت نقش آسکوربات پراکسیداز در بافت‌های گیاهی در برابر آسیب اکسیداتیو است.

آنزیم گایاکول پراکسیداز یکی دیگر از آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی است که پراکسید هیدروژن را به آب و اکسیژن تجزیه می‌کند. آنزیم پراکسیداز در اکسیداسیون پیش‌ماده‌های ترکیبات فنلی، ساخت لیگنین و حذف رادیکال‌های آزاد نقش دارد (Sudhakar et al., 2001). فعالیت آنزیم پراکسیداز در هر سه تیمار روندی مشابه داشت، اگرچه فعالیت آن در تیمارهای گابا بیش از شاهد بود. بنابراین، این آنزیم به‌طور کارآمدی موجب حذف رادیکال‌های آزاد در میوه‌های موز شد. در تأیید این یافته‌ها، در پژوهشی گزارش شد که فعالیت آنزیم پراکسیداز در قلمه‌های صنوبر در طی دوره سرما افزایش یافت (Luo et al., 2007).

آنزیم سوپراکسید دیسموتاز، اولین خط دفاعی سلول در برابر رادیکال‌های آزاد اکسیژن است. معمولاً رادیکال سوپراکسید اولین رادیکال آزادی است که در طی تنش تولید می‌شود و آنزیم سوپراکسید دیسموتاز سریعاً رادیکال سوپراکسید را به پراکسید هیدروژن و اکسیژن مولکولی تبدیل می‌کند و با حذف سوپراکسید نقش حیاتی‌تری را در سیستم آنتی‌اکسیدانی نسبت به آنزیم‌های کاتالاز و پراکسیداز ایفا می کند، لذا سبب افزایش مقاومت گیاهان به تنش‌های محیطی می‌شود (Gill & Tuteja, 2010; Shi et al., 2007). در پژوهشی تیمار پس از برداشت گابا با غلظت ۵ میلی‌مولار باعث کاهش سرمازدگی و افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان مانند CAT، APX، POD و SOD در میوه‌های هلو شد (Yang et al., 2011). در پژوهشی دیگر روی گیاه فلفل سیاه، تیمار با گابا موجب افزایش مقاومت در برابر تنش اسمزی از طریق افزایش میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی مانند گایاکول پراکسیداز و سوپراکسید دیسموتاز شد (Vijayakumari & Puthur, 2016).

نتیجه‌گیری

نتایج این پژوهش نشان داد که تیمارهای پس از برداشت به‌کار رفته باعث کاهش نشانه‌های سرمازدگی و حفظ خواص آنتی‌اکسیدانی میوه‌های موز شدند. در بین تیمارها، غلظت ۵ میلی‌مولار گابا مؤثرترین تیمار در دوره انبارمانی بود. بنابراین، تیمار گابا می‌تواند به عنوان راهکاری کاربردی برای کاهش سرمازدگی و حفظ خواص آنتی‌اکسیدانی میوه موز رقم کاوندیش در دوره انبارمانی طولانی‌مدت مورد استفاده قرار گیرد.

References

1- Aebi, H.E. (1983). Catalase in methods of enzyme analysis. *Bergmeyer*, *3*, 273–285. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-091302-2.50032-3

2- Aghdam, M.S., & Bodbodak, S. (2014). Postharvest heat treatment for mitigation of chilling injury in fruits and vegetables. *Food and Bioprocess Technology*, *7*, 37–53. https://doi.org/10.1007/s11947-013-1207-4

3- Aghdam, M.S., Naderi, R., Jannatizadeh, A., Sarcheshmeh, M.A.A., & Babalar, M. (2016). Enhancement of postharvest chilling tolerance of anthurium cut flowers by γ-aminobutyric acid (GABA) treatments. *Scientia Horticulturae*, *198*, 52–60. https://doi.org/10.22069/JOPP.2019.14927.2393

4- Aghdam, M.S., Naderi, R., Sarcheshmeh, M.A.A., & Babalar, M. (2015). Amelioration of postharvest chilling injury in anthurium cut flowers by γ-aminobutyric acid (GABA) treatments. *Postharvest Biology and Technology*, *110*, 70–76. https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2015.06.020

5- Alexieva, V., Sergiev, I., Mapelli, S., & Karanov, E. (2001). The effect of drought and ultraviolet radiation on growth and stress markers in pea and wheat. *Plant, Cell and Environment*, *24*(12), 1337–1344. https://doi.org/10.1046/j.1365-3040.2001.00778.x

6- Apel, K., & Hirt, H. (2004). Reactive oxygen species: Metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annual Review of Plant Biology*, *55*, 373–399. https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.55.031903.141701
7- Billiard, F. (1997). Fruit cold storage: Techniques and equipment. *International Symposium Effect of Pre-& Postharvest Factors in Fruit Storage*, *485*, 61–70. https://doi.org/10.17660/ActaHortic.1999.485.7
8- Blokhina, O., Virolainen, E., & Fagerstedt, K.V. (2003). Antioxidants, oxidative damage, and oxygen deprivation stress: A review. *Annals of Botany*, *91*(2), 179–194. https://doi.org/10.1093/aob/mcf118
9- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, *72*(1–2), 248–254. https://doi.org/10.1006/abio.1976.9999
10- Buege, J. A. (1978). Microsomal lipid peroxidation. *Methods in Enzymology*, *52*, 302–310. https://doi.org/10.1016/S0076-6879(78)52032-6
11- Campos, P.S., Nia Quartin, V., Chicho Ramalho, J., & Nunes, M.A. (2003). Electrolyte leakage and lipid degradation account for cold sensitivity in leaves of *Coffea sp.* plants. *Journal of Plant Physiology*, *160*(3), 283–292. https://doi.org/10.1078/0176-1617-00833
12- Deewatthanawong, R., Nock, J.F., & Watkins, C.B. (2010). γ-Aminobutyric acid (GABA) accumulation in four strawberry cultivars in response to elevated CO_2 storage. *Postharvest Biology and Technology*, *57*(2), 92–96. https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2010.03.003
13- D'hont, A., Denoeud, F., Aury, J.M., Baurens, F.C., Carreel, F., Garsmeur, O., Noel, B., Bocs, S., Droc, G., & Rouard, M. (2012). The banana (*Musa acuminata*) genome and the evolution of monocotyledonous plants. *Nature*, *488*, 213–217. https://doi.org/10.1038/nature11241
14- Ding, Z., Tian, S., Zheng, X., Zhou, Z., & Xu, Y. (2007). Responses of reactive oxygen metabolism and quality in mango fruit to exogenous oxalic acid or salicylic acid under chilling temperature stress. *Physiologia plantarum*, *130*, 112–121. https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2007.00893.x
15- Elbagoury, M.M., Turoop, L., Runo, S., & Sila, D.N. (2021). Regulatory influences of methyl jasmonate and calcium chloride on chilling injury of banana fruit during cold storage and ripening. *Food Science and Nutrition*, *9*(2), 929–942. https://doi.org/10.1002/fsn3.2058
16- Fabi, C., Cachia, F., Conforti, P., English, A., & Moncayo, J. R. (2021). Improving data on food losses and waste: From theory to practice. *Food Policy*, *98*, 101934. https://doi.org/10.1016/j.foodpol.2020.101934
17- FAOSTAT, (2022). Available: http://www.fao.org/faostat/en/.
18- Fernandes, F.A.N., Rodrigues, S., Gaspareto, O.C.P., & Oliveira, E.L. (2006). Optimization of osmotic dehydration of bananas followed by air-drying. *Journal of Food Engineering*, *77*(1), 188–193. https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2005.05.058
19- Gill, S.S., & Tuteja, N. (2010). Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, *48*(12), 909–930. https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2010.08.016
20- Habibi, F., Ramezanian, A., Rahemi, M., Eshghi, S., Guillén, F., Serrano, M., & Valero, D. (2019). Postharvest treatments with γ-aminobutyric acid, methyl jasmonate, or methyl salicylate enhance chilling tolerance of blood orange fruit at prolonged cold storage. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *99*(14), 6408–6417. https://doi.org/10.1002/jsfa.9920
21- Hardenburg, R.E., Watada, A.E., & Wang, C.Y. (1986). *The commercial storage of fruits, vegetables, and florist and nursery stocks* (Issue 66). US Department of Agriculture, Agricultural Research Service.
22- Heli, Z., Hongyu, C., Dapeng, B., Yee Shin, T., Yejun, Z., Xi, Z., & Yingying, W. (2022). Recent advances of γ-aminobutyric acid: Physiological and immunity function, enrichment, and metabolic pathway. *Frontiers in Nutrition*, *9*, 1076223. https://doi.org/10.3389/fnut.2022.1076223
23- Herppich, W.B., & Zsom, T. (2021). Comprehensive assessment of the dynamics of banana chilling injury by advanced optical techniques. *Applied Sciences*, *11*(23), 11433. https://doi.org/10.3390/app112311433
24- Hilal, B., Khan, T.A., & Fariduddin, Q. (2023). Recent advances and mechanistic interactions of hydrogen sulfide with plant growth regulators in relation to abiotic stress tolerance in plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, *196*, 1065-1083. https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2023.03.006
25- Janeczko, A., Hura, K., Skoczowski, A., Idzik, I., Biesaga-Kościelniak, J., & Niemczyk, E. (2009). Temperature-dependent impact of 24-epibrassinolide on the fatty acid composition and sugar content in winter oilseed rape callus. *Acta Physiologiae Plantarum*, *31*, 71–79. https://doi.org/10.1007/s11738-008-0202-2
26- Khademi, O., Ashtari, M., & Razavi, F. (2019). Effects of salicylic acid and ultrasound treatments on chilling injury control and quality preservation in banana fruit during cold storage. *Scientia Horticulturae*, *249*, 334–339. https://doi.org/10.1016/j.scienta.2019.02.018
27- Khaliq, G., Ali, S., Ejaz, S., Abdi, G., Faqir, Y., Ma, J., Siddiqui, M.W., & Ali, A. (2023). γ-Aminobutyric acid is involved in overlapping pathways against chilling injury by modulating glutamate decarboxylase and defense responses in papaya fruit. *Frontiers in Plant Science*, *14*. https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1233477

28- Liang, S., Kuang, J., Ji, S., Chen, Q., Deng, W., Min, T., Shan, W., Chen, J., & Lu, W. (2020). The membrane lipid metabolism in horticultural products suffering chilling injury. *Food Quality and Safety*, *4*, 9–14. https://doi.org/10.1093/fqsafe/fyaa001
29- Luo, L., Lin, S., Zheng, H., Lei, Y., Zhang, Q., & Zhang, Z. (2007). The role of antioxidant system in freezing acclimation-induced freezing resistance of Populus suaveolens cuttings. *Forestry Studies in China*, *9*, 107–113. https://doi.org/10.1007/s11632-007-0016-0
30- Luyckx, A., Lechaudel, M., Hubert, O., Salmon, F., & Brat, P. (2016). Banana peel physiological post-harvest disorders: A review. *MOJ Food Processing & Technology, 3(1)*, 00060. https://doi.org/10.15406/MOJFPT.2016.03.00060
31- Ma, P., Li, T., Ji, F., Wang, H., & Pang, J. (2015). Effect of GABA on blood pressure and blood dynamics of anesthetic rats. *International Journal of Clinical and Experimental Medicine*, *8*(8), 14296.
32- Maehly, A., & Chance, B. (1954). Catalases and peroxidases. *Methods Biochem Anal*, *1*, 357–424. https://doi.org/10.1002/9780470110171.ch14
33- Malekzadeh, P., Khosravi-Nejad, F., Hatamnia, A.A., & Sheikhakbari Mehr, R. (2017). Impact of postharvest exogenous γ-aminobutyric acid treatment on cucumber fruit in response to chilling tolerance. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, *23*, 827–836. https://doi.org/10.1007/s12298-017-0475-2
34- Marangoni, A.G., Palma, T., & Stanley, D.W. (1996). Membrane effects in postharvest physiology. *Postharvest Biology and Technology*, *7*(3), 193–217. https://doi.org/10.1016/0925-5214(95)00042-9
35- Mditshwa, A., Khaliq, G., Hussein, Z., & Ejaz, S. (2023). Sustainable postharvest management practices for fresh produce. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, *7*, 1143759. https://doi.org/10.3389/fsufs.2023.1143759
36- Mohammadrezakhani, S., Hajilou, J., Rezanejad, F., & Zaare-Nahandi, F. (2019). Assessment of exogenous application of proline on antioxidant compounds in three *Citrus* species under low temperature stress. *Journal of Plant Interactions*, *14*(1), 347–358. https://doi.org/10.1080/17429145.2019.1629033
37- Moradi, M., Razavi, F., Rabiei, V., Soleimani Aghdam, M., & Salehi, L. (2019). The effect of gamma aminobutyric acid (GABA) treatment on post-harvest frostbite of tomato fruit. *Horticultural Sciences*, *34*, 221-230. (In Persian). https://doi.org/10.22067/JHORTS4.V34I2.78718
38- Murata, T. (1969). Physiological and biochemical studies of chilling injury in bananas. *Physiologia Plantarum*, *22*(2), 401–411. https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1969.tb07392.x
39- Nakano, Y., & Asada, K. (1980). Spinach chloroplasts scavenge hydrogen peroxide on illumination. *Plant and Cell Physiology*, *21*(8), 1295–1307. https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.pcp.a076128
40- Ngaffo Mekontso, F., Duan, W., Cisse, E.H.M., Chen, T., & Xu, X. (2021). Alleviation of postharvest chilling injury of carambola fruit by γ-aminobutyric acid: Physiological, biochemical, and structural characterization. *Frontiers in Nutrition*, *8*, 752583. https://doi.org/10.3389/fnut.2021.752583
41- Nguyen, T.B.T., Ketsa, S., & Van Doorn, W.G. (2003). Relationship between browning and the activities of polyphenoloxidase and phenylalanine ammonia lyase in banana peel during low temperature storage. *Postharvest Biology and Technology*, *30*(2), 187–193. https://doi.org/10.1016/S0925-5214(03)00103-0
42- Pongprasert, N., Sekozawa, Y., Sugaya, S., & Gemma, H. (2011). A novel postharvest UV-C treatment to reduce chilling injury (membrane damage, browning and chlorophyll degradation) in banana peel. *Scientia Horticulturae*, *130*(1), 73–77. https://doi.org/10.1016/j.scienta.2011.06.006
43- Promyou, S., Ketsa, S., & van Doorn, W.G. (2008). Hot water treatments delay cold-induced banana peel blackening. *Postharvest Biology and Technology*, *48*(1), 132–138. https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2007.09.006
44- Rabiei, V., Kakavand, F., Zaare-Nahandi, F., Razavi, F., & Aghdam, M.S. (2019). Nitric oxide and γ-aminobutyric acid treatments delay senescence of cornelian cherry fruits during postharvest cold storage by enhancing antioxidant system activity. *Scientia Horticulturae*, *243*, 268–273. https://doi.org/10.1016/j.scienta.2018.08.034
45- Ramos-Ruiz, R., Martinez, F., & Knauf-Beiter, G. (2019). The effects of GABA in plants. *Cogent Food and Agriculture*, *5*, 1670553. https://doi.org/10.1080/23311932.2019.1670553
46- Renaut, J., Hausman, J., & Wisniewski, M.E. (2006). Proteomics and low-temperature studies: bridging the gap between gene expression and metabolism. *Physiologia Plantarum*, *126*(1), 97–109. https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2006.00617.x
47- Saadati, S., Baninasab, B., Mobli, M., & Gholami, M. (2019). Measurements of freezing tolerance and their relationship with some biochemical and physiological parameters in seven olive cultivars. *Acta Physiologiae Plantarum*, *41*, 1–11. https://doi.org/10.1007/s11738-019-2843-8
48- Sairam, R.K., & Saxena, D.C. (2000). Oxidative stress and antioxidants in wheat genotypes: possible mechanism of water stress tolerance. *Journal of Agronomy and Crop Science*, *184*(1), 55–61. https://doi.org/10.1046/j.1439-037x.2000.00358.x

49- Sanna, D., Delogu, G., Mulas, M., Schirra, M., & Fadda, A. (2012). Determination of free radical scavenging activity of plant extracts through DPPH assay: An EPR and UV–Vis study. *Food Analytical Methods*, *5*, 759–766. https://doi.org/10.1007/s12161-011-9306-1
50- Shang, H., Cao, S., Yang, Z., Cai, Y., & Zheng, Y. (2011). Effect of exogenous γ-aminobutyric acid treatment on proline accumulation and chilling injury in peach fruit after long-term cold storage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *59*(4), 1264–1268. https://doi.org/10.1021/jf104424z
51- Shi, Q., Ding, F., Wang, X., & Wei, M. (2007). Exogenous nitric oxide protects cucumber roots against oxidative stress induced by salt stress. *Plant Physiology and Biochemistry*, *45*(8), 542–550. https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2007.05.005
52- Sudhakar, C., Lakshmi, A., & Giridarakumar, S. (2001). Changes in the antioxidant enzyme efficacy in two high yielding genotypes of mulberry (*Morus alba* L.) under NaCl salinity. *Plant Science*, *161*(3), 613–619. https://doi.org/10.1016/S0168-9452(01)00450-2
53- Suzuki, N., & Mittler, R. (2006). Reactive oxygen species and temperature stresses: A delicate balance between signaling and destruction. *Physiologia Plantarum*, *126*(1), 45–51. https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2005.00582.x
54- Valenzuela, J.L., Manzano, S., Palma, F., Carvajal, F., Garrido, D., & Jamilena, M. (2017). Oxidative stress associated with chilling injury in immature fruit: postharvest technological and biotechnological solutions. *International Journal of Molecular Sciences*, *18*(7), 1467. https://doi.org/10.3390/ijms18071467
55- Vijayakumari, K., & Puthur, J.T. (2016). γ-Aminobutyric acid (GABA) priming enhances the osmotic stress tolerance in *Piper nigrum* Linn. plants subjected to PEG-induced stress. *Plant Growth Regulation*, *78*, 57–67. https://doi.org/10.1007/s10725-015-0074-6
56- Wang, N.N., Yang, Y.C., Sun, D.W., Pu, H., & Zhu, Z. (2015). Shelf-life prediction of ‘Gros Michel’bananas with different browning levels using hyperspectral reflectance imaging. *Food Analytical Methods*, *8*, 1173–1184. https://doi.org/10.1007/s12161-014-9960-1
57- Wang, Y., Luo, Z., Huang, X., Yang, K., Gao, S., & Du, R. (2014). Effect of exogenous γ-aminobutyric acid (GABA) treatment on chilling injury and antioxidant capacity in banana peel. *Scientia Horticulturae*, *168*, 132–137. https://doi.org/10.1016/j.scienta.2014.01.022
58- Wisniewski, M., Bassett, C., & Gusta, L.V. (2003). An overview of cold hardiness in woody plants: Seeing the forest through the trees. *HortScience*, *38*(5), 952–959. https://doi.org/10.21273/HORTSCI.38.5.952
59- Wolfe, J.O.E. (1978). Chilling injury in plants—the role of membrane lipid fluidity. *Plant, Cell and Environment*, *1*(4), 241–247. https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.1978.tb02036.x
60- Yang, A., Cao, S., Yang, Z., Cai, Y., & Zheng, Y. (2011). γ-Aminobutyric acid treatment reduces chilling injury and activates the defence response of peach fruit. *Food Chemistry*, *129*(4), 1619–1622. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.06.018
61- Zhou, C., Dong, W., Jin, S., Liu, Q., Shi, L., Cao, S., Li, S., Chen, W., & Yang, Z. (2022). γ-Aminobutyric acid treatment induced chilling tolerance in postharvest peach fruit by upregulating ascorbic acid and glutathione contents at the molecular level. *Frontiers in Plant Science*, *13*, 1059979. https://doi.org/10.3389/fpls.2022.1059979
62- Zhu, X., Luo, J., Li, Q., Li, J., Liu, T., Wang, R., Chen, W., & Li, X. (2018). Low-temperature storage reduces aroma-related volatiles production during shelf-life of banana fruit mainly by regulating key genes involved in volatile biosynthetic pathways. *Postharvest Biology and Technology*, *146*, 68–78. https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2018.08.015
63- Zsom, T., Strohmayer, E., Phuong Le Nguyen, L., Hitka, G., & Zsom-Muha, V. (2018). Chilling injury investigation by non-destructive measuring methods during banana cold storage. *Progress in Agricultural Engineering Sciences*, *14*, 147–158. https://doi.org/10.1556/446.14.2018.S1.14

Journal of Horticultural Science
https://jhs.um.ac.ir

Research Article
Vol. 38, No. 2, Summer 2024, p. 465-478

The Effect of Time and Different Concentrations of Sodium Hypochlorite, Carbendazim Fungicide and Mercuric Chloride in Inhibiting the Contamination of *Fritillaria* spp. Bulbs in Tissue Culture Environment

L. Moradi[1], S.N. Mortazavi [2*], M. Alaei[2]

1 and 2- Ph.D. Student and Associate Professor, Department of Horticulture, Faculty of Agriculture, University of Zanjan, Zanjan, Iran, respectively.
(*- Corresponding Author Email: mortazavi46@gmail.com)

Received: 27-01-2024 Revised: 20-03-2024 Accepted: 05-04-2024 Available Online: 05-04-2024	**How to cite this article:** Moradi, L., Mortazavi, S.N., & Alaei, M. (2024). The effect of time and different concentrations of sodium hypochlorite, carbendazim fungicide and mercuric chloride in inhibiting the contamination of *Fritillaria* spp. bulbs in tissue culture environment. *Journal of Horticultural Science, 38*(2), 465-478. (In Persian with English abstract). https://doi.org/10.22067/jhs.2024.86540.1322

Introduction

Success in tissue culture technique, especially in bulbous plants, depends on the microbial contamination control during in vitro culture. Decontamination is considered as a fundamental challenge in the technique of cell, tissue and plant organ culture. Although there are various methods for this purpose, the development of disinfection methods specific to each species is considered an important factor in the establishment and success of the tissue culture system. Applying different treatments can control the microbial contamination and consequently increase the percentage of explant survival. This plant is among the poisonous plants of pastures and the chemical compounds present in it have important medicinal effects, so that the existence of alkaloid and glycosidic compounds has been reported for it. These chemical compounds are used to treat rheumatic pains, lymphatic system diseases and also as liver cleansers. This ornamental plant also has the ability to produce pots and its export is possible in pots . Currently, in order to overcome the issues of the usual methods of propagation of this ornamental plant and to produce pollution-free plants, the use of in vitro cultivation methods in this plant has become very important. bulbes is one of the most common explants of inverted tulip tissue culture, but it often faces very high internal and external fungal and bacterial contamination. In the in vitro culture of onion plants, the existence of fungal and bacterial contaminations are one of the main problems that can affect the efficiency of this type of propagation methods. Fungal and bacterial contaminations are one of the most important problematic factors in different in vitro culture methods. Internal contamination usually appears several weeks after planting. These contaminations may not be seen externally, but they affect the growth, division and greening of small samples. Mercuric chloride is mainly used as a surface disinfectant along with sodium hypochlorite and it controls the spectrum of bacteria and fungi and increases the disinfection efficiency. The results of the study showed that mercuric chloride relatively controls the bacterial and fungal contamination of the samples, but it reduces the survival percentage of the samples in high concentration. It seems that some plants are sensitive to mercuric chloride and determining the appropriate amount of this substance plays a very important role in preparing a healthy and living specimen. Determining the duration of disinfectant treatment was also considered in various researches, so that sometimes carbendazim 1% fungicide for 20 minutes, 70% alcohol for 60 seconds, sodium hypochlorite 2.5% for 10 minutes. And 0.1% mercury chloride was used for 7 minutes to sterilize aloe vera sample. Considering the importance of plant tissue culture techniques and the need to create new protocols to reduce contamination and increase the number of healthy cultures, the main goal of this study is to create an efficient protocol for the disinfection of *Fritillaria* spp. onion explants in order to increase the efficiency of in vitro cultures.

©2024 The author(s). This is an open access article distributed under Creative Commons Attribution 4.0 International License (CC BY 4.0).

https://doi.org/10.22067/jhs.2024.86540.1322

Materials and Methods

This study aimed to investigate the effect of time and different concentrations of sodium hypochlorite, carbendazim fungicide and mercuric chloride in inhibiting the contamination of inverted tulip bulbs *(Fritillaria* spp.*)* in tissue culture environment. So, an experiment was done as a completely randomized design at four replications in the biotechnology laboratory of Zanjan University during 2023. The experimental treatments consisted of 0.1% fungicide at different times (30, 25, 35 and 40 minutes), 5 levels of sodium hypochlorite (0,1, 1.5, 2, 2.5 and 3%) at different times (7, 9, 10, 12 and 15 minutes), 70% Ethanol at two different times (0,60 and 90 seconds) and mercury chloride (0,0.1 and 0.2%). Bulbs that collected from nature were transferred to the Biotechnology Laboratory of the Faculty of Agriculture, Department of Horticulture, Zanjan University and kept them in the refrigerator at 4°C for two weeks. After this period of time, the bulbs were washed with detergent and then remained in water for 30 minutes. Then they were disinfected by using the above-mentioned treatments: It should be noted that at the end of each step, *Fritillaria* bulbs were washed with sterile distilled water. Also, after the end of the disinfection treatments, the desired explants were cultured in MS basic culture medium. The statistical analysis of this experiment was carried out using SAS software, version 9.1. The differences between mean values were compared using Duncan’s multiple range test method at the 5% significant level ($p < 0.05$).

Results and Discussion

The control of fungal and bacterial contamination, especially in relation to bulbous and bulbous plants that are in direct contact with the culture medium, is one of the basic steps in in vitro culture conditions. Applying different treatments including the use of fungicides, alcohol, sodium hypochlorite and mercuric chloride in the cultivation environment can help control fungal and bacterial contamination in the *Fritillaria spp.* plant. However, the application of such treatments can have a negative effect on the regeneration potential of the explants, so it is important to choose the appropriate treatment in a way that controls the fungal and bacterial contamination and on the other hand preserves the regeneration potential of the explants. This study investigated the effectiveness of various disinfection protocols on Laleh-Avgagun onion explants. While the lowest contamination (0%) was achieved using 0.1% fungicide for 40 minutes, 70% alcohol for 90 seconds, 3% sodium hypochlorite for 15 minutes, and 0.1% mercury chloride, this treatment significantly reduced explant survival and regeneration, causing browning. Conversely, applying 0.1% fungicide for 30 minutes, 70% alcohol for 60 seconds, 2% or 2.5% sodium hypochlorite for 12 or 10 minutes respectively, and 0.1% mercury chloride effectively reduced contamination while maintaining explant survival. This optimized protocol improved the growth and regeneration ability of the explants.Therefore, in the conditions of in vitro cultivation, the use of the mentioned treatments is recommended to control contamination and optimal reproduction of the bulbs of *Fritillaria* spp. plant.

Keywords: Disinfection, Extinction, *In vitro*, Mercuric chloride, Micropropagation

نشریه علوم باغبانی
https://jhs.um.ac.ir

مقاله پژوهشی
جلد ۳۸، شماره ۲، تابستان ۱٤۰۳، ص. ٤٧٨-٤٦٥

تأثیر زمان و غلظت‌های مختلف هیپوکلریت سدیم، قارچ‌کش کاربندازیم و کلرید جیوه در مهار آلودگی پیاز لاله واژگون (*Fritillaria* spp.) در محیط کشت بافت

لطافت مرادی[۱]- سید نجم الدین مرتضوی[۲*]- میترا اعلایی[۳]

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۱۱/۰۷
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۱/۱۷

چکیده

رفع آلودگی به‌عنوان یک چالش اساسی در تکنیک کشت سلول، بافت و اندام گیاهی به‌شمار می‌رود. با اینکه روش‌های مختلفی برای این منظور وجود دارد، امّا توسعه روش‌های ضدعفونی مختص هر گونه یک عامل مهم در استقرار و موفقیت سیستم کشت بافت به‌شمار می‌رود. لذا، پژوهش حاضر به‌منظور بررسی تأثیر زمان و غلظت‌های مختلف هیپوکلریت سدیم، قارچ‌کش کاربندازیم و کلرید جیوه در مهار آلودگی پیازهای لاله واژگون (*Fritillaria* spp.) در محیط کشت بافت به‌صورت طرح کاملاً تصادفی در آزمایشگاه بیوتکنولوژی دانشگاه زنجان اجرا شد. تیمارهای آزمایش شامل قارچ‌کش ۰/۱ درصد در زمان‌های مختلف (صفر، ۲۵، ۳۰، ۳۵ و ۴۰ دقیقه)، پنج سطح هیپوکلریت سدیم (صفر ، ۱، ۱/۵، ۲، ۲/۵ و ۳ درصد) در زمان‌های مختلف (صفر ، ۷، ۹، ۱۰، ۱۲ و ۱۵ دقیقه)، الکل ۷۰ درصد با زمان (صفر ، ۶۰ و ۹۰ ثانیه) و کلرید جیوه (صفر ، ۰/۱ و ۰/۲ درصد) بود. نتایج پژوهش حاضر نشان داد که با وجود اینکه کمترین درصد آلودگی در زمان ۴۰ دقیقه قارچ‌کش کاربندازیم، الکل ۷۰ درصد در زمان ۹۰ ثانیه، غلظت ۳ درصد و زمان ۱۵ دقیقه هیپوکلریت سدیم و غلظت ۰/۲ درصد کلرید جیوه حاصل شد، امّا میزان زنده‌مانی ریزنمونه‌ها به کمترین میزان کاهش یافت و باعث قهوه‌ای شدن ریزنمونه‌ها شد. طبق نتایج حاصل، بهترین تیمار با رفع آلودگی ۸۰ درصد و درصد زنده‌مانی بالا، زمان ۳۰ دقیقه قارچ‌کش، زمان ۶۰ ثانیه الکل ۷۰ درصد، هیپوکلریت سدیم ۲ و ۲/۵ درصد به‌ترتیب به‌مدت ۱۲ و ۱۰ دقیقه و کلرید جیوه ۰/۱ درصد به‌مدت هفت دقیقه بود. لذا استفاده از تیمارهای ذکر شده در شرایط کشت درون شیشه‌ای، جهت کاهش آلودگی و ریزازدیادی پیازهای گیاه لاله واژگون پیشنهاد می‌گردد.

واژه‌های کلیدی: انقراض، درون شیشه‌ای، ریزازدیادی،کمیاب، گندزدایی

مقدمه

لاله واژگون[۲] یکی از گیاهان زینتی موجود در خانواده Liliaceae بوده و این تیره شامل گیاهانی غالباً علفی و دارای پیاز می‌با شد. لاله واژگون به‌دلیل زیبایی ناشی از واژگونی گل‌ها، بازارپسندی بالایی دارد و در بازار کشورهای آمریکایی و اروپایی توجه خاصی به این گیاه نشان می‌دهند (Mohammadi Deh-Cheshmeh *et al*., 2008). گیاه لاله واژگون از لحاظ زیبایی محیط و جذب اکوتوریست نیز حائز اهمیت است. بر اساس سیاست‌های سازمان حفاظت محیط زیست به‌عنوان ذخیره ژنتیکی و عنصر زیبایی شناختی قلمداد شده و نیاز به حفاظت دارند، زیرا به نظر می‌رسد که با توجه به پراکنش محدود و متراکم، جاده سازی، برداشت گل و پیاز، بقای لاله واژگون در آینده با چالش‌هایی روبه‌رو خواهد شد (Eslamzadeh *et al*., 2009).

این گیاه جزء گیاهان سمی مراتع نیز بوده و ترکیبات شیمیایی موجود در آن دارای اثرات دارویی مهمی می‌باشد، به‌طوری‌که وجود ترکیبات آلکالوئیدی و گلیکوزیدی برای آن گزارش شده است. این ترکیبات شیمیایی برای درمان دردهای روماتیسمی، بیماری‌های سیستم لنفاوی و نیز به‌عنوان پاک‌کننده کبد مورد استفاده قرار می‌گیرد. این گیاه زینتی قابلیت تولید گلدانی را نیز دارا بوده و صادرات

۱ و ۲- به‌ترتیب دانشجوی دکتری و دانشیار، گروه باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زنجان، زنجان، ایران
(*- نویسندهٔ مسئول: Email: mortazavi46@gmail.com)

https://doi.org/10.22067/jhs.2024.86540.1322
2- *Fritillaria* spp.

آن به‌صورت گلدانی امکان‌پذیر می‌باشد (Afifian, 2010). در حال حاضر، برای فایق آمدن بر مشکلات روش‌های معمول تکثیر این گیاه زینتی و تولید گیاهان عاری از آلودگی، استفاده از روش‌های کشت درون شیشه‌ای در این گیاه اهمیت زیادی پیدا کرده است. فلس سوخ از مرسوم‌ترین ریزنمونه‌های کشت بافت لاله واژگون است، امّا اغلب با آلودگی داخلی و خارجی قارچی و باکتریایی بسیار بالا مواجه است. مدیریت صحیح منابع ژنتیکی در این گونه، ضمن حفاظت از ذخایر ژنتیکی، منجر به استفاده از آن در برنامه‌های اصلاح و ارائه محصولی جدید در سطح جهانی خواهد شد که این امر یکی از رموز موفقیت در گلکاری نوین در جهان می‌باشد. تکثیر درون شیشه‌ای این گونه گیاهان که از راه‌های سنتی نیز با محدویت در ازدیاد مواجه هستند، مزایای قابل توجهی دارد. این گونه‌ها به‌علت برداشت گل و پیاز توسط گردشگران و چرای دام‌ها در رویشگاه‌های طبیعی و به‌خصوص انواع آلودگی‌های درون‌زاد، از لحاظ اقلیم نیز دچار تهدید شده‌اند (Sadr *et al*., 2019).

در کشت درون شیشه‌ای گیاهان پیازی، وجود آلودگی‌های قارچی و باکتریایی از مشکلات اساسی می‌باشند که می‌تواند کارایی این نوع روش‌های تکثیری را تحت تأثیر قرار دهند. آلودگی‌های قارچی و باکتریایی از مهم‌ترین عوامل مشکل‌ساز در روش‌های مختلف کشت درون شیشه‌ای می‌باشند (Telem *et al*., 2016). از جمله این عوامل می‌توان به قارچ‌های جنس باکتری‌های *Penicillium*، *Aspergillus*، *Pectobacterium*، *Alternaria*، *Erwinia* و *Ralstonia* اشاره نمود. برای جلوگیری از این نوع آلودگی‌ها، برخی ترکیبات در تحقیقات مختلف مورد بررسی قرار گرفته‌اند که به نظر می‌رسد کاربرد این ترکیبات برای کم کردن یا از بین بردن آلودگی‌های باکتریایی و ضدقارچی در محیط کشت درون شیشه‌ای می‌تواند میزان آلودگی را تحت تأثیر قرار داده و آن را کاهش دهد (Mihaljević *et al*., 2013). در آزمایشی بررسی شده است که در ریزنمونه فلس، حتی در بهترین حالت، آلودگی به‌طور کامل ریشه‌کن نمی‌شود. آلودگی داخلی بسیار بالا در لاله واژگون از موانع عدم موفقیت نسبی یا کامل در کشت بافت این جنس است و محققین معتقدند باید ریزنمونه‌های جایگزین مانند اندام های هوایی مورد استفاده قرارگیرد (Gholami, Hamidoghli *et al*., 2015; Mohammadi Deh Cheshmeh *et al*., 2007). استفاده از مواد ضدعفونی‌کننده سطحی یکی از روش‌های ممکن برای کاهش این آلودگی‌ها است. برای گندزدایی سطحی عموماً از الکل ۷۰ درصد، هیپوکلریت سدیم، هیپوکلریت کلسیم و کلریدجیوه استفاده می‌شود. آنتی‌بیوتیک‌ها نیز برای کنترل آلودگی‌های داخلی و خارجی مؤثر هستند. آلودگی‌های داخلی معمولاً چندین هفته بعد از کشت ظاهر می شوند. این آلودگی‌ها ممکن است از لحاظ ظاهری دیده نشوند، امّا بر روی رشد، تقسیم و سبز شدن ریز نمونه‌ها تأثیر می‌گذارند (Reed *et al*., 1995). کلریدجیوه به‌عنوان یک ضدعفونی‌کننده سطحی عمدتاً همراه با هیپوکلریت سدیم استفاده می‌شود و کنترل طیف باکتری‌ها و قارچ‌ها و کارایی ضدعفونی را افزایش می‌دهد. نتایج بررسی نشان داد که کلریدجیوه به‌طور نسبی آلودگی باکتریایی و قارچی ریزنمونه‌ها را کنترل می‌کند، امّا درصد زنده‌مانی ریزنمونه‌ها را در غلظت بالا کاهش می‌دهد. به نظر می‌رسد برخی گیاهان نسبت به کلرید جیوه حساس باشند و تعیین مقدار مناسب این ماده نقش بسیار مهمی در تهیه ریزنمونه سالم و زنده دارد. تعیین مدت زمان تیمار ضدعفونی‌کننده در تحقیقات مختلف هم مورد توجه قرار گرفت، به‌طوری‌که گاهی از قارچ-کش کاربندازیم یک درصد به‌مدت ۲۰ دقیقه، الکل ۷۰ درصد به‌مدت ۶۰ ثانیه، هیپوکلریت سدیم ۲/۵ درصد به‌مدت ۱۰ دقیقه و کلرید جیوه ۰/۱ درصد به‌مدت هفت دقیقه برای استریل کردن نمونه‌های آلوئه‌ورا استفاده شده است (Hamidoghli *et al*., 2015).

کاربندازیم، قارچ‌کشی سیستمیک و عمومی است، که در کنترل بسیاری از آلودگی‌های قارچی کاربرد دارد و از آن به‌عنوان یک قارچ کش عمومی استفاده می‌شود. نتایج برخی گزارش‌ها نشان می‌دهد که تیمار گیاهچه‌ها قبل از ضدعفونی با این قارچ‌کش می‌تواند کارایی ضدعفونی را افزایش دهد (Zhang *et al*., 2007). با توجه به اهمیت تکنیک‌های کشت بافت گیاهی و لزوم ایجاد پروتکل‌های جدید برای کاهش آلودگی و افزایش تعداد کشت‌های سالم، هدف اصلی این مطالعه، ایجاد یک پروتکل کارآمد برای ضدعفونی ریزنمونه‌های پیاز لاله واژگون به‌منظور افزایش کارایی کشت‌های درون شیشه‌ای است.

مواد و روش‌ها

این آزمایش به‌صورت طرح کاملاً تصادفی در سه تکرار در آزمایشگاه بیوتکنولوژی گروه باغبانی- دانشکده کشاورزی- دانشگاه زنجان در تابستان سال ۱۴۰۱ انجام شد. تیمارهای آزمایشی شامل قارچ‌کش ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر در زمان‌های مختلف (صفر، ۲۵، ۳۰، ۳۵ و ۴۰ دقیقه)، پنج سطح هیپوکلرید سدیم (شاهد (فقط آب مقطر)، ۱، ۱/۵، ۲، ۲/۵ و ۳) در زمان‌های مختلف (شاهد (فقط آب مقطر)، ۷، ۹، ۱۰، ۱۲ و ۱۵ دقیقه)، الکل ۷۰ درصد با زمان (صفر، ۶۰ و ۹۰ ثانیه) و کلرید جیوه (شاهد (فقط آب مقطر)، ۰/۱ و ۰/۲ درصد) جهت بررسی زنده‌مانی و مهار آلودگی در ریزنمونه‌های پیاز لاله واژگون اجرا گردید.

مواد گیاهی و تهیه ریز نمونه

پیازهای گیاه لاله واژگون در تیرماه سال ۱۴۰۱ از منطقه حفاظت شده شهرستان ماهنشان استان زنجان جمع‌آوری و به آزمایشگاه گروه باغبانی، دانشکده کشاورزی دانشگاه زنجان انتقال یافت. حوزه مورد مطالعه منطقه ماهنشان با وسعتی بالغ بر پنج هزار هکتار در دو منطقه

کوهستانی واقع شده، شهرستان ماهنشان از شمال به شهرستان زنجان، از شمال باختری به شهرستان چاراویماق (استان آذربایجان شرقی)، از باختر به شهرستان تکاب (استان آذربایجان غربی)، از خاور به شهرستان زنجان، از جنوب خاوری به شهرستان ایجرود و از جنوب به شهرستان بیجار (استان کردستان) محدود می‌شود. این شهرستان در ۴۷ درجه و ۱۰ دقیقه تا ۴۷ درجه و ۵۹ دقیقه در ازای خاوری و ۳۶ درجه و ۲۱ دقیقه تا ۳۶ درجه و ۵۹ دقیقه پهنای شمالی واقع شده است. مرکز این شهرستان نیز در ۴۷ درجه و ۴۰ دقیقه درازای خاوری و۳۶ درجه و ۴۵ دقیقه پهنای شمالی و ارتفاع ۱۳۰۰ متری از سطح دریا واقع شده است. براساس مطالعات انجام شده ۲۹ گونه بوته و درختچه، ۹۶ نوع علفی‌های پهن برگ و ۴۶ گونه گرامینه و شبه‌گرامینه در محدوده مورد مطالعه وجود دارد (Zamanzadeh Darban & Joulii Tehrani, 2020).

ضدعفونی سطحی و کنترل آلودگی

پیازهای جمع‌آوری شده از طبیعت به آزمایشگاه بیوتکنولوژی دانشکده کشاورزی گروه باغبانی دانشگاه زنجان انتقال و به‌مدت دو هفته برای گذرانده دوره سرمای مورد نیاز در یخچال در دمای چهار درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شدند. بعد از این مدت، پیازها با مایع ظرفشویی شستشو شده و به‌مدت ۳۰ دقیقه زیر آب جاری قرار گرفتند. سپس، به‌ترتیب با استفاده از پنج آزمایش زیر کنترل آلودگی سطحی ریزنمونه‌های پیاز لاله واژگون انجام شد.

آزمایش اول: ریزنمونه‌های پیاز لاله واژگون با استفاده از قارچ‌کش کاربندازیم (۰/۱ گرم در ۱۰۰ سی‌سی آب مقطر) در زمان‌های مختلف (شاهد (فقط آب مقطر)، ۲۵، ۳۰، ۳۵ و ۴۰ دقیقه) ضدعفونی گردید.

آزمایش دوم: ریزنمونه‌های پیاز لاله واژگون با استفاده از الکل ۷۰ درصد (اتانول ۹۶ درصد) در سه بازه زمانی (شاهد (فقط آب مقطر)، ۶۰ و ۹۰ ثانیه) گندزدایی شد.

آزمایش سوم: ریزنمونه‌های پیاز لاله واژگون در غلظت‌های مختلف هیپوکلریت سدیم (شاهد (فقط آب مقطر)، ۱، ۱/۵، ۲، ۲/۵ و ۳ درصد) ضدعفونی شد.

آزمایش چهارم: ریزنمونه‌های پیاز لاله واژگون در بازه زمانی مختلف هیپوکلریت سدیم (شاهد (فقط آب مقطر)، ۷، ۹، ۱۰، ۱۲ و ۱۵ دقیقه) گندزدایی گردید.

آزمایش پنجم: ریزنمونه‌های پیاز لاله واژگون در غلظت‌های مختلف کلرید جیوه (شاهد (فقط آب مقطر)، ۰/۱ و ۰/۲ درصد) به‌مدت هفت دقیقه برای ضدعفونی قرار گرفت.

آب مقطر برای هر آزمایش به‌عنوان شاهد در نظر گرفته شد. همچنین، لازم به ذکر است که در آخر هر آزمایش ریزنمونه‌های پیاز لاله واژگون جهت رفع سموم موجود در ریزنمونه‌ها با آب مقطر استریل شستشو داده شد. همچنین، بعد از تمام شدن زمان تیمارهای ضدعفونی، ریزنمونه‌های مورد نظر در محیط کشت پایه MS بدون هورمون کشت شدند (Teixeira & Dobranszki, 2014). در نهایت، درصد زنده‌مانی و درصد مهار آلودگی ریزنمونه‌ها مورد بررسی قرار گرفت (Manole et al., 2012).

درصد مهار آلودگی = تعدادریزنمونه‌های آلوده / تعداد کل ریزنمونه‌ها ضربدر ۱۰۰

درصد زنده‌مانی = تعدادریزنمونه‌های زنده / تعداد کل ریزنمونه‌ها ضربدر ۱۰۰

آنالیز داده‌های حاصل با استفاده از نرم‌افزار SAS V9 و مقایسه میانگین داده‌ها از طریق آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال پنج درصد مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند.

نتایج و بحث

تأثیر زمان نگهداری در قارچ‌کش کاربندازیم بر رفع آلودگی و زنده‌مانی ریزنمونه‌های پیاز لاله واژگون

نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد، اثر زمان نگهداری در قارچ‌کش کاربندازیم برای رفع آلودگی و زنده‌مانی پیاز گیاه لاله واژگون در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار شد (جدول ۱). با افزایش زمان نگهداری در قارچ‌کش کاربندازیم، مهار آلودگی پیازهای لاله واژگون افزایش یافت، به‌طوری‌که با افزایش زمان از ۲۵ به ۴۰ دقیقه مهار آلودگی به‌طور معنی‌داری بهبود یافت (شکل ۱ الف). ولی بااین‌حال بر زنده‌مانی ریزنمونه‌های پیاز لاله واژگون تأثیر منفی داشت و درصد زنده‌مانی را به‌طور قابل‌توجهی کاهش داد (شکل ۱ ب). لذا طبق نتایج، بهترین زمان نگهداری برای گندزدایی ریزنمونه‌های پیاز لاله واژگون ۳۰ دقیقه است، زیرا ریزنمونه‌ها کمترین آسیب را دیده و قدرت باززایی و رشد را حفظ می‌کند (شکل ۱).

پژوهش‌ها نشان می‌دهند که کاربرد قارچ‌کش‌ها می‌توانند به کنترل آلودگی در شرایط کشت بافت کمک نماید (Eed *et al*., 2010). براساس تحقیقات انجام شده، مؤثرترین تیمار در مقابل آلودگی قارچی، قارچ‌کش کاربندازیم می‌باشد (Ahmadi *et al*., 2012).

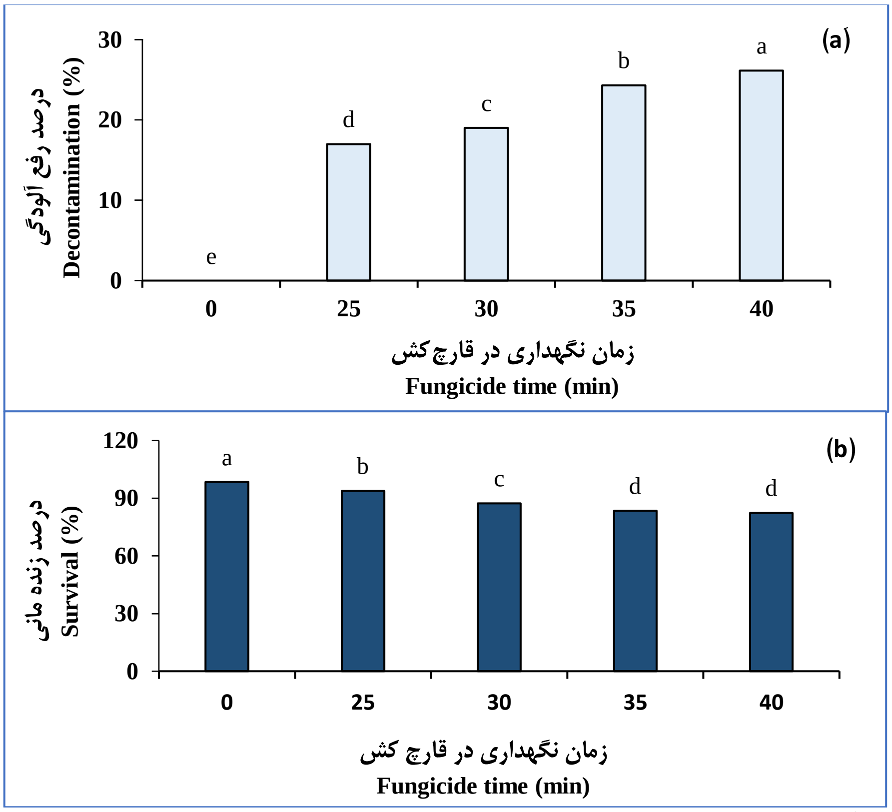
جدول ۱- تجزیه واریانس اثر زمان نگهداری در قارچ‌کش کاربندازیم برای رفع آلودگی و زنده‌مانی پیاز گیاه لاله واژگون

Table 1- ANOVA for the effect of soaking time in Carbendazim fungicide for decontamination and survival of *Fritillaria* spp. Bulbs

منابع تغییرات S.O.V	درجه آزادی df	میانگین مربعات Mean squares	
		رفع آلودگی Decontamination	زنده‌مانی Survival
تکرار Replication	2	1.9500	13.0086
زمان Time	4	322.7666**	141.6773**
خطا Error	8	0.6166	2.2428
ضریب تغییرات C.V (%)	-	4.53	1.68

ns، ** و * به‌ترتیب عدم معنی‌داری، معنی‌داری در سطح احتمال ۱ و ۵ درصد.

ns, ** and *: non-significant, and significant at $p\leq0.01$ and $p\leq0.05$, respectively.



شکل ۱- تأثیر زمان نگهداری در قارچ‌کش کاربندازیم برای رفع آلودگی (الف) و زنده‌مانی (ب) پیاز گیاه لاله واژگون

Figure 1- The effect of soaking time in carbendazim fungicide for decontamination (A) and survival (B) of *Fritillaria* spp. Bulbs. (DMRT, $p\leq0.05$)

ازآنجایی‌که کاربندازیم، قارچ‌کشی سیستمیک و عمومی است، در طیف وسیعی برای پیشگیری و کنترل بیماری‌های گیاهی در محصولات زراعی، باغی و زینتی استفاده می‌شود. کاربندازیم به‌صورت پودر خاکستری رنگ است و قابلیت حلالیت بالایی در آب دارد. این قارچ‌کش به‌سرعت از طریق برگ و ریشه توسط گیاه جذب می‌شود، لذا جهت حذف قارچ‌های داخلی مفید می‌باشد. محققین گزارش کردند که استفاده از تیمارهای قارچ‌کش (نظیر کاربندازیم با غلظت ۰/۵ درصد) قبل از کشت نمونه‌ها، می‌تواند به کاهش آلودگی قارچی کمک نماید (Smith, 2013; Mng'omba *et al.*, 2012). آلتان و همکاران (Altan *et al.*, 2010)، از تیمارهای شیمیایی مختلفی برای کنترل

آلودگی میکروبی در کشت درون شیشه‌ای لیلیوم استفاده کردند و بهترین پاسخ را پس از اعمال ترکیب ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر کاربندازیم به‌همراه ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر نیستاتین به‌مدت ۳۰ دقیقه مشاهده نمودند. نتایج مشابهی نیز در بذر کاج (Allen *et al*., 2004; Barnett گزارش شده است. کاربرد محیط کشت MS حاوی یک گرم در لیتر کاربندازیم باعث حذف کامل آلودگی از ریزنمونه‌های گیاه انجدان رومی گردید. در این تحقیق، افزایش غلظت کاربندازیم در محیط کشت تأثیر منفی بر باززایی ریزنمونه‌ها داشت، روش‌های مختلف ضدعفونی و استفاده از آنتی بیوتیک‌ها برای کنترل آلودگی در محیط درون شیشه ای مورد استفاده و توصیه شده است، ولی برخی از این‌ها بهره‌وری پایین و برخی هم اثرات سمی زیادی روی ریزنمونه‌ها دارند (Khatibzadeh *et al*., 2013).

تأثیر زمان نگهداری در الکل بر رفع آلودگی و زنده‌مانی ریزنمونه‌های پیاز لاله واژگون

نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد، اثر زمان نگهداری در الکل ۷۰ درصد برای رفع آلودگی و زنده‌مانی پیاز گیاه لاله واژگون در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار شد (جدول ۲). مهار آلودگی پیازهای لاله واژگون با افزایش زمان نگهداری در الکل ۷۰ درصد افزایش یافت، به‌طوری‌که با افزایش زمان از ۶۰ به ۹۰ ثانیه سبب افزایش معنی‌دار مهار آلودگی گردید (شکل ۲ الف). ولی نگهداری به مدت ۹۰ ثانیه در الکل ۷۰ درصد زنده‌مانی ریزنمونه‌های پیاز لاله واژگون را به‌طور قابل‌توجهی کاهش داد. در این صورت، بیشتر ریزنمونه‌ها قهوه‌ای شده و رشد و باززایی ریزنمونه‌های گیاهی کاهش یا کاملاً از بین رفت (شکل ۲ ب). بر همین اساس، بهترین زمان نگهداری در الکل برای گندزدایی ریزنمونه‌های پیاز لاله واژگون ۶۰ ثانیه بود که سبب مهار آلودگی بیشتر و آسیب کمتر ریزنمونه‌ها گردیده و قدرت رشد و باززایی را حفظ کرد (شکل ۲).

گزارش شده است که استفاده از الکل ۷۰ درصد برای گندزدایی ریزنمونه‌ها، سبب حذف لایه روی سطح کوتیکول شده و در نتیجه، محلول ضدعفونی‌کننده اصلی می تواند قدرت نفوذ و تأثیر بهتری بر بافت نمونه‌ها داشته باشد (Harum, 2013). ازآنجایی‌که اولین مرحله کشت سلول و بافت گیاهی شامل انتقال ماده گیاهی از محیط خارج آزمایشگاه به شرایط آزمایشگاهی است، ضدعفونی و استقرار کشت‌ها یک مرحله مهم از پروتکل‌های ریزازدیادی و کشت بافت محسوب می‌شود (Silva & Dobranszki, 2014). آلودگی همیشه در مراحل استقرار بروز نمی‌کند، بلکه برخی از آلاینده‌های داخلی هستند که بعد از مرحله کشت ظاهر شده و از بین بردن این نوع آلاینده با روش‌های معمول مشکل است. اگرچه روش‌های ضدعفونی مختلفی که توسط محققین مورد استفاده قرار می‌گیرد، به گونه و نوع ریزنمونه بستگی دارد؛ بااین‌حال، با اتانول ۷۰ درصد به‌تنهایی یا همراه با هیپوکلریت سدیم از جمله موادی هستند که به‌صورت بسیار متداول مورد استفاده قرار می گیرد (Karaoğlu *et al*., 2006). پژوهش‌های قبلی نشان داده اند، الکل ماده‌ای دهیدراته‌کننده می‌باشد که باعث تخریب غشای سلولی، واسرشت شدن سریع پروتئین‌ها و در ادامه برهم‌خوردن سوخت وساز سلول می‌شود (Cowan, 1999). از الکل ۷۰ درصد برای ضدعفونی بذرهای زوفا و ریحان نیز استفاده شده است که در این مرحله، هر چه ساقه‌های انتخابی جوان‌تر باشند میزان آلودگی داخلی کاهش یافته و فرایند استریل کردن با موفقیت بیشتری همراه خواهد بود (Ahmadi *et al*., 2012).

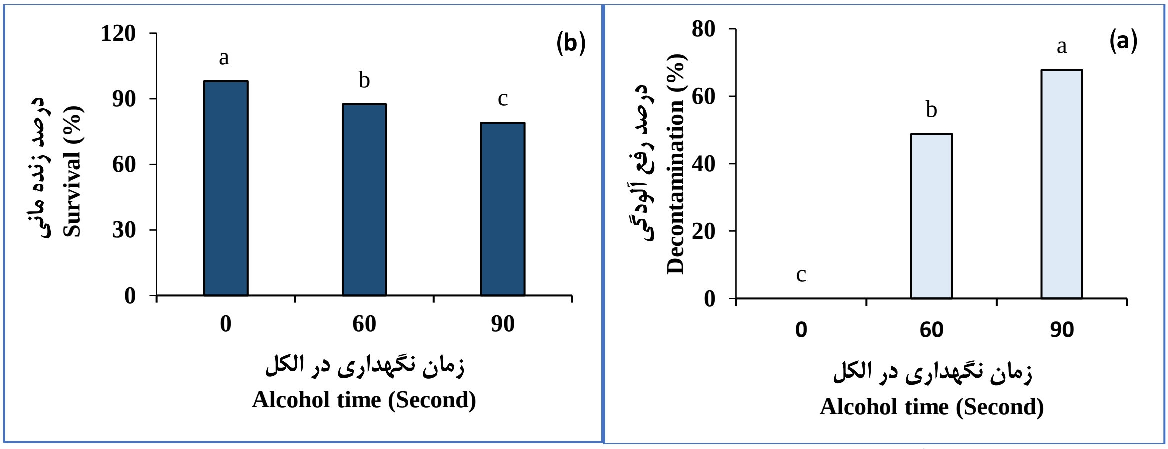
جدول ۲- تجزیه واریانس اثر زمان نگهداری در الکل برای رفع آلودگی و زنده‌مانی پیاز گیاه لاله واژگون

Table 2- ANOVA for the effect of soaking time in Alcohol for decontamination and survival of *Fritillaria* spp. Bulbs.

منابع تغییرات S.O.V	درجه آزادی df	میانگین مربعات Mean squares	
		رفع آلودگی Decontamination	زنده‌مانی Survival
تکرار Replication	2	2.9011	12.3477
زمان Time	2	3644.6944**	271.8877**
خطا Error	4	0.8011	0.3361
ضریب تغییرات C.V (%)	-	2.30	0.65

ns، ** و * به‌ترتیب عدم معنی‌داری، معنی‌داری در سطح احتمال ۱ و ۵ درصد.

ns, ** and *: non-significant, and significant at $p \leq 0.01$ and $p \leq 0.05$, respectively.



شکل ۲- تأثیر زمان نگهداری در الکل برای رفع آلودگی (الف) و زنده‌مانی (ب) پیاز گیاه لاله واژگون

Figure 2- The effect of soaking time in alcohol for decontamination (A) and survival (B) of *Fritillaria* spp. Bulbs. (DMRT, *p≤0.05*)

تأثیر غلظت‌های مختلف هیپوکلرید سدیم بر رفع آلودگی و زنده‌مانی ریزنمونه‌های پیاز لاله واژگون

تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد، اثر غلظت‌های مختلف هیپوکلرید سدیم برای رفع آلودگی و زنده‌مانی پیاز گیاه لاله واژگون در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار شد (جدول ۳). استفاده از غلظت‌های مختلف هیپوکلرید سدیم آلودگی ریزنمونه‌های پیاز لاله واژگون را مهار کرد و کاربرد هیپوکلرید سدیم سه درصد بیشترین تأثیر را در رفع آلودگی پیاز لاله واژگون داشت (شکل ۳ الف). امّا افزایش غلظت این مهارکننده آلودگی، اثر منفی بر زنده‌مانی و رشد پیازها داشت. به‌طوری‌که بیشترین درصد رفع آلودگی و کمترین درصد زنده‌مانی با استفاده از هیپوکلرید سدیم سه درصد مشاهده شد (شکل ۳ ب). بر همین اساس، کاربرد هیپوکلرید سدیم ۲ و ۲/۵ درصد مناسب‌ترین تیمار برای مهار آلودگی و در عین حال، حفظ زنده‌مانی ریزنمونه‌های پیاز بود (شکل ۳).

هنگامی که هدف کشت بافت تکثیر تجاری گیاهان باشد، آلودگی های قارچی و باکتریایی می‌تواند لطمه‌های جبران ناپذیری به آن وارد آورد (Hosseini & Alizadeh, 2013). برای گندزدایی سطحی عموماً از هیپوکلریت سدیم استفاده می‌شود. آنتی‌بیوتیک‌ها نیز برای کنترل آلودگی‌های داخلی و خارجی مؤثر هستند. آلودگی‌های داخلی معمولاً چندین هفته بعد از کشت ظاهر می‌شوند. این آلودگی‌ها ممکن است از لحاظ ظاهری دیده نشوند، امّا بر رشد، تقسیم و سبز شدن ریزنمونه‌ها تأثیر می‌گذارند (Reed *et al*., 1995).

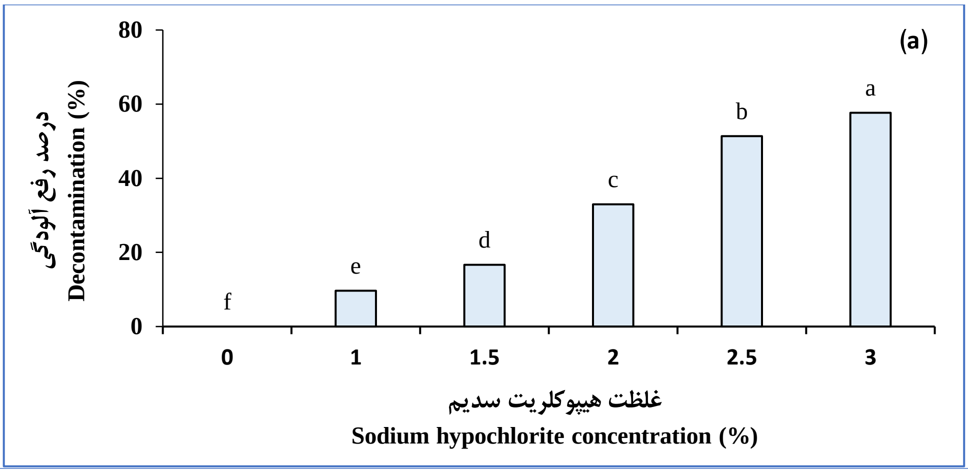
جدول ۳- تجزیه واریانس اثر غلظت‌های مختلف هیپوکلرید سدیم برای رفع آلودگی و زنده‌مانی پیاز گیاه لاله واژگون

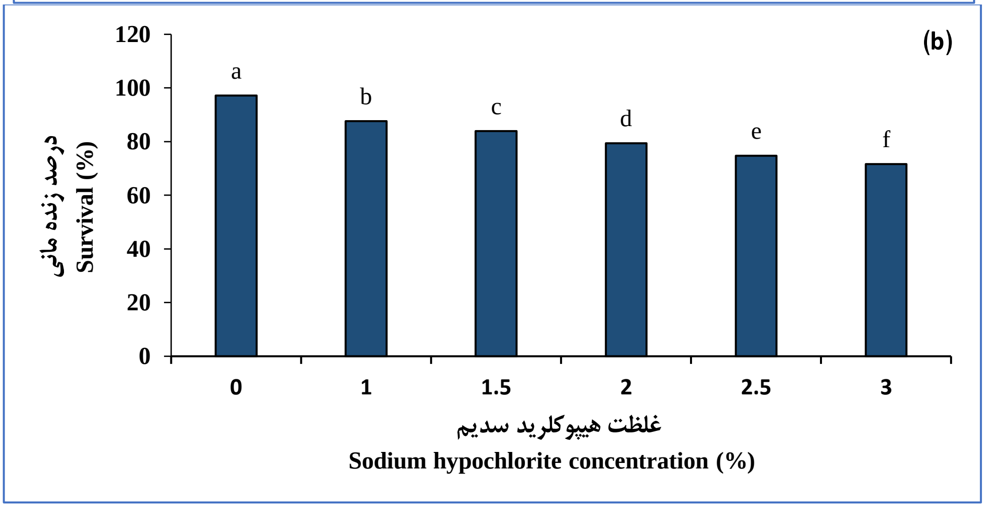
Table 3- ANOVA for the effect of different concentrations of sodium hypochlorite for decontamination and survival of *Fritillaria* spp. Bulbs

منابع تغییرات S.O.V	درجه آزادی df	میانگین مربعات Mean squares	
		رفع آلودگی Decontamination	زنده‌مانی Survival
تکرار Replication	2	11.4444	0.1072
هیپوکلریت سدیم Sodium hypochlorite	5	8094.2777**	1281.3577**
خطا Error	10	0.7222	0.9125
ضریب تغییرات C.V (%)	-	3.02	1.15

ns، ** و * به‌ترتیب عدم معنی‌داری، معنی‌داری در سطح احتمال ۱ و ۵ درصد.

ns, ** and *: non-significant, and significant at $p≤0.01$ and $p≤0.05$, respectively.





شکل ۳- تأثیر غلظت‌های مختلف هیپوکلریت سدیم برای رفع آلودگی (الف) و زنده‌مانی (ب) پیاز گیاه لاله واژگون

Figure 3- The effect of different concentrations of sodium hypochlorite for decontamination (A) and survival (B) of *Fritillaria* spp. Bulbs. (DMRT, *p≤0.05*)

هیپوکلریت سدیم بر ضدعفونی برخی از ارقام آلسترومریا مؤثر بوده است، با این وجود در بعضی از ارقام نیز تأثیر چندانی بر میزان آلودگی نداشته است (Abdi *et al.*, 2008). طیف وسیعی از مواد ضدعفونی‌کننده مانند پروکسید هیدروژن، اتانول، نیترات نقره، آب برم، کلرید جیوه و آنتی‌بیوتیک‌ها برای ضدعفونی سطحی مورد استفاده قرار می‌گیرند، ولی بااین‌حال هیپوکلریت سدیم که به‌عنوان سفیدکننده تجاری شناخته شده است، به‌طور گسترده مورد استفاده قرار می‌گیرد (Smith, 2013). هیپوکلریت سدیم در برابر همه انواع باکتری‌ها قارچ ها و ویروس‌ها مؤثر است و با استفاده از اکسید کردن مولکول‌های زیستی مانند پروتئین، میکروب‌ها را می‌کشد (Yildiz & Er, 2002). یکی از موانع تکثیر گیاه زینتی نرگس طی شرایط کشت درون شیشه ای مهار آلودگی آن می‌باشد. طبق یافته‌های پیشین، کاربرد هیپوکلریت سدیم به‌منظور بهینه‌سازی شرایط کشت درون شیشه‌ای منجر به کاهش یا حذف آلودگی در ریزنمونه‌های گیاه نرگس گردید (Yildiz & Er, 2002).

تأثیر زمان نگهداری در هیپوکلرید سدیم بر رفع آلودگی و زنده‌مانی ریزنمونه‌های پیاز لاله واژگون

طبق نتایج تجزیه واریانس داده‌ها، اثر زمان نگهداری در هیپوکلریت سدیم برای رفع آلودگی و زنده‌مانی پیاز گیاه لاله واژگون در سطح یک درصد اختلاف معنی‌دار نشان داد (جدول ۴). افزایش مدت زمان نگهداری در هیپوکلرید سدیم از ۷ به ۱۵ دقیقه منجر به افزایش ۸۷/۵۴ درصدی در مهار آلودگی پیاز لاله واژگون گردید (شکل ۴ الف). با افزایش زمان نگهداری در هیپوکلریت سدیم درصد زنده‌مانی پیازها کاهش یافت و کمترین میزان باززایی ریزنمونه‌های پیازدر زمان نگهداری به‌مدت ۱۵ دقیقه مشاهده شد، به‌طوری‌که باعث قهوه ای شدن ریزنمونه‌های پیاز گردید (شکل ۴ ب). با توجه به درصد مهار آلودگی و زنده‌مانی ریزنمونه‌ها، زمان ۱۰ و ۱۲ دقیقه موثرترین تیمار برای کاهش آلودگی و بهبود رشد و باززایی نمونه‌ها بود (شکل ۴).

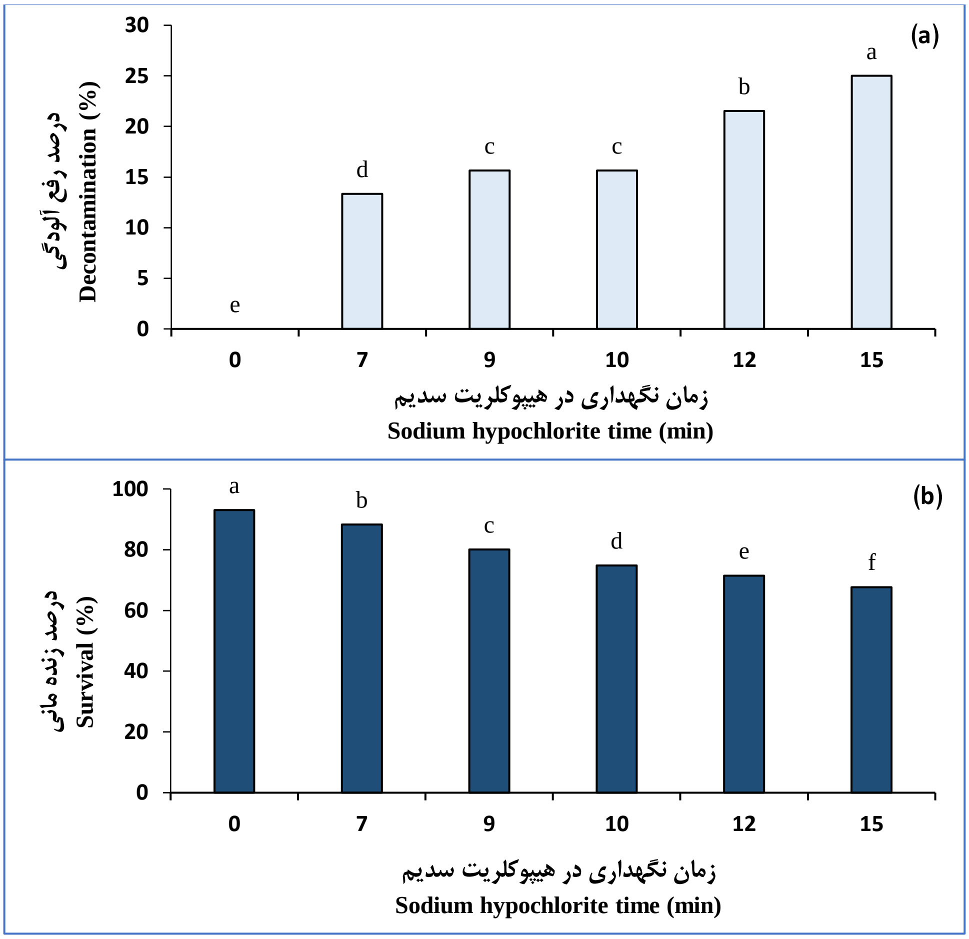
جدول ٤- تجزیه واریانس اثر زمان نگهداری در هیپوکلریت سدیم برای رفع آلودگی و زنده‌مانی ریزنمونه‌های لاله واژگون

Table 4- ANOVA for the effect of storage time in sodium hypochlorite for decontamination and survival of *Fritillaria* spp. Bulbs

منابع تغییرات S.O.V	درجه آزادی df	میانگین مربعات Mean squares رفع آلودگی Decontamination	زنده‌مانی Survival
تکرار Replication	2	0.3405	23.6538
زمان Time	5	222.9088**	291.7435**
خطا Error	10	0.3398	1.4445
ضریب تغییرات C.V (%)	-	3.82	1.51

ns، ** و * به‌ترتیب عدم معنی‌داری، معنی‌داری در سطح احتمال ۱ و ۵ درصد.

ns, ** and *: non-significant, and significant at $p \leq 0.01$ and $p \leq 0.05$, respectively.



شکل ٤- تأثیر زمان‌های مختلف تیمار هیپوکلریت سدیم برای رفع آلودگی (الف) و زنده‌مانی (ب) پیاز گیاه لاله واژگون

Figure 4- The effect of different times of sodium hypochlorite for decontamination (A) and survival (B) of *Fritillaria* spp. Bulbs. (DMRT, $p \leq 0.05$)

اندام‌هایی نظیر ریزوم، استولون و سوخ که زیر خاک تشکیل می گردند، علائم شدید آلودگی را طی مراحل کشت بافت از خود نشان می‌دهند، که با اعمال تیمارهایی نظیر غلظت‌های بالا مواد ضدعفونی‌کننده و افزایش مدت زمان اعمال تیمار ضدعفونی، می‌توان علائم آلودگی را تا حدودی کاهش داد. بااین‌حال با اعمال چنین تیمارهایی، گاهی اوقات آلودگی در سطح بالا مشاهده می‌گردد که نشان می‌دهد که قارچ‌های عامل آلودگی بدون بروز هیچ‌گونه علائم ظاهری، در داخل بافت‌های گیاهی قرار دارند که پس از کشت، این علائم ظاهر می‌شوند. بنابراین، ضروری به نظر می‌رسد که روش‌های دیگر نظر اعمال تیمار حرارتی و زمان‌ها و غلظت‌های مختلف هیپوکلریت سدیم جهت کنترل آلودگی داخلی بافت‌ها نیز مورد بررسی قرار گیرد (Kharrazi *et al*., 2016). روش مورد استفاده در گندزدایی می‌تواند تابع عوامل مختلف گیاهی یا محیطی مانند گونه گیاهی، سن، نوع ریزنمونه، میزان سمیت عامل گندزدا، نوع آلودگی، هزینه اقتصادی و شرایط محیطی حاکم بر آن باشد (Mng'omba *et al*., 2012). ترکیبات گندزدا برای بافت‌های گیاهی سمی می‌باشند و کاربرد غلظت مناسب، مدت زمان قرارگیری ریزنمونه در معرض عوامل گندزدا و ترتیب استفاده از این مواد باید برای به حداقل رساندن آسیب به بافت و حداکثر زنده‌مانی ریزنمونه‌ها بهینه‌سازی شود (Mahmoud & Al-Ani, 2016). برای ضدعفونی ریزنمونه‌ها، استفاده از الکل به اضافه هیپوکلریت سدیم عنوان بهترین تیمار ضدعفونی معرفی شده طی انجام ضدعفونی، مواد زنده گیاهی نباید فعالیت زیستی خود را از دست دهند و تنها باید آلودگی حذف گردد، بنابراین باید غلظت مواد مورد استفاده و مدت زمان اعمال تیمارهای مورد نظر به‌طور متعادل با توجه به نوع ریزنمونه تعیین گردد (Khatibzadeh *et al*., 2013).

در آزمایشی تحت عنوان تیمارهای بذر برای مدیریت بیماری باکتریایی لکه‌برگی، کاربرد هیپوکلریت سدیم با غلظت دو و پنج درصد به‌مدت ۱۵ و ۵ دقیقه در کاهو نشان داد که تیمار بذور کاهو روی کنترل آلودگی باکتریایی نسبتاً بی اثر بوده و تیمار بذور با هیپوکلریت سدیم با غلظت یک درصد برای ۱۵ دقیقه توانست آلودگی باکتریایی را به‌میزان دو درصد کاهش دهد (Pernezny *et al*., 2002).

تأثیر غلظت‌های مختلف کلرید جیوه بر رفع آلودگی و زنده‌مانی ریزنمونه‌های پیاز لاله واژگون

طبق نتایج تجزیه واریانس داده‌ها، غلظت‌های مختلف کلرید جیوه برای رفع آلودگی و زنده‌مانی پیاز گیاه لاله واژگون در سطح احتمال یک درصد اثر معنی‌داری نشان داد (جدول ۵). استفاده از غلظت‌های مختلف کلرید جیوه درصد مهار آلودگی ریزنمونه‌های پیاز لاله واژگون را در مقایسه با شاهد به‌طور معنی‌داری افزایش داد، ولی بین غلظت‌های ۰/۱ و ۰/۲ درصد کلرید جیوه تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد (شکل ۵ الف). افزایش غلظ این مهارکننده آلودگی اثر منفی بر زنده‌مانی و رشد پیازها داشت، به‌طوری‌که افزایش غلظت کلرید جیوه از ۰/۱ به ۰/۲ درصد سبب کاهش ۳۰/۲۵ درصدی زنده‌مانی ریزنمونه‌ها گردید و بالاترین درصد قهوه‌ای شدن ریزنمونه‌ها در این تیمار مشاهده شد (شکل ۵ ب). از آنجایی‌که اختلاف معنی‌داری بین تیمار ۰/۱ و ۰/۲ درصد کلرید جیوه در مهار آلودگی وجود نداشت، لذا مؤثرترین تیمار بود (شکل ۵).

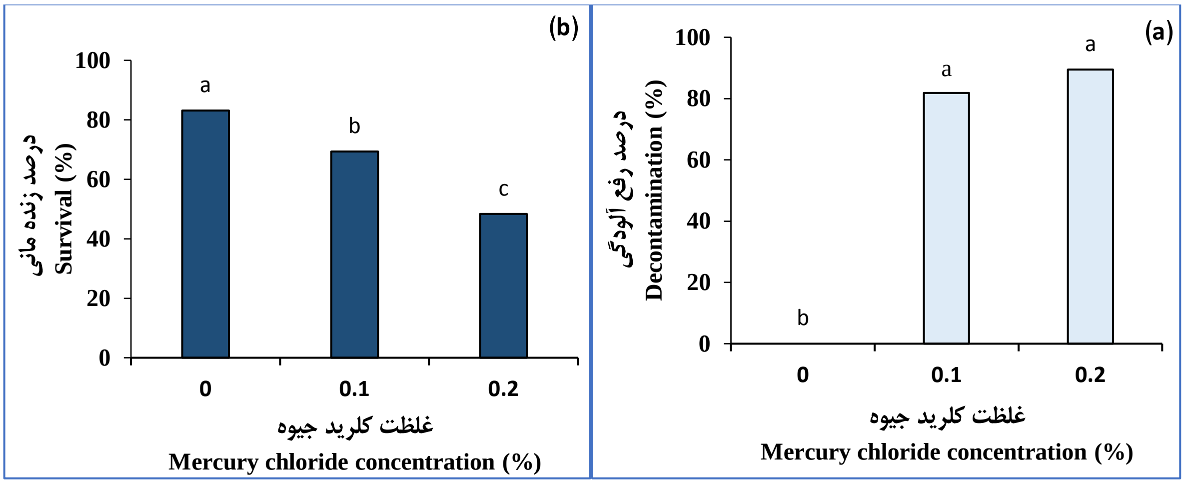
جدول ۵- تجزیه واریانس اثر غلظت‌های مختلف کلرید جیوه برای رفع آلودگی و زنده‌مانی ریزنمونه‌های پیاز لاله واژگون

Table 5- ANOVA for the effect of different concentrations of Mercury chloride for decontamination and survival of *Fritillaria* spp. Bulbs

منابع تغییرات S.O.V	درجه آزادی df	میانگین مربعات Mean squares رفع آلودگی Decontamination	 زنده‌مانی Survival
تکرار Replication	2	1.1077	10.0133
کلرید جیوه Mercury chloride	2	7373.9144**	918.4933**
خطا Error	4	1.0327	1.3266
ضریب تغییرات C.V (%)	-	1.78	1.71

ns، ** و * به‌ترتیب عدم معنی‌داری، معنی‌داری در سطح احتمال ۱ و ۵ درصد.

ns, ** and *: non-significant,and significant at $p\leq0.01$ and $p\leq0.05$, respectively.



شکل ۵- تأثیر غلظت‌های مختلف کلرید جیوه برای رفع آلودگی (الف) و زنده‌مانی (ب) ریزنمونه‌های پیاز لاله واژگون

Figure 5- The effect of different concentrations of mercuric chloride on decontamination (A) and survival (B) of *Fritillaria* spp. Bulbs. (DMRT, $p \leq 0.05$)

کلرید جیوه به‌عنوان یک ضدعفونی کننده سطحی عمدتاً همراه با هیپوکلریت سدیم استفاده می‌شود و کنترل طیف وسیعی از باکتری‌ها و قارچ‌ها را بر عهده دارد و کارایی ضدعفونی را افزایش می‌دهد. نتایج مطالعات پژوهشی نشان داده است (Alam *et al.*, 2010) که کلرید جیوه به‌طور نسبی آلودگی باکتریایی و قارچی ریزنمونه‌ها را کنترل می کند، امّا درصد زنده‌مانی ریزنمونه‌های گل نیلوفر را کاهش داد، به¬طوری‌که در یکی از ارقام باعث مرگ کامل ریزنمونه‌ها شد. به نظر می‌رسد برخی گیاهان نسبت به کلرید جیوه حساس باشند و تعیین مقدار مناسب این ماده نقش بسیار مهمی در تهیه ریزنمونه سالم و زنده دارد (Alam *et al.*, 2010). لازم به توضیح است که با افزایش میزان کلرید جیوه به‌کار رفته برای ضدعفونی از ۰/۰۳ درصد بـه ۰/۱ درصد، رشد گیاهچه‌ها کاهش یافت؛ به‌طوری‌که در تیمار ۰/۱ درصد، ریزنمونه‌ها فقط سبز شدند و به‌ندرت شاخه تولید کردند. همچنین، ریز نمونه‌هایی که در غلظت ۰/۰۳ درصد کلرید جیوه ضدعفونی شده بودند، شاخه‌هایی تولید کردند که از لحاظ ظاهری ضعیف‌تر بوده و به‌سختی ریشه تولید می‌کردند. در گل پریوش علی‌رغم کنترل کامل آلودگی ریزنمونه‌ها، تمام غلظت‌های اعمال شده باعث عدم رشد ریزنمونه‌ها شد. آزمون تترازولیوم، مرگ ریزنمونه‌ها را تأیید نمود (Sain & Sharma, 2013). گزارش‌هایی در مورد تأثیر کلریدجیوه بر مرگ ریزنمونه‌ها وجود دارد. در پژوهشی، استفاده از غلظت ۰/۱ درصد کلرید جیوه در زمان‌های متفاوت برای سنجش میزان آلودگی، زنده‌مانی و مرگ‌ومیر جوانه‌های انگور استفاده شد (Kashif, 2005). پژوهشی در گیاه آلوئه‌ورا نشان داد که بهترین روش ضدعفونی، کاربرد اتانول ۷۰ درصد به‌مدت ۶۰ ثانیه، محلول تازه کلرید جیوه ۰/۱ درصد به‌مدت یک دقیقه، با هیپوکلرید سدیم سه درصد و زمان نه دقیقه بود (Shamsian *et al.*, 2016). همچنین، کلرید جیوه ۰/۱ درصد مؤثرترین تیمار ضدعفونی در کنترل آلودگی و زنده‌مانی ریزنمونه‌های آلوئه‌ورا است (Saggoo & Kaur, 2010) که با نتایج این پژوهش همسویی دارند. در آزمایشی از کلریدجیوه ۰/۱ درصد برای کاهش آلودگی ریزنمونه حاصل از گره گیاه همیشه‌سبز چند ساله *Operculina turpethum* استفاده نموده و نتایج مثبتی از نظر کنترل آلودگی گزارش کردند. به نظر می‌رسد که در گیاه آلسترومریا غلظت بالاتر از ۰/۱ درصد باعث مرگ ریز نمونه‌ها می‌شود و استفاده از غلظت‌های کمتر و زمان‌های کوتاه‌تر می‌تواند راه حلی برای کاهش آلودگی در این گیاه می‌باشد (Alam *et al.*, 2010).

نتیجه‌گیری

کنترل آلودگی قارچی و باکتریایی، به‌خصوص در رابطه با گیاهان سوخ‌دار و پیازی که در تماس مستقیم با بستر کشت می‌باشند، یکی از مراحل اساسی در شرایط کشت درون شیشه‌ای می‌باشد. اعمال تیمارهای مختلف از جمله کاربرد تیمارهای قارچ‌کش، الکل، هیپوکلریت سدیم و کلرید جیوه در محیط کشت می‌تواند به کنترل آلودگی قارچی و باکتریایی در گیاه لاله واژگون کمک نماید. بااین‌حال، اعمال چنین تیمارهای می‌تواند تأثیر منفی بر پتانسیل باززایی ریزنمونه‌ها داشته باشد، لذا انتخاب تیمار مناسب به‌نحوی‌که باعث کنترل آلودگی قارچی و باکتریایی و از سوی دیگر، حفظ پتانسیل باززایی ریزنمونه‌ها گردد، حائز اهمیت می‌باشد. نتایج پژوهش حاضر نشان داد، با وجود آنکه کمترین درصد آلودگی در شرایط اعمال قارچ‌کش ۰/۱ درصد به‌مدت ۴۰ دقیقه، الکل ۷۰ درصد به‌مدت ۹۰ ثانیه، هیپوکلریت سدیم سه درصد به‌مدت ۱۵ دقیقه و کلرید جیوه ۰/۲ درصد به‌دست آمد؛ امّا درصد زنده‌مانی و قابلیت باززایی نمونه‌ها را به‌طور قابل‌توجهی کاهش داده و

باعث قهوه‌ای شدن ریزنمونه‌ها گردید. بر همین اساس، کاربرد قارچ-کش ۰/۱ درصد به‌مدت ۳۰ دقیقه، الکل ۷۰ درصد به‌مدت ۶۰ ثانیه، هیپوکلریت سدیم ۲ و ۲/۵ درصد به‌ترتیب به‌مدت ۱۲ و ۱۰ دقیقه و کلرید جیوه ۰/۱ درصد با کاهش درصد آلودگی و حفظ درصد زنده‌مانی ریزنمونه‌ها، توان رشد و باززایی ریزنمونه‌های پیاز لاله‌واژگون را بهبود بخشید. لذا در شرایط کشت درون شیشه‌ای، استفاده از تیمارهای ذکر شده جهت مهار آلودگی و تکثیر بهینه پیازهای گیاه لاله واژگون توصیه می‌گردد.

سپاسگزاری

تشکر و قدردانی از مسئولین محترم منابع طبیعی و اداره محیط زیست شهرستان ماهنشان که در انجام این پژوهش دانشجویی مساعدت کافی را داشته‌اند.

References

1- Abdi, G., Salehi, H., & Khosh-Khui, M. (2008). Nano silver: A novel nanomaterial for removal of bacterial contaminants in valerian (*Valeriana officinalis* L.) tissue culture. *Acta Physiologiae Plantarum*, *30*, 709-714. https://doi.org/10.1007/s11738-008-0169-z

2- Afifian, M. (2010). Identification and determination of some active ingredients of *Fritillaria imperialis* and relation of it to the habitat conditions, western area of Isfahan province. M.Sc. Thesis Natural Resources Faculty, Isfahan University of Technology, Iran.

3- Ahmadi, E., Nasr, S.M.H., Jalilvand, H., & Savadkoohi, S.K. (2012). Contamination control of microbe *Ziziphus spina* [christti] seed *in vitro* culture. *Trees*, *26*, 1299-1304. https://doi.org/10.1007/s00468-012-0705-8

4- Alam, J., Alam, I., Sharmin, S.A., Rahman, M., Anisuzzaman, M., & Alam, M.F. (2010). Micropropagation and antimicrobial activity *of Operculina turpethum'* (Syn.'*Ipomoea turpethum*'), an endangered medicinal plant. *Plant Omics*, *3*(2), 40-46.

5- Allen, T.W., Enebak, S.A., & Carey, W.A. (2004). Evaluation of fungicides for control of species of *Fusarium* on longleaf pine seed. *Crop Protection*, *23*(10), 979-982. https://doi.org/10.1016/j.cropro.2004.02.010

6- Altan, F., Bürün, B., & Sahin, N. (2010). Fungal contaminants observed during micropropagation of *Lilium candidum* L. and the effect of chemotherapeutic substances applied after sterilization. *African Journal of Biotechnology*, *9*(7), 991-995. https://doi.org/10.5897/AJB08.090

7- Barnett, J.P., & McGilvray, J.M. (2002). Reducing Seed and Seedlings Pathogens Improves Longleaf Pine Seedlings Production. *In: Gen. Tech. Rep. SRS-56. Asheville, NC: US Department of Agriculture, Forest Service, Southern Research Station. p. 19-20.*

8- Cowan, M.M. (1999). Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Aicrobiology Reviews*, *12*(4), 564-582. https://doi.org/10.1128/cmr.12.4.564

9- Eed, A.M., Reddy, S.A., Reddy, K.M., Silva, J.A.T., Reddy, P.V., Beghum, H., & Venkatsubbaiah, P.Y. (2010). Effect of antibiotics and fungicides on the *in vitro* production of *Citrus limonia* Osbeck nodal segment and shoot tip explants. *The Asian and Australasian Journal of Plant Science and Biotechnology*, *4*(1), 66-70.

10- Eslamzadeh, N., Hoseini, H., Moradi, H., & Dehkordi, F. (2009). Introduction of new habitat for the *Fritillaria*, a GIS. *Production and Processing of Agricultural and Horticultural Products Journal*, 8(16), 556-582.

11- Gholami, M. (2007*). Micropropagation of of inverted tulip (Fritillaria imperialis* L.*).* Doctoral Dissertation, M.Sc. Thesis, University of Avicenna. Hamedan, Iran.

12- Hamidoghli, S., Chamani, E., Hamidoghli, Y., & Talei, N. (2015). Effect of different plant growth regulators on direct bulblet regeneration from scale explants of *Fritillaria imperialis*. *Isfahan University of Technology Journal of Crop Production and Processing*, *5*(16), 211-218. https://doi.org/10.18869/acadpub.jcpp.5.16.211

13- Harum, N. (2013). *Surface sterilization procedures for leaves explants of rhododendron (Rhododendron javanicum (Blume) Benn) cultured in vitro*. The third Basic Science International Conference, 21, 1-4.

14- Hosseini, B., & Alizadeh, M. (2013). Effect of biomass and BAP hormone on *in vitro* regeneration of medicinal herb (*Hyssopus officinalis L.*). *Journal of Horticulture*, 27, 207-201. (In persian)

15- Karaoğlu, C., Çöcü, S., Ipek, A., Parmaksız, I., Uranbey, S., Sarıhan, E., & Khawar, K. M. (2006, October). *In vitro* micropropagation of saffron. In *II International Symposium on Saffron Biology and Technology*, *739* (223-227). https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2007.739.28

16- Kashif, M. (2005). Effect of duration of mercuric chloride treatment on culture viability, contamination and mortality of various accessions of grapes. *Sarhad Journal of Agriculture (Pakistan)*, *21*(1).

17- Kharrazi, M., Tehranifar, A., Nemati, H., & Bagheri, A. (2016). *Investigation of different methods of Amaryllis (Hippeastrum× johnsonii) culturing and propagation for increasing the proliferation rate during in vitro and greenhouse conditions* (Doctoral dissertation, Ph.D. Dissertation, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran. (In Persian).

18- Khatibzadeh, R., Azizi, M., Arouiee, H., & Farsi, M. (2013). Effects of sterilization protocol and prechilling treatment on in vitro seed germination of *Levisticum officinale Koch*. *Journal of Horticultural Science*, 27(2), 130-138. https://doi.org/10.22067/JHORTS4.V0I0.24810
19- Mahmoud, S.N., & Al-Ani, N.K. (2016). Effect of different sterilization methods on contamination and viability of nodal segments of *Cestrum nocturnum* L. *International Journal of Research Studies in Biosciences*, *4*(1), 4-9. https://doi.org/10.20431/2349-0365.0401002
20- Manole, C.G., Balan, V., Mencinicopschi, I.C., Golea, D., Rodino, S., & Butu, A. (2012). The influence of growth regulators concentrations on *in vitro* micropropagation of *Ribes rubrum species. Scientific Bulletin, Series F, Biotechnologies*, Vol. XVI, 2012. ISSN-L 2285-1364.
21- Mihaljević, I., Dugalić, K., Tomaš, V., Viljevac, M., Pranjić, A., Cmelik, Z., Puskar, B., & Jurkovic, Z. (2013). *In vitro* sterilization procedures for micropropagation of' oblacinska' sour cherry. *Journal of Agricultural Sciences*, 58, 117-126. https://doi.org/10.2298/JAS1302117M
22- Mng'omba, S.A., du Toit, E.S., Akinnifesi, F.K., & Sileshi, G. (2012). Efficacy and utilization of fungicides and other antibiotics for aseptic plant cultures. Faculty of Natural and Agricultural Sciences, University of Pretoria, Pretoria.
23- Mohammadi Deh-cheshmeh, M., Khalighi, A., & Naderi, R. (2007). Indirect somatic embryogenesis from petal explant of endangered wild population of *Fritillaria imperialis*. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, *10*(11), 1875-1879. https://doi.org/10.3923/pjbs.2007.1875.1879
24- Mohammadi Deh-cheshmeh, M., Khalighi, A., Naderi, R., Sardari, M., & Ebrahimie, E. (2008). Petal: A reliable explant for direct bulblet regeneration of endangered wild populations of *Fritillaria imperialis L. Acta Physiologiae Plantarum*, 30(3), 395-399. https://doi.org/10.1007/s11738-007-0126-2
25- Pernezny, K., Nagata, R., Raid, R.N., Collins, J., & Carroll, A. (2002). Investigation of seed treatments of management of bacterial leaf *spot of lettuce. Journal of Plant Disease*, 151-155. https://doi.org/10.1094/PDIS.2002.86.2.151
26- Reed, B.M., Buckley, P.M., & DeWilde, T.N. (1995). Detection and eradication of endophytic bacteria from micropropagated mint plants. *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant*, *31*, 53-57. https://doi.org/10.1007/BF02632228
27- Sadr, S.S., Zakizadeh, H, Naghavi, M.R., Olfati, J., & Hazrati, K. (2019). Introducing a tissue culture protocol for fritillaria (*Fritillaria raddeana*) via seed and bulb scales. *Iranian Journal of Horticultural Science*, *49*(4), https://doi.org/10.22059/ijhs.2017.230135.1219
28- Saggoo, M., & Kaur, R. (2010). Studies in North Indian *Aloe vera*: Callus induction and regeneration of plantlets. *Archives of Applied Science Research*, *2*(2), 241-245.
29- Sain, M., & Sharma, V. (2013). International journal of pure and applied bioscience *Catharanthus roseus* (an anti-cancerous drug yielding plant)—A review of potential therapeutic properties. *International Journal of Pure and Applied Bioscience*, *1*(6), 139-142.
30- Shamsian, S., Omidi, M., & Torabi, C. (2016). effect of growth regulators and active charcoal on the proliferation of *Aloe vera* L. *in vitro*. *Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants Research*, *32*, 281-289.35.
31- Silva, J.A., & Dobránszki, J. (2014). Sonication (Ultrasound) affects *in vitro* growth of hybrid cymbidium. *Botanica Lithuanica (1392-1665), 20*(2). https://doi.org/10.2478/botlit-2014-0014
32- Smith, R.H. (2013), Amsterdam Academic Press, Plant *Tissue Culture. Techniques and Experiments*. pp. 188, £54.99. ISBN 978-012-415920-4.
33- Teixeira da Silva, J.A., & Dobranszki, J. (2014). Sonication (ultrasound) affects *In vitro* growth of hybrid *Cymbidium*. *Bot Lith*, *20*, 121-130
34- Telem, R.S., Sadhukhan, R., Mandal, N., Wani, S.H., Sarkar, H.K., & Naorem, B.S. (2016). Estimating the efficiency of different explants for direct *in vitro* multiple shoots development in chrysanthemum. *International Journal of Agriculture, Environment and Biotechnology*, *9*(3), 345-352. https://doi.org/10.5958/2230-732X.2016.00045.0
35- Yildiz, M., & Er, C. (2002). The effect of sodium hypochlorite solutions on *in vitro* seedling growth and shoot regeneration of flax (*Linum usitatissimum*). *Naturwissenschaften*, *89*, 259-261. https://doi.org/10.1007/s00114-002-0310-6
36- Zamanzadeh Darban, M., & Joulii Tehrani, M. (2020) Adventurer in Zanjan book. Travel and tourism books, Shakib Publications, p. 40.
37- Zhang, L.Z., Wei, N., Wu, Q.X., & Ping, M.L. (2007). Anti-oxidant response of *Cucumis sativus* L. to fungicide carbendazim. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 89(1), 54-59. https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2007.02.007

Contents

Research Articles

Effect of Different Irrigation Intervals and Anti-transpirants Compounds on Yield and Yield Components and Oil of Black Cumin (*Nigella sativa* L.) 251
Z. Safaei, M. Azizi, Gh. Davarinejad, H. Arouiee

Effect of Different Growth Medium on Soil Properties and Physiological Traits of Hollyhocks (*Alcea rosea* L.) under Drought Stress 263
T. Oraee, M. Shoor, A. Tehranifar, S.H. Nemati, A. Oraee

Effect of Nano-Iron Chelate and Cycocel on Growth Parameters of Poinsettia 281
B. Kaviani, N. Negahdar

The Effect of Phosphate-Solubilizing Bacteria in Availability of Phosphorus from Rock Phosphate and Improving Pistachio (*Pistacia vera* L.) Seedlings Growth at Different Levels of Irrigation Water Salinity 303
F. Azarmi-Atajan, M.H. Sayyari-Zahan, A. Mirzaei

Assessments of Humic Acid Soil Application and Deficit Irrigation on Growth, Fruit Quality and Water Use Efficiency of *Physalis peruviana* L. 321
S.A.H. Mousavi, F. Nekounam, T. Barzegar, Z. Ghahremani, J. Nikbakht

Studying the Phytochemical Compounds of Ethanol and Ethyl Acetate Extracts of Three Ecotypes of *Artemisia aucheri* 339
S. Houshmand, S. Alizadeh-Salteh, S. Bolandnazar, E. Aryakia

Investigation on the Effects of Carbon Nanotubes and Kinetin on Growth and Regeneration of *Salvia nemorosa* under *in vitro* Conditions 353
Y. Pourbeyrami Hir, E. Chamani, M. Ahadzadeh, S. Shaker, R. Nabipour Sanjbod

Investigating Growth and Biochemical Responses of Marjoram (*Origanum majorana*) to Cadmium and Lead 367
M.B. Razavinia, N. Pourghasemiani, F. Najafi

Effect of Foliar Spray with Ferulic Acid and Nano-chitosan on some Quality Attributes, Phytochemical Compounds of Apple Fruit cv Red Delicious 381
S. Mostafayi, M.R. Asghari

Investigating the Effect of Chicken Manure and Potassium Sulfate on Yield and Biochemical Traits of Fenugreek Medicinal Plant 393
M.H. Aminifard, S. Nadafan, H. Bayat, M. Jahani

The Effect of Phosphate Solubilizing Bacteria on the Amount of Morphine, Papaverine, and Noscapine Alkaloids of *Papaver somniferum* L. 407
S. Samavat, M. Salehi Vozhdehnazari, M. Yahyazadeh Balalami, M. Rahimifard

Evaluation and Study of Yellow and White Onion Cultivars (*Allium cepa* L.) in the Climatic Conditions of Southern Kerman Province 419
M. Ghasemi, S. Sardouei-Nasab, G. Mohammadi-Nejad, S. Aminizadeh

Effects of Elicitors on Physiological and Phytochemical Characters of Hyssop (*Hyssopus officinalis* L. Subsp. *angustifolius* Bieb.) in Various Irrigation Conditions 431
M. Yadegari

Application of Gamma Aminobutyric Acid Treatment on Frost Damage and Antioxidant Properties of Cavendish Banana (*Musa acuminata* cv. Cavendish) during Cold Storage 451
Z. Pakkish, S. Mohajerpour, S. Saadati

The Effect of Time and Different Concentrations of Sodium Hypochlorite, Carbendazim Fungicide and Mercuric Chloride in Inhibiting the Contamination of *Fritillaria* spp. Bulbs in Tissue Culture Environment 465
L. Moradi, S.N. Mortazavi , M. Alaei

HORTICULTURAL SCIENCES

(AGRICULTURAL SCIENCES AND TECHNOLOGY)

Vol. 38 No. 2 2024

Published by: College of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Iran.

Editor in charge: Valizadeh, R. (Ruminant Nutrition) Prof. Ferdowsi University of Mashhad.

General Chief Editor: Tehranifar, A. (Horticultural Sciences) Prof. Ferdowsi University of Mashhad.

Editorial Board:

Arouiee, H.	Horticultural Sciences	Asso.Prof. Ferdowsi University of Mashhad.
Abedi, B.	Horticultural Sciences	Prof. Ferdowsi University of Mashhad.
Tehranifar,A.	Horticultural Sciences	Prof. Ferdowsi University of Mashhad.
Shoor, M.	Horticultural Sciences	Asso. Prof. Ferdowsi University of Mashhad.
Haghighi, M.	Horticultural Sciences	Asso. Prof. Isfahan University of Technology.
Hassanzadeh Mobini , S	Phytotron Facility Manager	Department of Biology, Faculty of Arts and Science, Queen's University ‹Kingston, Canada
Khanizadeh,SH.	Research Scientist	Bioproducts and Bioprocesses, Agriculture and Agri-Food Canada.
Khazaei, H	Plant Breeding	Plant Breeding, AVRDC - The World Vegetable Center.
Davarynejad, GH.	Horticultural Sciences	Prof. Ferdowsi University of Mashhad.
M. Rahemi	Horticultural Sciences	Prof. Shiraz University.
Zamani, Z.	Horticultural Sciences	Prof. University of Tehran, Iran.
Sharifani, M.M.	Horticultural Sciences	Asso.Prof. Gorgan University of Agricultural Science & Natural Resources.
Azizi, M.	Medicinal Plants	Prof. Ferdowsi University of Mashhad.
Ebadi,A.	Horticultural Sciences	Prof .Tehran University.
Fallahi,E.	Horticultural Sciences	Department of Plant Sciences, University of Idaho.
Farsi, M.	Plant Breeding and Genetics	Prof. Ferdowsi University of Mashhad.
Kafi, M.	Floriculture and landscaping	Prof .Tehran University.
Lahouti, M.	Plant Physiology	Prof. Ferdowsi University of Mashhad.
Fujii, Y.		Tokyo University of Agriculture and Technology, International Environmental and Agricultural Sciences

Publisher: Ferdowsi University of Mashhad.

Address: College of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Iran.

P.O.BOX: 91775- 1163

Tel: +98-0511- 38804621

Fax: +98-0511- 8787430

E-Mail: Jhorts4@um.ac.ir

Web Site: https://jhs.um.ac.ir

Ferdowsi University of Mashhad

Vol. 38 No. 2

2024

Journal of Horticultural Science

(Agricultural Science and Technology)

ISSN:2008-4730

Contents

Effect of Different Irrigation Intervals and Anti-transpirants Compounds on Yield and Yield Components and Oil of Black Cumin (*Nigella sativa* L.) **251**
Z. Safaei, M. Azizi, Gh. Davarinejad, H. Arouiee

Effect of Different Growth Medium on Soil Properties and Physiological Traits of Hollyhocks (*Alcea rosea* L.) under Drought Stress **263**
T. Oraee, M. Shoor, A. Tehranifar, S.H. Nemati, A. Oraee

Effect of Nano-Iron Chelate and Cycocel on Growth Parameters of Poinsettia **281**
B. Kaviani, N. Negahdar

The Effect of Phosphate-Solubilizing Bacteria in Availability of Phosphorus from Rock Phosphate and Improving Pistachio (*Pistacia vera* L.) Seedlings Growth at Different Levels of Irrigation Water Salinity **303**
F. Azarmi-Atajan, M.H. Sayyari-Zahan, A. Mirzaei

Assessments of Humic Acid Soil Application and Deficit Irrigation on Growth, Fruit Quality and Water Use Efficiency of *Physalis peruviana* L. **321**
S.A.H. Mousavi, F. Nekounam, T. Barzegar, Z. Ghahremani, J. Nikbakht

Studying the Phytochemical Compounds of Ethanol and Ethyl Acetate Extracts of Three Ecotypes of *Artemisia aucheri* **339**
S. Houshmand, S. Alizadeh-Salteh, S. Bolandnazar, E. Aryakia

Investigation on the Effects of Carbon Nanotubes and Kinetin on Growth and Regeneration of *Salvia nemorosa* under *in vitro* Conditions **353**
Y. Pourbeyrami Hir, E. Chamani, M. Ahadzadeh, S. Shaker, R. Nabipour Sanjbod

Investigating Growth and Biochemical Responses of Marjoram (*Origanum majorana*) to Cadmium and Lead **367**
M.B. Razavinia, N. Pourghasemiani, F. Najafi

Effect of Foliar Spray with Ferulic Acid and Nano-chitosan on some Quality Attributes, Phytochemical Compounds of Apple Fruit cv Red Delicious **381**
S. Mostafayi, M.R. Asghari

Investigating the Effect of Chicken Manure and Potassium Sulfate on Yield and Biochemical Traits of Fenugreek Medicinal Plant **393**
M.H. Aminifard, S. Nadafan, H. Bayat, M. Jahani

The Effect of Phosphate Solubilizing Bacteria on the Amount of Morphine, Papaverine, and Noscapine Alkaloids of *Papaver somniferum* L. **407**
S. Samavat, M. Salehi Vozhdehnazari, M. Yahyazadeh Balalami, M. Rahimifard

Evaluation and Study of Yellow and White Onion Cultivars (*Allium cepa* L.) in the Climatic Conditions of Southern Kerman Province **419**
M. Ghasemi, S. Sardouei-Nasab, G. Mohammadi-Nejad, S. Aminizadeh

Continue Content in cover