مجله علمی پژوهشی اکوفیزیولوژی گیاهی
سال سیزدهم، شماره چهل و ششم، ۱۴۰۰

دانشگاه آزاد اسلامی واحد ارسنجان

# بررسی اثر تیمارهیومیک‌اسید بر ظرفیت آنتی‌اکسیدانی، فنل و رنگیزه‌های فتوسنتزی گیاه دارویی درمنه خزری (*Artemisia annua L.*) تحت تنش شوری

آتنا محمدی نیا سماکوش[۱]، حسین مرادی[۲]، وحید اکبرپور[۳]

دریافت: ۱۴۰۰/۱۲/۲۴ پذیرش: ۱۴۰۱/۸/۲۶

**چکیده**

شوری یکی از مهم‌ترین تنش‌های غیرزیستی است که بر حسب نوع گیاه، باعث کاهش قابلیت تولید محصول می‌شود. به منظور بررسی تاثیرغلظت‌های مختلف هیومیک‌اسید بر کاهش اثرات نامطلوب شوری در گیاه درمنه‌خزری، آزمایشی گلدانی مزرعه‌ای با سه تکرار به صورت فاکتوریل در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی در دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری انجام شد. تیمارهای آزمایش شامل سه سطح هیومیک‌اسید (صفر، ۱۵۰و ۳۰۰ میلی‌گرم بر لیتر) و سه سطح شوری (NaCl آزمایشگاهی: صفر، ٤ و ٦ گرم بر لیتر) بودند. بعد از اعمال تیمارها و در مرحله رشد رویشی گیاه، نمونه‌هایی از اندام‌های هوایی تهیه و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی (DPPH)، میزان فنل (فولین سیوکالتو)، فلاونوئید (آلومینیوم‌کلرید)، رنگیزه فتوسنتزی، پرولین و زیست توده‌ی گیاه اندازه‌گیری شد. نتایج نشان داد که کاربرد هیومیک‌اسید (در غلظت ۳۰۰ میلی‌گرم بر لیتر) و شوری (به ویژه در غلظت ٦ گرم بر لیتر) به ترتیب با میانگین ۰/۱۳، ۰/۳۹، ۰/٦۱ ، ٦/۱۸ (میلی‌گرم بر گرم وزن‌تر) و ۲۰/۹۲ (میکروگرم بر میلی‌لیتر) می‌تواند در افزایش رنگیزه‌های فتوسنتزی گیاه درمنه‌خزری موثر واقع شود. استفاده از هیومیک‌اسید با غلظت ۳۰۰ میلی‌گرم بر لیتر و شوری (خصوصاً در غلظت ٤ گرم بر لیتر) به ترتیب با میانگین ۲/۳۹ (میلی‌گرم گالیک اسید در ۱۰۰ گرم) و ۰/۱۱۵ (میلی‌گرم کوئرستین در ۱۰۰ گرم) در افزایش میزان فنل و فلاونوئید تاثیر گذار بود. بیش‌ترین زیست توده‌ی اندام‌هوایی نیز در تیمار ۱۵۰ میلی‌گرم بر لیتر هیومیک‌اسید و عدم کاربرد شوری با میانگین۱۵/۵درصد مشاهده گردید. بنابراین در گیاه درمنه‌خزری هیومیک‌اسید تا حدودی می‌تواند اثرات تخریبی شوری را جبران کند، در واقع استفاده از تنش‌های غیرزیستی (تنش شوری) ، کاربرد کودهای آلی (هیومیک‌اسید) و کاربرد تلفیقی آن‌ها بر اساس غلظت مورد استفاده قادر به بهبود برخی خصوصیات مورفولوژی و بیوشیمایی در گیاه درمنه خزری بسته به هدف مورد نظر، می‌باشد.

**واژه‌های کلیدی**: فنل، فلاونوئید، تنش غیر زیستی، الیسیتور، پرولین

**محمدی نیا سماکوش، آ.، ح. مرادی و و. اکبرپور. ۱٤۰۰. بررسی اثر تیمارهیومیک‌اسید بر ظرفیت آنتی‌اکسیدانی، فنل و رنگیزه‌های فتوسنتزی گیاه دارویی درمنه خزری (*Artemisia annua L.*) تحت تنش شوری. مجله اکوفیزیولوژی گیاهی. ٤٦: ١٤-١.**

۱- دانشجوی ارشد گیاهان دارویی، دانشکده علوم زراعی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری، ایران

۲- استادیار گروه علوم باغبانی، دانشکده علوم زراعی و پژوهشکده فناوری های زیستی گیاهان دارویی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری، ایران- مسئول مکاتبات. h.moradi@sanru.ac.ir

۳- استادیار، گروه علوم باغبانی، دانشکده علوم زراعی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری، ایران

**مقدمه**

درمنه‌خزری (Artemisia annua L.)، متعلق به خانواده‌ی Asteraceae ، گیاهی یکساله ، علفی و بومی آسیا است. تحقیقات نشان داده است که درمنه‌خزری دارای خواص ضدنفخ، شکم درد، ضدانگل، مسکن دردهای گوارشی، ضدرماتیسم، فعالیت‌های ضددیابتی و ضد مالاریایی است (مونیانگی و همکاران، ۲۰۱۹؛ ایتلیما و همکاران، ۲۰۱۷؛ گوئو و همکاران، ۲۰۱۸). بیش از ۶۰۰ ماده فیتوشیمیایی به عنوان متابولیت‌های ثانویه در درمنه‌خزری شناسایی شده‌است که شامل سزکوئی‌ترپن‌ها، مونوترپن‌ها و ترکیبات فنلی مانند کومارین‌ها و فلاونوئیدها می‌شود (فاطیما و همکاران، ۲۰۲۱). آرتمیزینین، اصلی‌ترین ترکیب ترپنوئیدی است که همراه با مشتقات آن، عملکرد بیولوژیکی درمنه‌خزری را مشخص می‌کند. این ترکیب شیمیایی در ساقه، برگ‌ها و گل‌ها تولید می‌شود (لو و همکاران، ۲۰۱۹؛ لی و ژئو، ۲۰۱۰). آرتمیزینین و ترکیبات مشتق شده از آن، علاوه بر فعالیت ضدمالاریایی معمولی خود می‌توانند رادیکال‌های آزاد با واکنش‌پذیری بالا را تشکیل دهند و دارای خواص دارویی متنوعی از جمله فعالیت ضدسرطانی هستند (گائو و همکاران، ۲۰۲۰). تولید متابولیت‌های ثانویه در گیاهان‌دارویی همیشه به یک میزان صورت نمی‌گیرد و عوامل متعددی وجود دارند که می‌توانند تولید این ترکیبات را تحت تاثیر قراردهند. تنوع گونه‌ای، مراحل رشد و نموی، شرایط فصلی خاص، میزان دسترسی به مواد غذایی معدنی و شرایط تنش از جمله این عوامل هستند (آقایی و همکاران، ۲۰۱۴). شوری یکی از مهم‌ترین تنش‌های اکولوژیکی است که باعث کاهش قابلیت تولید محصول می‌شود (نریمانی و همکاران، ۲۰۲۰)، با اشاره به اینکه کشور ایران با کثرت مناطق خشک و نیمه‌خشک مواجه است درنتیجه مستعد شوری می‌باشد (فابریکی و داوودنیا، ۲۰۱۸). تنش‌های محیطی مانند شوری، یکی از مهم‌ترین عوامل کاهش عملکرد در گیاهان‌دارویی به‌شمار می‌روند. و بسته به نوع گیاه دارویی شوری از یک‌سو باعث کاهش در رشد گیاهان‌دارویی شده و از طرف دیگر کمیت و کیفیت مواد موثره آن‌ها نظیر آلکالوئیدها، گلیکوزیدها، استروئیدها و روغن‌های فرار (اسانس‌ها) را تحت تاثیر قرارمی‌دهد (دهقانی بیدگلی، ۲۰۱۹). در نتیجه به کارگیری موادی که بتواند شوری را کنترل نماید از اهمیت بالایی برای گیاه برخوردار است از جمله این مواد هیومیک‌اسید است. موادهیومیکی با گیاه سازگار بوده و هیچ‌گونه سمیتی برای گیاه ایجاد نمی‌نماید (عابدی و همکاران، ۲۰۱۰؛ تان، ۲۰۰۳). این مواد می‌تواند رشد گیاهان را با افزایش نفوذپذیری غشای سلولی و ارتقاء انتقال عناصر افزایش دهد (کانلاس و همکاران، ۲۰۱۹). این مواد به عنوان یک اسید آلی و آسکوربات و یک آنتی‌اکسیدان قوی می‌توانند در جهت بهبود عملکرد گیاهان در شرایط تنش‌شوری مؤثر واقع شوند (نریمانی و همکاران، ۲۰۲۰). کودهای‌آلی مانند هیومیک‌اسید می‌تواند باعث افزایش میزان فلاونوئید در گیاه شود. فلاونوئیدها به دلیل داشتن نقش آنتی‌اکسیدانی، به طور مستقیم با وارد شدن در واکنش‌های احیایی و یا به طور غیرمستقیم بوسیله کلات کردن آهن، مانع تنش اکسیداتیو می‌شوند (یوسفی و همکاران، ۲۰۱۴). نتایج نشان دادند که افزایش سطح تنش شوری باعث کاهش ۴۵ تا ۷۸ درصدی ماده خشک تولیدی گیاه به لیمو شد (دهقانی بیدگلی، ۲۰۱۹). آزمایشاتی را فابریکی اورنگ و همکاران (۲۰۱۸) در گیاه آویشن‌باغی بررسی نمودند و دریافتند که شوک‌های مالیم خشکی(۵۰ درصد ظرفیت مزرعه) و شوری ۱۰۰ (میلی‌مولار در لیتر سدیم‌کلرید) سبب افزایش متابولیت‌های ثانویه در این گیاه می‌شود. آفتاب و همکاران (۲۰۱۰) اثرات شوری بر رشد، سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی و تغییرات محتوای آرتمیزینین در درمنه خزری را مورد بررسی قرار دادند. تیمارهای شوری با افزودن ۰، ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ میلی‌مولار کلریدسدیم (NaCl) به خاک ایجاد شد. تنش‌شوری بر رشد گیاهان (طول ساقه، طول ریشه، وزن خشک) تأثیر منفی داشت. صفات فتوسنتزی و محتوای کلروفیل‌کل نیز با تنش شوری کاهش یافت. در بررسی بر روی گیاه درمنه‌دشتی (Artemisia sieberi alba) تجمع متابولیت‌های ثانویه مانند فنل و فلاونوئیدها و پرولین، مانیتول، اینوزیتول و سوربیتول به دلیل قرار گرفتن در معرض تنش‌های غیرزیستی (خشکی و تنش‌گرمایی) افزایش یافت. ویژگی‌های فتوسنتزی شامل سنتز کلروفیل، هدایت‌روزنه‌ای و بازده فتوسنتزی به دلیل قرار گرفتن در معرض خشکی و تنش گرمایی کاهش یافت (عباس پور و احسان پور، ۲۰۱۶). پرولین از دیگر تنظیم کننده‌های اسمزی تحت تنش‌های محیطی شوری و خشکی می‌باشد که در تعداد زیادی از گونه‌های گیاهی، همبستگی بالایی با تحمل به این تنش ایفا می‌کند. افزایش محتوای پرولین در شرایط تنش باعث محافظت غشای سلولی، پروتئین‌ها، آنزیم‌های سیتوپلاسمی، مهار گونه‌های فعال اکسیژن و حذف رادیکال‌های آزاد می‌گردد، بنابراین از جمله پاسخ‌های گیاهان در برابر تنش‌های محیطی، افزایش سطح پرولین می‌باشد (لی‌یانگ و همکاران، ۲۰۱۳). در همین راستا تنش شوری باعث افزایش میزان پرولین و همچنین غلظت ۱۵۰ میلی‌گرم بر لیتر شوری نیز به عنوان

القاکننده‌ی سنتز ترکیبات‌مهم صنعتی و دارویی در گیاه‌بابونه‌آلمانی بود (راسخ و همکاران، ۲۰۱۹). در پژوهشی دیگر استفاده از ، ۱۰کیلوگرم در هکتار هیومیکاسید و تراکم کاشت ۲۵ بوته در مترمربع، نقش موثری در افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدانی و صفات بیوشیمایی میزان فنل‌کل و فلاونوئید شنبلیله داشت (امینی فرد و قادری، ۲۰۲۰). سنجری و همکاران (۲۰۱۵) ثابت کردند که هیومیک‌اسید سبب افزایش محتوای کلروفیل‌های b،a وکاروتنوئید درگیاه چای‌ترش می‌شود. گیاه دارویی درمنه‌خزری به سبب داشتن ترکیبات ترپنوئیدی و فعالیت بالای آنتی‌اکسیدانی، اهمیت زیادی در صنعت داروسازی دارد. بنابراین افزایش کمی و کیفی ترکیبات شیمیایی، در این گیاه حائز اهمیت است، از آنجاییکه درمنه‌خزری به شوری خاک حساس می‌باشد، لذا هدف از این تحقیق تبدیل تهدید بستر کشت شور به یک فرصت برای کشت و کار این گیاه است. بطوریکه شوری در غلظت‌های مختلف به عنوان الیسیتور جهت تحریک مکانیسم دفاعی گیاه و تولید مواد موثره در نظر گرفته شد تا با استفاده از هیومیک‌اسید میزان کاهش اثرات نامطلوب شوری در صفات مختلف گیاه ارزیابی گردد.

**مواد و روش‌ها**

این پـژوهش بـه صـورت آزمایش فاکتوریل بر پایه طرح بلوک‌های کامل تصادفی با ۳ تکرار به صورت گلـدانی مزرعه‌ای در دانشگاه علوم کشـاورزی و منـابع طبیعـی ساری در سـال ۱۴۰۰-۱۳۹۹ انجـام شـد.

**مواد گیاهی:** نشاءهای درمنه‌خزری بومی منطقه (شهر شیرگاه با مختصات ۳۶ درجه و ۱۱ دقیقه تا ۳۶ درجه و ۲۲ دقیقه عرض‌شمالی و ۵۲ درجه و ۴۴ دقیقه تا ۵۲ درجه و ۵۳ دقیقه طول شرقی و ارتفاع ۲۳۸ متر از سطح دریا) تهیه شدند. نشاءهای درمنه‌خزری در فصل رویش طبیعی گیاه (آبان ۱۳۹۹) بصورت یکنواخت انتخاب و در گلدان‌های پلاستیکی با قطر دهانه‌ی ۱۴ سانتی‌متر و ارتفاع ۱۰ سانتی‌متر با بستر محتوی خاک باغچه و خاکبرگ به نسبت مساوی با حداقل دمای ۹ درجه سانتی‌گراد و حداکثر دمای ۱۰ درجه سانتی‌گراد و با میانگین دمایی ۹/۵ درجه سانتی‌گراد کشت شدند. طی این دوره، عملیات داشت شامل آبیـاری و حـذف علف هرز انجام شد. گیاهان قبل از انجام تیمار در فضای آزاد قرار داشتند و بعد از تیماردهی از اثر بارندگی با ایجاد پوشش بر روی گیاه جلوگیری شد. تیمـار هیومیک‌اسید وشوری در غلظت‌های مختلف بعد از استقرار گیاه در گلدان (ده روز) طی سه مرحله (رویشی) در گیاه اعمـال گردیـد. تیمار شوری به صورت محلول در خاک گلدان اعمال شد (با توجه به اینکه اعمال تیمار شوری بسته به نوع هدف به اشکال مختلف انجام می‌گیرد لذا در این تحقیق تیمار شوری برای گیاه دارویی مورد نظر به عنوان یک الیسیتور در نظر گرفته شد. بنابراین غلظت‌های مشخصی از شوری در تعداد دفعات مشخص و در بسترهای گلدانی یکنواخت، بصورت تیمار خاکی مورد استفاده قرار گرفت). بدین صورت که ۳روز بعد از تیمار با هیومیک‌اسید (به صورت محلول در خاک) تمامی غلظت‌های شوری (صفر، ٤ و ٦ گرم بر لیتر) به گیاهان داده شد و محول اضافی از زهکش زیر گلدان‌ها خارج گردید این عمل سه بار و به فاصله زمانی ۵ روز تکرار شد. برداشـت در زمـان قبل از گلدهی در بهمن ۱۳۹۹ صورت گرفت.

رنگیزه‌های فتوسنتزی: رنگیزه‌های فتوسنتزی با استفاده از حلال استون ۱۰۰ ٪ استخراج گردید. در این روش ۰/۱ گرم نمونه برگ تازه در هاون چینی ریخته و به آن مقدار ۵ میلی‌لیتر استون اضافه گردید. در طی این مراحل نمونه کاملا کوبیده شده سپس عصاره حاصل به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۲۵۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. از محلول هر لوله ٤ میلی‌لیتر درون کووت ریخته شد و میزان جذب نور با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر-UV Visible مدل ٦۳۰۵، شرکتJENWA، انگلستان در سه طول موج ٦٦۳، ٦٤٥ و٤٧۰ نانومتر قرائت گردید (لیکتنتالرو همکاران، ۱۹۹۹). با استفاده از اعداد به دست آمده از هر نمونه مقدار کلروفیل b،a ، کل و کاروتنوئید به ترتیب با استفاده از رابطه‌های زیر و برحسب میلی‌گرم بر گرم وزن تر محاسبه شدند (آرنون،۱۹٦۷).

$$Chla = 12.7A_{663} - 2.69A_{645} * V/1000FW$$

$$Chlb = 22.9A_{645} - 4.68A_{663} * V/1000FW$$

$$ChlT = 20.2A_{645} + 8.02A_{663} * V/1000FW$$

$$Car = 1000A_{470} + 3.27chla - 104chlb/227$$

**دی**

**پرولین:** برای اندازه گیری پرولین ابتدا ۰/۵ گرم نمونه برگ تازه برداشت گردید. سپس بافت گیاهی در هاون چینی به همراه ۱۰ میلی‌لیتر سولفوسالیسیلیک اسید سه درصد کاملا سائیده شد. و در نهایت با کاغذ صافی صاف گردید. دو میلی‌لیتر از محلول حاصل، به دو میلی‌لیتر معرف نین‌هیدرین (۱/۲۵گرم نین‌هیدرین+ ۲۰ میلی‌لیتر اسیدفسفریک ٦ مولار+۳۰ میلی‌لیتر اسید استیک گلاسیال)

و دو میلی‌لیتر اسید استیک اضافه شد وبه مدت یک ساعت در حمام آب گرم در دمای۹۰ سانتی‌گراد قرار داده شد. سپس لوله‌های محتوای محلول حاصل در یخ قرار گرفت تا سرد شدند و در ادامه به هر کدام از لوله‌ها چهار میلی‌لیتر تولوئن افزوده گردید و به مدت ۲۰ ثانیه با دستگاه ورتکس به شدت به هم زده‌شد. نمونه‌های حاصل در طول موج ۵۲۰ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر خوانده شد (بیتس، ۱۹۷۳). مقدار پرولین بر حسب میکروگرم برمیلی‌لیتر وزن تراز طریق فرمول زیر محاسبه شد.

Y=15.73X-0.546

**عصاره‌گیری اندام هوایی:** نمونه‌ها برای خشک شدن به آون با دمای ٤٥ درجه سانتی‌گراد به مدت ٤٨ ساعت قرار داده سپس با آسیاب پودر شده و برای کار در آزمایشگاه مهیا شدند. یک گرم از بافت خشک گیاه در ده میلی‌لیتر متانول به مدت ۷۲ ساعت خیسانده شد. سپس به مدت۱۰ دقیقه و در ۱۰۰۰۰دور بر دقیقه سانتریفیوژ شد (کدهیم و همکاران، ۲۰۱٦). سپس عصاره خالص برای اندازه گیری فعالیت آنتی‌اکسیدانی، فنل کل، فلاونوئیدکل مورد گرفت.

**تعیین فعالیت آنتی‌اکسیدانی کل:** برای سنجش فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌ی درمنه‌خزری از رادیکال‌های پایدار۲ و۲-دی فنیل ۱-پیکریل هیدرازیل (DPPH) استفاده شد. به ۱ میلی‌لیتر از عصاره، ۱ میلی‌لیترمحلول ۰/۱ میلی‌مولار DPPH اضافه شد و به مدت ۱۵ دقیقه در مکان تاریک قرار داده‌شد. سپس جذب محلول در طول موج ۵۱۷ نانومتر قرائت‌شد و میزان درصد مهار رادیکال آزاد آن با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد. در این فرمول، Ac جذب کنترل و As جذب نمونه می‌باشند (ابراهیم‌زاده و همکاران، ۲۰۰۹).

Inhibition (%) =[(Ac-As)___Ac]×100

**فنل کل:** به منظور بررسی محتوی تام فنلی عصاره از روش معرف فولین سیوکالتیو استفاده شد. ابتدا به ۲۰ میکرولیتر از عصاره گیاهان ۱۰۰ میکرولیتر معرف فولین – سیوکالتیو افزوده شده سپس ۱/٦ میلی‌لیتر آب مقطر اضافه کرده و ۵ دقیقه استراحت به مخلوط مورد نظر داده، در ادامه ۳۰۰ میکرولیتر کربنات‌سدیم ۱ مولار اضافه کرده و به مدت ۳۰ دقیقه در حمام آب گرم ٤٠ درجه قرارداده و در طول موج ٧٦٥ نانومتر به وسیله دستگاه اسپکتروفتومتر قرائت شده. میزان تام فنولیک بر اساس میلی‌گرم اسید گالیک درگرم عصاره از طریق فرمول زیر گزارش گردیده (اسلینکارد و همکاران، ۱۹۷۷).

Y=0.925X-0.026

**فلاونوئید کل:** برای تعیین مقدار فلاونوئیدهای کل از روش رنگ سنجی کلریدآلومینیوم استفاده شد (چانگ و همکاران، ۲۰۰۲). به نیم میلی‌لیتراز عصاره، ۱/۵ میلی‌لیتر متانول، ۰/۱ میلی‌لیتر کلریدآلومینیوم ۱۰ درصد، ۰/۱ میلی‌لیتر استات‌پتاسیم یک مولار و ۲/۸ میلی‌لیتر آب مقطر اضافه گردید. سپس در دمای اتاق به مدت ۳۰ دقیقه قرار داده شدند و جذب آن‌ها در ٤١٥ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شد. میزان فلاونوئید کل بر اساس میلی‌گرم کوئرستین برگرم بافت خشک بیان شد، و غلظت فلاونوئیدهای کل از طریق فرمول زیر محاسبه گردید:

Y=0.030X-0.002

**آنالیز آماری:** تجزیه و تحلیل آماری داده‌های به دست آمده با استفاده از نرم افزارSAS نسخه ۹/٤و مقایسه میانگین‌ها به روش آزمون دانکن در سطح احتمال پنج و یک درصد انجام شد. برای رسم نمودار از برنامه Excel استفاده گردید.

## نتایج و بحث

نتایج تجزیه واریانس نشان داد (جدول۱)، اثر متقابل هیومیک‌اسید و تنش‌شوری بر صفات مختلف درمنه‌خزری در سطح احتمال یک درصد و پنج درصد معنی‌دار می‌باشد.

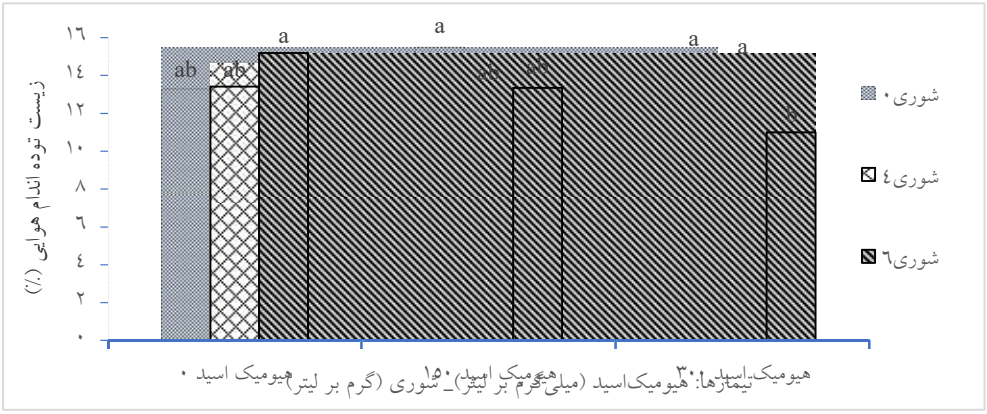
جدول ۱- تجزیه واریانس (میانگین‌مربعات) صفات مختلف گیاه‌دارویی درمنه‌خزری تحت تاثیر هیومیک اسید وتنش‌شوری

| | میانگین مربعات | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| منبع تغییرات | درجه آزادی | زیست توده اندام هوایی | کلروفیل a | کلروفیل b | کلروفیل کل | کاروتنوئید | پرولین | آنتی اکسیدان | فنل | فلاونوئید |
| هیومیک‌اسید | ۲ | ۰/٤٩٤١$^{ns}$ | ۰/۰۰۱۸$^{**}$ | ۰/۰٤٥١$^{**}$ | ۰/۱۱٦۹$^{**}$ | ۱۲/۱۱۷٥$^{**}$ | ۷۷/۷۲$^{**}$ | ۲٦۷/۹۸۰۱$^{**}$ | ۰/۰۷۸۹$^{ns}$ | ۰/۰۰٤۲$^{**}$ |
| شوری | ۲ | ٤/۷۷۷۲$^{ns}$ | ۰/۰۰۳۹$^{**}$ | ۰/۰۱۲۹$^{ns}$ | ۰/۰۲۹٥$^{ns}$ | ٤/۲۳٥۱ $^{**}$ | ۸۰/٤۳۰۳$^{**}$ | ۲۷۱/۳٤٤۲$^{**}$ | ۱/۱٥۰٥$^{**}$ | ۰/۰۰۳٦$^{**}$ |
| اثرمتقابل | ٤ | ۹/٤٥٤۳$^{**}$ | ۰/۰۰۱٦$^{**}$ | ۰/۰۲٦٥$^{**}$ | ۰/۰٤۷٥$^{**}$ | ٦/۰۱۲٦$^{**}$ | ۳۲/۱۰۷۷$^{**}$ | ۱۹۰/٥٦۳٥$^{**}$ | ۰/۳۱٤۹$^{**}$ | ۰/۰۰۱٤$^{**}$ |
| خطا | ۱٦ | ۱/۷۷٦٥ | ۰/۰۰۰۱ | ۰/۰۰٦۳ | ۰/۰۱٤٥ | ۰/۳۲٦۷ | ۱/٦٤۸۰ | ۲۷/٥۱٦۲ | ۰/۰۲۳۲۳ | ۰/۰۰۰۰٤ |
| ضریب تغییرات | | ۹/٦۳ | ۱۲/۷۹ | ۲٤/۷۱ | ۲۸/٥٤ | ۱٥/۲٤ | ۱۰/۲۳ | ۱۳/۱۹ | ۸/۰۰ | ۱۰/۷۰ |

**توده‌ی اندام هوایی**

بررسی نتایج مقایسه میانگین نشان داد که حداکثر میزان زیست توده اندام‌هوایی مربوط به تیمار هیومیک‌اسید با غلظت ۱۵۰ میلی‌گرم بر لیتر و عدم کاربرد شوری با میانگین ۱۵/۵ درصد بود که با تیمار شاهد و کاربرد مصرف تنهای شوری با غلظت ٦ گرم بر لیتر و هیومیک‌اسید با غلظت ۳۰۰ میلی‌گرم بر لیتر با میانگین به ترتیب ۱۵/۱۹ و۱۵/۰٦ از لحاظ آماری در یک گروه قرار گرفتند، کم‌ترین میزان زیست توده با میانگین ۱۱ درصد نیز مربوط به تیمار هیومیک‌اسید با غلظت ۳۰۰ میلی‌گرم بر لیتر و شوری با غلظت ٦ گرم بر لیتربود (شکل۱).

۱۰۰× وزن تر/ وزن خشک : زیست توده (بیوماس)

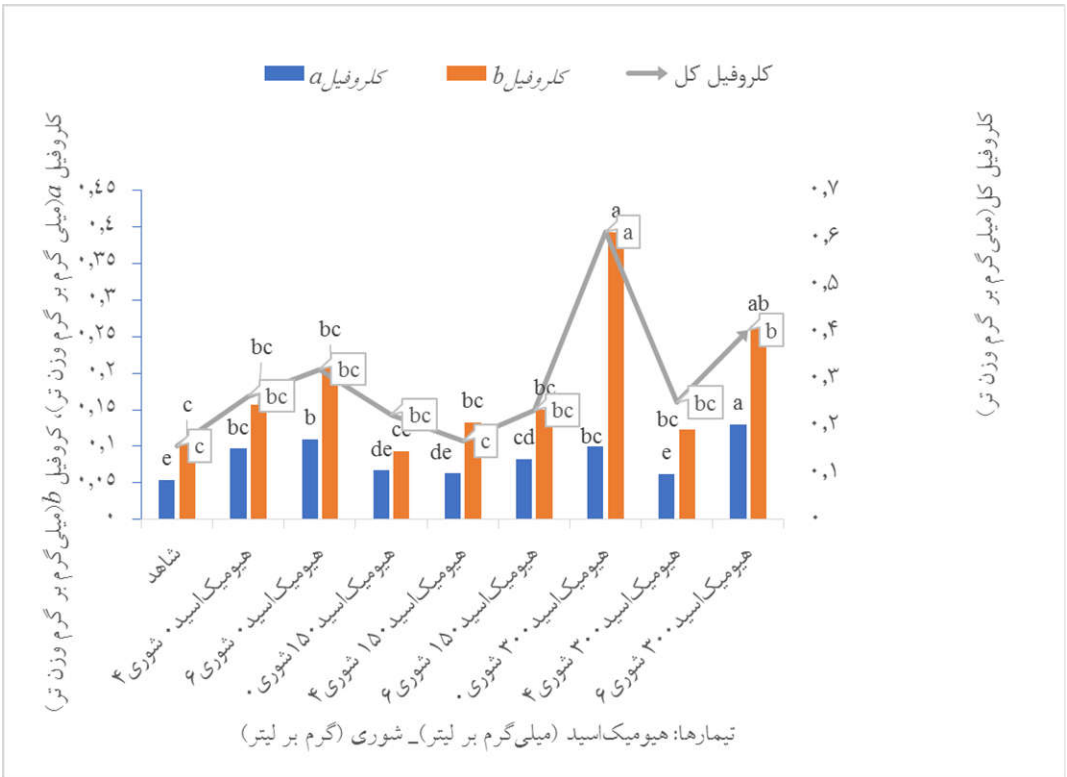



**شکل ۱- مقایسه میانگین اثرات متقابل هیومیک اسید و تنش شوری بر زیست توده اندام هوایی گیاه دارویی درمنه خزری (میانگین‌هایی که حداقل یک حروف مشترک دارند، تفاوت معنی‌داری از نظر آزمون دانکن در سطح احتمال ۵٪ ندارند).**

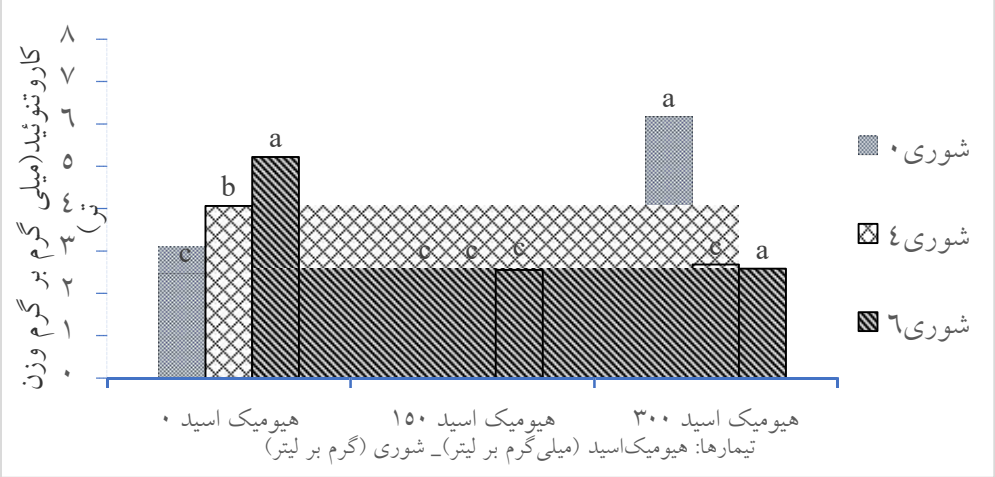
**محتوای رنگیزه‌های فتوسنتزی**

نتایج مقایسه میانگین در مورد اثر متقابل هیومیک‌اسید و شوری نشان می‌دهد که با افزایش غلظت هیومیک‌اسید و شوری مقدار محتوای کلروفیل a افزایش یافت، بیش‌ترین میزان کلروفیل a با میزان ۰/۱۳ میلی‌گرم بر گرم وزن تر، مربوط به کاربرد توام تیمار هیومیک‌اسید با غلظت ۳۰۰ میلی‌گرم بر لیتر و شوری با غلظت ٦ گرم بر لیتر بودند که اختلاف معنی‌داری با مصرف شوری با غلظت ٦ گرم بر لیتر و عدم کاربرد هیومیک‌اسید و مصرف هیومیک‌اسید ۳۰۰ میلی‌گرم بر لیتر و عدم کاربرد شوری داشتند (شکل۲). بررسی مقایسه میانگین‌ها نشان داد که در بین تیمارهای مذکور بیش‌ترین

میزان کلروفیل b (۰/۳۹ میلی‌گرم بر گرم وزن تر) در تیمار ۳۰۰ میلی‌گرم بر لیتر هیومیک‌اسید و شوری صفر حاصل شد که از لحاظ آماری با تیمار هیومیک‌اسید ۳۰۰ میلی‌گرم بر لیتر و شوری ٦ گرم بر لیتر با میانگین ۰/۲٦ میلی‌گرم بر گرم وزن‌تر اختلاف نداشتند و در یک گروه آماری قرار گرفتند و نسبت به تیمار شاهد افزایش یافتند و کم‌ترین میزان آن (۰/۰۹۳ میلی‌گرم بر گرم وزن تر) در تیمار ۱۵۰ میلی‌گرم هیومیک‌اسید و عدم کاربرد شوری مشاهده شد که از لحاظ آماری اختلاف معنی‌داری با تیمار شاهد (عدم کاربرد هیومیک‌اسید) با میزان ۰/۱۰ میلی‌گرم بر گرم وزن تر ندارد (شکل۲). بر اساس نتایج حاصل از آزمایش و مقایسه میانگین‌های مربوط به اثر متقابل تیمارهای هیومیک اسید و شوری (شکل۲)، بیش‌ترین مقدار کلروفیل‌کل در سطوح ۳۰۰ میلی‌گرم بر لیتر هیومیک اسید و عدم کاربرد شوری با میانگین ۰/٦۱ میلی‌گرم بر گرم وزن تر بدست آمد و درتیمار ۱۵۰ میلی‌گرم بر لیتر هیومیک اسید و شوری ٤ گرم بر لیتر با میانگین ۰/۱٦ میلی‌گرم بر گرم وزن‌تر کم ترین میزان کلروفیل کل مشاهده گردید که اختلاف معنی‌داری با گیاهان تیمار شاهد نداشتند. طبق جدول مقایسه میانگین بیش‌ترین میزان کاروتنوئید نسبت به تیمار شاهد به ترتیب (۵/۲۲ و٦/۱۸ میلی‌گرم بر گرم وزن تر)، متعلق به کاربرد تیمار شوری با غلظت ٦ گرم برلیترو عدم کاربرد هیومیک اسید و مصرف هیومیک‌اسید با غلظت ۳۰۰ میلی‌گرم بر لیتر و عدم کاربرد شوری بودند که از لحاظ آماری اختلاف معنی داری باهم نداشتند. کم‌ترین میزان کاروتنوئید نیز در تیمار شاهد حاصل شد که با اثرات متقابل به ترتیب هیومیک‌اسید ۳۰۰ میلی‌گرم بر لیتر و شوری ٤ گرم بر لیتر(۲/٦۸ میلی‌گرم بر گرم وزن‌تر)، هیومیک‌اسید ۱۵۰میلی‌گرم بر لیتر و شوری ٦ گرم بر لیتر (۲/۵۵ میلی‌گرم بر گرم وزن‌تر)، هیومیک‌اسید ۱۵۰ میلی‌گرم برلیتر و شوری ٤ گرم بر لیتر (۲/٤۹ میلی‌گرم بر گرم وزن‌تر) و هیومیک‌اسید ۱۵۰ میلی‌گرم برلیتر و شوری صفر (۲/٤۸ میلی‌گرم بر گرم وزن‌تر) از لحاظ آماری در یک گروه قرار گرفتند (شکل۳).



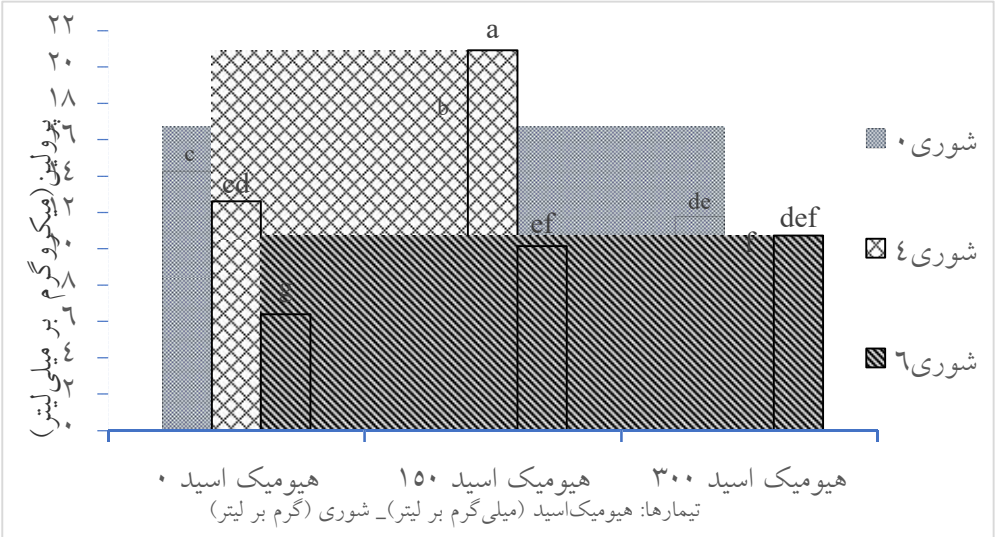

**شکل ۲- مقایسه میانگین اثرات متقابل هیومیک‌اسید و تنش شوری بر محتویات کلروفیل a، b و کل گیاه دارویی درمنه خزری (میانگین‌هایی که حداقل یک حروف مشترک دارند، تفاوت معنی‌داری از نظر آزمون دانکن در سطح احتمال ۵٪ ندارند).**




**شکل ۳- مقایسه میانگین اثرات متقابل هیومیک‌اسید و تنش شوری بر محتویات کاروتنوئید گیاه دارویی درمنه خزری (میانگین‌هایی که حداقل یک حروف مشترک دارند، تفاوت معنی‌داری از نظر آزمون دانکن در سطح احتمال ٥٪ ندارند).**

**محتوای پرولین**

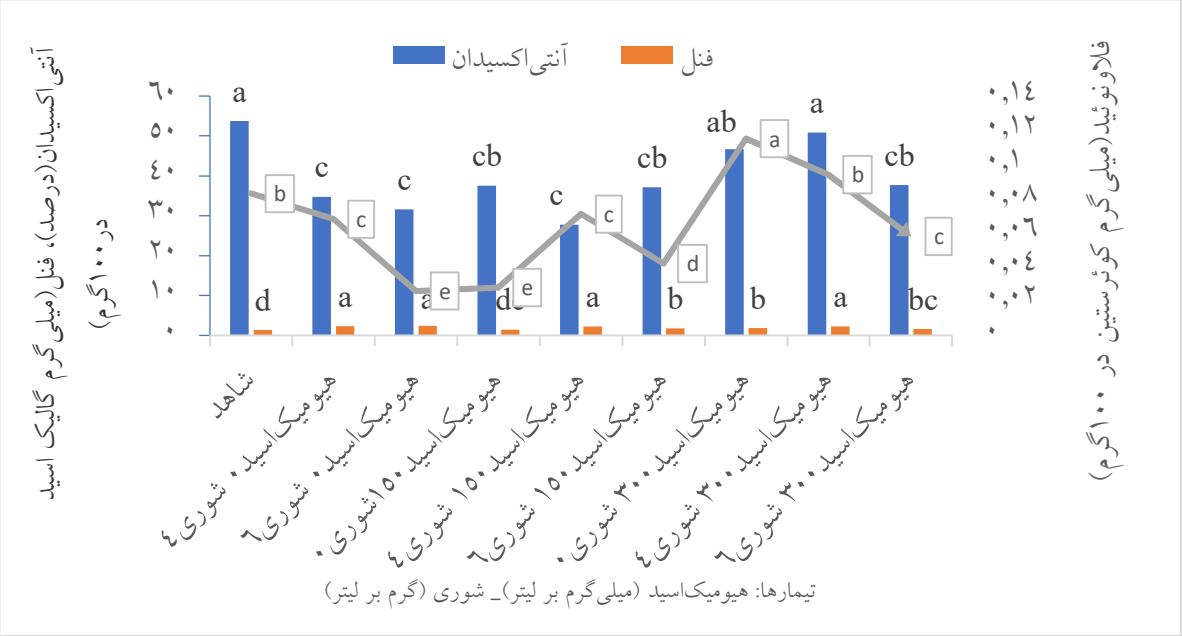
طبق نتایج مقایسه میانگین بیش‌ترین میزان پرولین در استفاده از هیومیک‌اسید ۱۵۰ میلی‌گرم بر لیتر وکاربرد شوری ٤ گرم بر لیتربا میانگین۲۰/۹۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر بدست آمد. میزان پرولین در تیمار٦ گرم بر لیتر شوری و عدم کاربرد هیومیک‌اسید با میانگین ٦/٤ میکروگرم بر میلی‌لیتر نسبت به شاهد (میانگین ١٤/٢٩ میکروگرم بر میلی‌لیتر) کاهش یافت (شکل ٤).




**شکل ٤- مقایسه میانگین اثرات متقابل هیومیک اسید و تنش شوری بر محتوای پرولین گیاه دارویی درمنه‌خزری (میانگین‌هایی که حداقل یک حروف مشترک دارند، تفاوت معنی‌داری از نظر آزمون دانکن در سطح احتمال ٥٪ ندارند).**

**محتوای آنتی اکسیدان، فنل و فلاونوئید**

نتایج مقاسیه میانگین اثر متقابل آنتی‌اکسیدان حاکی از آن است که در تیمارهای آنتی‌اکسیدان اثر مثبت هیومیک‌اسید کاملا قابل مشاهده است. به طوری که هیومیک اسید ۳۰۰ میلی‌گرم بر لیتر با وجود غلظت بالای ٤ گرم بر لیتر شوری، مقدار آنتی‌اکسیدان مشابه با شاهد در گروه اول قرار گرفت. این بدین معناست که هیومیک‌اسید توانست، با غلظت‌های بالای شوری، میزان آنتی‌اکسیدان گیاه را شبیه به گیاهانی که در شرایط نرمال رشد می‌کنند حفظ نماید. اگرچه در غلظت‌های بالاتر ٦ گرم بر لیتر شوری، باعث خسارت جدی به گیاه شد و میزان آنتی‌اکسیدان آن در گروه‌های بعدی، که به صورت معنی‌دار با گروه قبلی اختلاف دارند قرارگرفت (شکل۵). نتایج مقایسه میانگین در مورد اثر متقابل هیومیک‌اسید و شوری بر میزان فنل کل بیانگر این بود که بیش‌ترین میزان فنل به ترتیب با مقدار ۲/۳۰۸ و ۲/۳۹ میلی‌گرم گالیک‌اسید در ۱۰۰ گرم وزن خشک، مربوط به تیمار کاربرد شوری با غلظت ٤ و٦ گرم بر لیتر حاصل شد، که اختلاف معنی‌داری با مصرف تلفیقی هیومیک‌اسید با غلظت ۱۵۰ و ۳۰۰ میلی‌گرم بر لیتر و شوری با غلظت ٤ گرم بر لیتر با میزان به ترتیب ۱/۲٤و ۲/۲۰ میلی‌گرم گالیک اسید در ۱۰۰ گرم وزن خشک نداشت. این بدین معنی است که با افزایش میزان شوری و هیومیک‌اسید فنل نیز در گیاه افزایش پیدا کرده است. کم‌ترین میزان فنل در تیمار شاهد (عدم کاربرد هیومیک‌اسید و شوری) با غلظت ۱/۳۲ میلی‌گرم گالیک اسید در ۱۰۰ گرم بدست آمد، که در گروه دوم قرار می‌گیرد و از نظر آماری با سایر داده‌های گروه قبلی اختلاف معنی‌داری دارد (شکل ۵). طبق جدول مقایسه میانگین کاربرد توام هیومیک‌اسید و شوری بر میزان فلاونوئید نشان داد که هیومیک‌اسید اثر تعدیلی بر میزان شوری در گیاه داشته است، به گونه‌ای که پایین‌ترین میزان فلاونوئید با مقدار ۰/۰۲٦ میلی‌گرم کوئرستین در۱۰۰ گرم وزن خشک مربوط به عدم کاربرد هیومیک‌اسید و بالاترین غلظت شوری (غلظت ٦ گرم بر لیتر) بوده است، و حداکثر میزان فلاونوئید با میزان ۰/۱۱۵میلی‌گرم کوئرستین در ۱۰۰ گرم، مربوط به کاربرد هیومیک‌اسید با غلظت ۳۰۰ میلی‌گرم بر لیتر و عدم کاربرد شوری بود. اثر مثبت هیومیک‌اسید بر شوری در تیمار ۳۰۰ میلی‌گرم بر لیتر هیومیک‌اسید و شوری ٤ گرم بر لیتر با مقدار۰/۰۹٤ میلی‌گرم کوئرستین در ۱۰۰ گرم کاملا مشهود بود، در واقع هیومیک‌اسید توانست که میزان فلاونوئید گیاه را مانند گیاهانی که در شرایط نرمال (عدم کاربرد هیومیک‌اسید و شوری) رشد می‌کنند حفظ نماید (شکل۵).




**شکل ۵- مقایسه میانگین اثرات متقابل هیومیک‌اسید و تنش شوری بر محتوای آنتی‌اکسیدان، فنل و فلاونوئید مورد مطالعه گیاه دارویی درمنه‌خزری (میانگین‌هایی که حداقل یک حروف مشترک دارند، تفاوت معنی‌داری از نظر آزمون دانکن در سطح احتمال ۵٪ ندارند).**

نتایج حاصل از این آزمایش نشان داد که تیمار هیومیک‌اسید و تنش‌شوری بر صفات مورد مطالعه درمنه‌خزری اثر معنی‌داری داشتند (جدول۱). این تحقیق نشان‌داد در صفت بیوماس اندام‌هوایی بالاترین میزان مربوط به تیمار هیومیک‌اسید با غلظت ۱۵۰ میلی‌گرم بر لیتر و عدم تنش بود با این حال این غلظت از هیومیک‌اسید با تیمار شوری با غلظت ٦ گرم بر لیتر و عدم کاربرد هیومیک‌اسید و تیمار هیومیک‌اسید با غلظت ۳۰۰ میلی‌گرم بر لیتر و عدم کاربرد شوری و همچنین مصرف همزمان هیومیک‌اسید ۳۰۰ میلی‌گرم بر لیتر و شوری ٤ گرم بر لیتر اختلاف معنی‌داری نداشتند و از طرف دیگر تمامی این تیمارها با شاهد در یک گروه آماری قرار داشتند. پایین‌ترین میزان بیوماس نیز به تیمار هیومیک‌اسید با غلظت۳۰۰ میلی‌گرم بر لیتر و شوری با غلظت ٦ گرم بر لیتر اختصاص داشت. به طور کلی کاهش وزن در اثر تنش شوری به دلیل کاهش جذب آب و بازدارندگی محصولات فتوسنتزی و سنتز کربوهیدرات‌ها است. کاهش رشد، عمده‌ترین اثر شوری بر گیاهان است (سیتار و همکاران، ۲۰۱۷). هیومیک‌اسید از طریق تأثیرات هورمونی و با تأثیر بر متابولیسم سلول‌های گیاهی و همچنین با قدرت کلات‌کنندگی و افزایش جذب عناصر غذایی، سبب افزایش رشد بیوماس گیاهان می‌شوند (ناردی و همکاران، ۲۰۰۲). این ماده رشد گیاه را از طریق اثر مستقیم (شامل افزایش سرعت تنفس، غلظت کلروفیل و پاسخ‌های هورمونی) و غیرمستقیم (شامل اثر این ماده بر ساختارهای بیوشیمیایی خاک) بهبود می‌بخشد (کانالاس و همکاران، ۲۰۱۹؛ دی آکوینو و همکاران، ۲۰۱۹). گزارش‌های متعددی مبنی بر کاهش بیوماس گیاه تحت تنش‌شوری عنوان شده‌است. در تحقیقی روی گیاه کتان کاهش ارتفاع بخش هوایی و وزن گیاه تحت شرایط تنش شوری گزارش شده است (ملونی و همکاران، ۲۰۰٤). در تحقیق خدابخش و چاپارزاده (۱۳۹٤ ) روی گیاه شاهی (*Lepidium sativum.L*) شوری موجب افزایش میزان اکسیژن فعال گردید و وزن تر بخش‌های هوایی و ریشه‌ها را کاهش داد. در آزمایشی شریف (۲۰۱۷) گزارش کردند که وزن خشک گیاه ذرت به طور معنی‌داری در ۱۵۰ میلی‌گرم هیومیک اسید در کیلوگرم خاک افزایش یافت .نتایج حاصل از بررسی تیمارهای آزمایشی نشان داد، محلول پاشی هیومیک‌اسید و شوری میزان کلروفیل a را افزایش داده است . هیومیک‌اسید با تامین نیازهای غذایی موجودات میکروسکوپی خاک را افزایش می‌دهد. در نتیجه باعث کاهش PH خاک و افزایش جذب عناصر ریز مانند منگنز، آهن و منیزیم می‌شود که نقش مهمی در سنتز کلروفیل دارند (ایکین، ۲۰۱۹). شوری گرچه مقدار کلروفیل را به دلیل افزایش تخریب این رنگیزه‌ها و یا کاهش ساخت آن‌ها و نیز اختلال در فعالیت آنزیم‌های مسئول سنتز رنگدانه‌های فتوسنتزی کاهش می‌دهد (داوودی فرد و همکاران،۲۰۱۲)، اما گاهی اوقات نیز انتظار می‌رود باعث افزایش مقدار کلروفیل a یا b شود، یعنی با افزایش میزان شوری، مقدار کلروفیل a افزایش یابد. دلیل اصلی افزایش مقدار کلروفیلa تحت تنش شوری، در نتیجه افزایش کلروپلاست برگ است که برای حفظ فتوسنتز گیاه رخ می‌دهد و از نشانه‌های مقاومت گیاه به تنش‌های محیطی است. افزایش مقدار کلروفیل در شرایط تنش بیان کننده مقاومت گیاه در مقابل آسیب‌های نوری کلروپلاست است (آزادبخت و همکاران، ۱۳۹۷). با افزایش میزان هیومیک‌اسید کلروفیل b و کل افزایش پیدا کرده است. مهم‌ترین آثار بیولوژیک هیومیک‌اسید برموجودات زنده علاوه بر تحریک جوانه‌زنی وتحریک تجمع زیست توده در گیاهان، تحریک تجمع نیتروژن وتحریک جذب عناصر غذایی معدنی می‌باشد. در بین عناصر غذایی، نیتروژن سهم مهمی در افزایش سبزینه گیاه دارد. احتمالاً با فعال شدن فرآیندهای فیزیولوژیکی، کلروفیل‌سازی افزایش یافته که در پی آن بهبود فرایند فتوسنتز در مقایسه با شاهد اتفاق می‌افتد. با توجه به نتایج کاسر و آزم مبنی بر افزایش قابل توجه جذب نیتروژن درحضور هیومیک‌اسید، می‌توان چنین استنباط کرد که هیومیک‌اسید مورد استفاده در این پژوهش، توانسته است باعث افزایش جذب عناصر مغذی، به خصوص نیتروژن، و به دنبال آن افزایش سبزینگی گیاه شود (کاسر و آزم، ۱۹۸۵). نتایج حاصل نشان داد با افزایش میزان شوری میزان کاروتنوئید افزایش یافت. در تمامی غلظت‌های هیومیک‌اسید با افزایش غلظت شوری میزان کاروتنوئید نسبت به شاهد افزایش داشت، ولی بیش‌ترین تاثیر در تیمار هیومیک‌اسید باغلظت ۳۰۰ میلی‌گرم بر لیتر و عدم کاربرد شوری با میانگین ٦/۱۸میلی‌گرم بر گرم وزن تر حاصل شد. اصولا تنش‌های غیرزنده از جمله شوری با فتواکسیداتیو همراه می‌باشد که گیاهان مکانیسم‌های آنتی‌اکسیدانی آنزیمی و غیرآنزیمی برای مقابله با آسیب‌های اکسیداتیو ناشی از ROS دارند. آنزیم‌ها از جمله کاتالاز (CAT)، گلوتاتیون پراکسیداز و سوپراکسید دیسموتاز (SOD) هستند، که آسیب ROS را کنترل می‌کنند وبه گیاهان زراعی برای مقابله با تنش‌های محیطی متعدد از جمله تنش‌شوری کمک می‌کند (شبیر و همکاران، ۲۰۲۲). در حالی که کاروتنوئیدها،

فلاونوئیدها، گلوتاتیون و ویتامین C منابع آنتی‌اکسیدان‌های غیرآنزیمی هستند (ان سی بی ای، ۲۰۲۲). استفاده از محرک زیستی افزایش سطح کاروتنوئیدها را تعیین می‌کند که نشان دهنده فعال شدن آنزیم‌های مسئول بیوسنتز آنها است. نتایج نشان داد با افزایش شوری تا ٤ گرم بر لیتر میزان پرولین افزایش داشته ولی در تنش شوری ٦ گرم بر لیتر میزان پرولین نسبت به شاهد کاهش داشت و از مکانیسم‌های دیگر افزایش‌مقاومت استفاده کرده است . در واقع افزایش میزان پرولین به ازای افزایش میزان تنش بسته به میزان تنش دارد که معمولا تا مقدار مشخصی رابطه مستقیم دارد که در این پژوهش بیش‌ترین میزان پرولین در تیمار هیومیک‌اسید ۱۵۰میلی‌گرم‌بر لیتر و شوری ٤ گرم بر لیتر با میانگین۲۰/۹۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر و همچنین تیمار هیومیک‌اسید ۱۵۰ میلی‌گرم بر لیتر و عدم کاربرد شوری حاصل شد. اما بقیه تیمارهای هیومیک‌اسید همراه با شوری باعث کاهش پرولین نسبت به شاهد شد. هنگامی که گیاه در معرض تنش‌های محیطی مانند تنش شوری قرار می‌گیرد، تجزیه پروتئین‌ها و در نتیجه، افزایش آمینواسیدها و آمیدها تسریع می‌شود که یکی از این آمینواسیدها پرولین است (آل خطیب و همکاران، ۲۰۱۱). در بررسی بر روی سرخارگل (*Echinacea purpurea L.*) ، نتایج حاکی از آن بود که در بعضی از تیمارها، با افزایش سطوح شوری میزان کلروفیل a افزایش یافت که با نتایج بدست آمده در این پژوهش مطابقت دارد (آزادبخت و همکاران، ۲۰۲۰). نتایج مطالعه‌ای روی گیاه سورگوم، نشان داد که استفاده از هیومیک‌اسید میزان کلروفیل b و a را افزایش داد (علی و همکاران، ۲۰۲۱)، در بررسی داودی‌فرد و همکاران (۲۰۱۲) بر روی گندم گزارش کردند که مصرف هیومیک‌اسید سبب افزایش میزان کلروفیل a نسبت به شاهد شد که دلیل آن را افزایش توانایی گیاه در جذب بیشتر عنصر هیومیک‌اسید و باکتری محرک رشد عنوان کرد. فرارا و همکاران (۲۰۱۸) اعلام کردند که هیومیک‌اسید سبب افزایش میزان کلروفیل و رنگیزه های فتوسنتزی مانند کاروتنوئیدها در برگ‌ها می‌شود. مصرف تلفیقی هیومیک‌اسید با غلظت۳۰۰ میلی‌گرم بر لیتر و شوری با غلظت ٤ گرم بر لیتر با میانگین ۵۲/۸۲ درصد بیشترین میزان آنتی اکسیدان را نشان دادند اما با شاهد اختلاف معنی‌داری نداشت. بالا رفتن میزان ترکیبات آنتی‌اکسیدان در گیاهان تحت تنش تنها مکانیسم تحمل به شوری نیست، بلکه این مکانیسم می تواند در کنار ترکیبات سازگار کننده همانند پرولین و کربوهیدرات ها بر میزان تحمل گیاهان بیافزاید(ابوـ کاظم، ۲۰۰۷)، بنابراین علت اینکه شوری بر ترکیبات آنتی اکسیدانی تاثیر گذار نبوده را توجیه می‌کند. با افزایش میزان شوری فنل نیز افزایش پیدا کرد. ترکیبات فنلی نه تنها فراوان‌ترین متابولیت‌های ثانویه در قلمرو گیاهی هستند، بلکه مهم‌ترین آنتی‌اکسیدان‌ها برای از بین بردن ROS بیش از حدی هستند که توسط اکثر عوامل استرس‌زا ایجاد می‌شود، که این می‌توانند دلیل افزایش فنل را تحت تنش شوری توجیه نماید (کیانی و همکاران، ۲۰۲۱)، همچنین گزارش شده است که گیاهان نمی‌توانند به طور همزمان منابع را به رشد و دفاع اختصاص دهند و رقابت بین پرروتئین‌ها و فنل‌ها درگیاهان برای پیشسازهای معمول درگیر در بیوسنتز آن‌ها وجود دارد از سوی دیگر، اسیدهای ارگانیک (مانند هیومیک‌اسید) به عنوان پیشسازها یا فعال‌کننده‌های گیاهان‌دارویی و همچنین ترکیبات ثانویه در گیاه عمل می‌کنند و در نتیجه سبب افزایش محتوای فنل کل می‌شوند (ویتی و همکاران، ۱۹۸۹). در پژوهش بر روی گیاه گل راعی بیش‌ترین مقدار فنل در تیمار شوری متوسط ۵۰ میلی‌مولار و هیومیک‌اسید با غلظت ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر بود (رسولی و نوروزی شرف،۱٤۰۰). فلاونوئیدها نیز متابولیت‌های ثانویه هستند و نقش حیاتی در مقاومت در برابر آسیب اکسیداتیو دارند. تنش متوسط شوری می‌تواند باعث افزایش فلاونوئیدها و بهبود کیفیت محصولات زراعی و گیاهان دارویی شود (پاندی و همکاران، ۲۰۱۷). صالحی و همکاران (۱۳۸۹) در بررسی‌های خود به این نتیجه دست یافتند که، نهاده‌های اکولوژیک از طریق مکانیسم‌هایی نظیر انحلال ویتامین‌ها، ایزوآنزیم‌ها، هورمون‌ها و آنتی‌بیوتیک‌های طبیعی، سنتز آنزیم فنیل آلانین آمونیالیاز (PAL) را فعال و در نتیجه منجر به افزایش میزان فلاونوئید درگیاهان می‌شود. حداکثر میزان فلاونوئید با میزان ۰/۱۱۵ میلی‌گرم کوئرستین در ۱۰۰ گرم، مربوط به کاربرد هیومیک‌اسید با غلظت ۳۰۰ میلی‌گرم بر لیتر و عدم کاربرد شوری بود. در پژوهشی استفاده از، هیومیک‌اسید، نقش موثری در افزایش میزان فلاونوئید در گیاه شنبلیله داشت (امینی فرد و قادری، ۲۰۲۰). گزارش شده‌است که هیومیک‌اسید باعث افزایش محتوای فلاونوئیدهای جینکو بیلوبا می‌شود (پاندی و همکاران، ۲۰۱۷).

## نتیجه‌گیری

نتایج نشان داد که تیمار شوری می‌تواند بسته به غلظت مورد استفاده تا حدودی بصورت تحریک‌کننده‌ی تولید برخی از مواد موثره، در این گیاه عمل نماید. بطوری‌که شوری (به ویژه در غلظت ٦ گرم بر لیتر) می‌تواند در افزایش رنگیزه‌های فتوسنتزی گیاه

درمنه‌خزری موثر واقع شود و بیش‌ترین میزان فنل (۲/۳۹میلی‌گرم گالیک‌اسید در ۱۰۰ گرم) در تیمار شوری ٦ گرم بر لیتر و بدون هیومیک‌اسید بود. از طرف دیگر حداکثر میزان فلاونوئید (۰/۱۱۵ میلی‌گرم کوئرستین در ۱۰۰ گرم) نیز در غلظت ۳۰۰ میلی‌گرم بر لیتر هیومیک‌اسید و شوری صفر گرم بر لیتر حاصل شد. همچنین تیمار شوری و هیومیک‌اسید در میزان فنل و فلاونوئید اثر مثبت نشان دادند. بنابراین با درنظر داشتن این موضوع که درمنه خزری به شوری خاک حساس می‌باشد باید از کاشت این گیاه درخاک‌هایی با شوری بالا خودداری نمود، اما شوری با غلظت متوسط (٦-٤ گرم بر لیتر) نه تنها به گیاه آسیب وارد نمی‌کند بلکه بنظر می‌رسد می‌تواند باعث افزایش برخی از ترکیب‌های شیمیایی در این گیاه شود، و استفاده از هیومیک‌اسید با غلظت بالا (۳۰۰میلی‌گرم بر لیتر) می‌تواند برخی از اثرات منفی شوری را کاهش دهد و به مقاومت گیاه در شرایط تنش کمک کند.

## منابع


ابراهیمی، م. و ا. میری کرباسک. ۱۳۹۵. بررسی اثر اسید هیومیک بر جوانه‌زنی، رشد گیاهچه و رنگیزه‌های فتوسنتزی گیاه دارویی اسفرزه (Plantago ovata Forssk) . مجله علوم و تحقیقات بذر ایران. ۳ (۳): ٤٦-۳۵.

آزاد بخت، ف.، م. امینی‌دهقی، خ. احمدی و س. علیپور گراوند. ۱۳۹۹. تأثیر اسیدهای آلی و تنش شوری بر جوانه‌زنی بذر و خصوصیات فیزیولوژیک گیاهچه سرخارگل (*Echinacea purpurea L.*). مجله علوم و تحقیقات بذر ایران. ۷(۱): ۲۷-٤۰ .

آقایی، ک.، ن. طایی، م. کنعانی و م. یزدانی. ۱۳۹۳. اثر تنش شوری بر برخی صفات فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی دو گونه مریم گلی (Salvia). مجله فرآیند و کارکرد گیاهی. ۳(۹): ۸۵-۹٦.

امانی بنِی، م.، ع. حاتم زاده، ع. نیکبخت، م. قاسم نژاد، س. نیکخواه بهرامی و س. داورپناه. ۱۳۹٤. اثر تیمار هیومیکاسید و نانوذرات نقره در افزایش عمر پس از برداشت گل شاخه بریده مریم رقم «سینگل .«مجله گیاهان زینتی. ۳(۳): ۱۳۳-۱٤۱.

امینی فرد، م. ح. و ح. قادری زه. ۱۳۹۹. اثر سطوح مختلف اسید هیومیک و تراکم کاشت بر فعالیت آنتی اکسیدانی وخواص بیوشیمیایی گیاه دارویی (*Trigonella foenum- graecum L.*) . مجله اکوفیتوشیمی گیاهان دارویی. ۸ (۱): ۸۹-۷۷.

خدابخش، آ. و ن. چاپارزاده. ۱۳۹٤. نقش آسکوربیک‌اسید در تقلیل اثرات اکسیداتیو شوری روی گیاه شاهی. مجله پژوهش‌های گیاهی (مجله زیست شناسی ایران). ۲۸( ۱) : ۱۷۵-۱۸۵.

دهقانی بیدگلی، ر. ۱۳۹۸. بررسی امکان افزایش عملکرد فیزیولوژیکی گیاه دارویی (*Lippia citriodora L.*) با استفاده از محرک‌های زیستی در شرایط تنش شوری اکوفیتوشیمی گیاهان دارویی. ۷(۳): ۷۷-۸۸

راسخ، ف.، و. روشن، آ. وزیری و ب. خلدبرین. ۱۳۹۸. اثر تنش شوری بر ویژگی‌های فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی گیاه داروئی بابونه (*Matricaria chamomilla*). مجله پژوهش‌های گیاهی (زیست شناسی ایران). ۳۲(۳ ): ۵۸۳-۵۹۵.

سنجری میجانی، م.، ع. سیروس مهر، و ب. فاخری. ۱۳۹٤. اثر تنش خشکی و اسید هیومیک بر برخی ویژگی‌های فیزیولوژیک چای ترش (*Hibiscus sabdarifa*). مجله به زراعی کشاورزی (مجله کشاورزی پردیس ابوریحان). ۱۷(۲): ٤۰۳-٤۱٤.

صالحی، ب.، ع. باقر زاده، و م. قاسمی. ۱۳۸۹. تاثیر ماده آلی هیومیک اسید بر ویژگی‌های رشد، عملکرد و اجزای عملکرد؟ سه رقم گوجه فرنگی (*Lycopersicon esculentum L.*). بوم شناسی کشاورزی. ۲(٤): ٦٤۰-٦٤۷.

فابریکی اورنگ، ص. و ب. داودنیا. ۱۳۹۷. بررسی تغییرات صفات رشدی و متابولیت‌های ثانویه در گیاه دارویی (*Thymus vulgaris*) تحت استرس‌های ملایم شوری و خشکی. مجله اکوفیتوشیمی گیاهان دارویی. ٦(۲): ۲۷-۳۹.

موسوی، ن. س. و ر. رضوی زاده. ۱٤۰۰. بررسی تغییرات ترکیبات فنلی و متابولیت‌های ثانویه کالوس‌ها و گیاهچه‌های بادرنجبویه (. *Mellissa officinal L*) تحت تنش فلز سنگین کادمیوم. مجله فرآیند و کارکرد گیاهی ۱۰ (٤۱) : ۳٤-۱۷.

نریمانی، ر.، م. مقدم، و ع. قاسمی پیربلوطی. ۱۳۹۸. بررسی تغییرات فیتوشیمیایی اسانس گیاه دارویی (*Dracocephalum moldavica L.*) تحت تنش‌های مختلف شوری و کاربرد هیومیک و آسکوربیک اسید .مجله اکوفیتوشیمی گیاهان دارویی. ۷(٤): ۳٤-٤۸.

یوسفی، م.، ش. انتشاری، و م. سعادتمند. ۱۳۹۳. بررسی تاثیر تیمار سیلیس بر برخی خصوصیات ریخت شناختی، تشریحی و فیزیولوژیک گاوزبان ایرانی (Echium amoenum Fisch&C.A. mey). مجله روابط خاک و گیاه (علوم و فنون کشت‌های گلخانه ای). ۵(۱۸): ۸۳-۹۳.

Abbaspour, J. and A. Ehsanpour. 2016. The impact of salicylic acid on some physiological responses of Artemisia aucheri Boiss. Under in vitro drought stress. Acta Agric Slov. 107(2): 287-298.

Abedi, T. and H. Pakniyat. 2010. Antioxidant enzymes changes in response to drought stress in ten cultivars of oilseed rape (Brassica napus L.). Czech J Genet Plant Breed. 46(1): 27-34.

Ali, A. Y. A., M. E. H. Ibrahim, G. Zhou, G. Zhu, A. M. I. Elsiddig, M. S. E. Suliman and E. G. I. Salah. 2021. Interactive Impacts of Soil Salinity and Jasmonic Acid and Humic Acid on Growth Parameters, Forage Yield and Photosynthesis Parameters of Sorghum Plants. S Afr J Bot. 146: 293-303.

Azam, F. and K. A Kauser. 1983. Effect of humic acid soaking on seedling growth of wheat (Triticum aestivum L.) under different conditions. Pak J Bot. 15(1): 31-38 .

Bates, L. S., R. P. Waldren and I. D. Teare. 1973. Rapid determination of free proline for water-stress studies. Plant Soil. 39(1): 205-207.

Canellas, L. P., F. L. Olivares, N. O. Aguiar, D. L. Jones, A. Nebbioso, P. Mazzei and A. Piccolo. 2015. Humic and fulvic acids as biostimulants in horticulture. Sci Hortic. 196:15-27.

Canellas, L. P., F. L. Olivares, N. O. Canellas , P. Mazzei and A. Piccolo. 2019. Humic acids increase the maize seedlings exudation yield. Chem. Biol. Technol. Agric. 6(1): 1-14.

Chang, C. C., M. H. Yang, H. M. Wen and J. C. Chern. 2002. Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. J Food Drug Anal. 10(3): 3.

Dítě, Z., R. Šuvada, T. Tóth, P. E. Jun, V. Píš and D. Dítě. 2021. Current Condition of Pannonic Salt Steppes at Their Distribution Limit: What Do Indicator Species Reveal about Habitat Quality?. Plants. 10(3): 530.

Ebrahimzadeh, M. A., S. F. Nabavi and S. M. Nabavi. 2009. Antioxidant activity of leaves and inflorescence of Eryngium Caucasicum Trautv at flowering stage. Pharmacognosy Res. 1(6): 435-439.

Ekin, Z. 2019. Integrated use of humic acid and plant growth promoting rhizobacteria to ensure higher potato productivity in sustainable agriculture. Sustainability. 11(12): 3417.

Fatima, K., S. R. Abbas, M. Zia, S. M. Sabir, R. T. Khan, A. A. Khan and R. Zaman. (2021). Indução de metabólitos secundários no estresse de nanopartículas em cultura de calos de Artemisiaannua L. Braz J Biol. 81(2): 474-483.

Ferrara, G., A. Pacifico, P. Simeone and E. Ferrara. 2018. Preliminary study on the effects of foliar applications of humic acids on 'Italia' table grape. J. International des Sciences de la Vigne et du Vin. 42: 79-87.

Gao, F., Z. Sun, F. Kong and J. Xiao. 2020. Artemisinin-derived hybrids and their anticancer activity. Eur J Med Chem. 188: 112044.

Guo, Y., W. Fu, Y. Xin, J. Bai, H. Peng, L. Fu and H. Jiang. 2018. Antidiabetic and antiobesity effects of artemether in db/db mice. Biomed Res Int. 2018.

Itelima, J.U. 2017. Phytochemical, antimicrobial and anti-diabetic properties of Artemisia annua L. (Sage Wort) and Plectranthus neochilus Schltr. (Blue Coleus). J. Biotechnol Biomater. 7:43.

Kadhim, M. J., A. A. Sosa and I. H. Hameed. 2016. Evaluation of anti-bacterial activity and bioactive chemical analysis of Ocimum basilicum using Fourier transform infrared (FT-IR) and gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) techniques. J. pharmacognosy phytother. 8(6): 127-146 .

Kiani, R., A. Arzani and S. A. M. Mirmohammady Maibody. 2021. Polyphenols, flavonoids, and antioxidant activity involved in salt tolerance in wheat, Aegilops cylindrica and their amphidiploids. Front Plant Sci. 12: 493.

Liang, X., L. Zhang, S. K. Natarajan and D. F. Becker. 2013. Proline mechanisms of stress survival. Antioxid Redox Signal. 19(9): 998-1011.

Lichtenthaler, H. K. 1999. The 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate pathway of isoprenoid biosynthesis in plants. Annu Rev Plant Biol. 50(1): 47-65.

Munyangi, J., L. Cornet-Vernet, M. Idumbo, C. Lu, P. Lutgen, C. Perronne and P. Weathers. 2019. Artemisia annua and Artemisia afra tea infusions vs. artesunate-amodiaquine (ASAQ) in treating Plasmodium falciparum malaria in a large scale, double blind, randomized clinical trial. Phytomedicine: Phytomedicine. 57: 49.

Nardi, S., D. Pizzeghello, A. Muscolo and A. Vianello. 2002. Physiological effects of humic substances on higher plants. Soil Biol. Biochem. 34(11): 1527-1536.

National Center for Biotechnology Information 2022. PubChem Compound Summary for CID 5281224,Astaxanthin.RetrievedFebruary25,2022fromhttps://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/coan

Pandey, S., D. Fartyal, A. Agarwal, T. Shukla, D. James, T. Kaul and M. K. Reddy. 2017. Abiotic stress tolerance in plants: myriad roles of ascorbate peroxidase. Front Plant Sci. 8: 581.

Qian, Z., K. Gong, L. Zhang, J. Lv, F. Jing, Y. Wang and K. Tang. 2013. A simple and efficient procedure to enhance artemisinin content in Artemisia annua L. by seeding to salinity stress. Afr. J. Agric. Res. 1(4): i+-46 .

Shabbir, A., G. Abbas, S. A. Asad, H. Razzaq, M. Anwar-ul-Haq and M. Amjad. 2021. Effects of arsenite on physiological, biochemical and grain yield attributes of quinoa (Chenopodium quinoa Willd.): implications for phytoremediation and health risk assessment. Int J Phytoremediation. 23(9): 890-898.

Slinkard, K. and V. L. Singleton. 1977. Total phenol analysis: automation and comparison with manual methods. Am J Enol Vitic. 28(1): 49-55.

Yadav, R. K., R. S. Sangwan, F. Sabir, A. K. Srivastava and N. S. Sangwan. 2014. Effect of prolonged water stress on specialized secondary metabolites, peltate glandular trichomes, and pathway gene expression in Artemisia annua L. Plant Physiology and Biochemistry. 74: 70-83.

# Investigating the effect of humic acid treatment on antioxidant capacity, phenol and photosynthetic pigments of the medicinal plant Artemisia annua L. under salt stress

A. Mohammadi Nia Samakoush[1], H. Moradi[2], V. Akbarpour [3]

Received: 2022-3-15 Accepted: 2022-11-17

**Abstract**

Salinity is one of the most important abiotic stresses that, depending on the type of plant, reduces the ability to produce crops. In order to investigate the effect of different concentrations of Humic acid on decreasing adverse effects of salinity in the Artemisia annua plant, a field pot experiment with three replications was conducted in the form of a factorial randomized complete blocks design at Sari University of Agricultural Sciences and Natural Resources. The experimental treatments included three levels of humic acid (0, 150 and 300 mg/l) and three levels of salinity (laboratory NaCl: 0, 4 and 6 g/l). After applying the treatments and during the vegetative growth stage, samples were collected from the aerial parts, and the antioxidant capacity (DPPH), the amount of phenol (folin ciocalto), flavonoid (aluminum chloride), photosynthetic pigment, proline and plant biomass were analyzed. The results showed that the application of Humic acid (300 mg/litre) and salinity (especially at 6 g/liter) respectively with the average 0.13, 0.39, 0.61, 6/18 (mg/g fresh weight) and 20.92 (µg/ml) could effectively increase the Artemisia annua photosynthetic pigments. The use of humic acid with a concentration of 300 mg/liter and salinity (especially at a concentration of 4 g/liter) with an average of 2.39 (mg of gallic acid per 100 g) and 0.115 (mg of quercetin per 100 g), respectively, in increasing the amount of phenol and flavonoid was effective. The maximum biomass of aerial organs was observed in the treatment of 150 mg/liter of humic acid and no application of salt with an average of 15.5%. Therefore, humic acid can partially compensate for the destructive effects of salinity in Artemisia annua. Using abiotic stresses (saline stress) and organic fertilizers (Humic acid) and combining these treatments at different concentrations could improve some morphological and biochemical characteristics in Artemisia annua, depending on the intended purpose.

**Keywords**: phenol, flavonoid, abiotic stress, elicitor, proline

1- Graduate Student of Medicinal Plants, Faculty of Crop Sciences, Sari University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Sari, Iran.
2- Assistant Professor, Department of Horticulture, Faculty of Crop Sciences, Sari University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Sari, Iran
3- Assistant Professor, Department of Horticultural Sciences, Faculty of Crop Sciences, Sari University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Sari, Iran