

نوع مقاله: پژوهشی

بررسی تاثیر محلول پاشی اسید هیومیک و نانوذرات منیزیم بر خصوصیات فیزیولوژیک و عملکرد گیاه دارویی استویا (*Stevia rebaudiana* L.)

سیدمحسن سیدلر^۱، حمید مظفری (نویسنده مسئول)^{۲*}، فائزه رجبزاده^۳، بهزاد ثانی^۴، تورج رحیمی^۵

۱- دانشجوی دکتری، گروه زراعت، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرقدس، شهرقدس، ایران، m_syedlar@yahoo.com

۲- دانشیار، گروه زراعت، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرقدس، شهرقدس، ایران، h_mozafari@iau.ac.ir

۳- دانشیار، گروه زراعت، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرقدس، شهرقدس، ایران، faizehrajabzadeh@yahoo.com

۴- دانشیار، گروه زراعت، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرقدس، شهرقدس، ایران، bhz.sani@gmail.com

۵- استادیار، گروه زراعت، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرقدس، شهرقدس، ایران، rahimitouraj@iau.ac.ir

تاریخ دریافت: اردیبهشت ۱۴۰۴ تاریخ پذیرش: تیر ۱۴۰۴

Investigating the effect of foliar application of humic acid and magnesium nanoparticles on the physiological characteristics and yield of the medicinal plant *Stevia (Stevia rebaudiana* L.)

Seyyed Mohsen Seidlar¹, Hamid Mozaffari (Corresponding Author)^{2*}, Faezeh Rajabzadeh³, Behzad Sani⁴, Touraj Rahimi⁵

1- Ph.d Student, Department of Agronomy, ShQ.C., Islami Azad University, Shahr-e Qods, Iran, m_syedlar@yahoo.com

2- Associate professor, Department of Agronomy, ShQ.C., Islami Azad University, Shahr-e Qods, Iran, h_mozafari@iau.ac.ir

3- Associate professor, Department of Agronomy, ShQ.C., Islami Azad University, Shahr-e Qods, Iran, faizehrajabzadeh@yahoo.com

4- Associate professor, Department of Agronomy, ShQ.C., Islami Azad University, Shahr-e Qods, Iran, bhz.sani@gmail.com

5- Assistant Professor, Department of Agronomy, ShQ.C., Islami Azad University, Shahr-e Qods, Iran, rahimitouraj@iau.ac.ir

Received: May 2025 Accepted: July 2025

Abstract

In order to study the effect of humic acid and magnesium nanoparticles on the physiological characteristics and yield of the medicinal plant, *Stevia*, an experiment was conducted in a field located in Safadasht region in 2021 and 2022. This research was carried out as a factorial design in a randomized complete block design with three replications. The first factor included foliar application with different concentrations of humic acid (zero (control), 1 and 2 g.L⁻¹) and the second factor included foliar application with different concentrations of magnesium nanooxide (zero or control, 0.1 and 0.2 g.L⁻¹). The results of the variance analysis of traits showed that the amounts of the anthocyanins, the activity of catalase, peroxidase and superoxide dismutase enzymes, soluble sugars, carotenoids, flavonoids and leaf yield increased significantly under the influence of foliar application with humic acid and magnesium nanoparticles, while the values of the saturated water deficit, malondialdehyde, membrane permeability and hydrogen peroxide decreased significantly under the influence of the application of this element and the organic composition of humic acid. The final results showed that foliar application of *stevia* plants with a concentration of 2 g.L⁻¹ of humic acid and a concentration of 0.2 g.L⁻¹ of magnesium nanoparticles, through the improvement of physiological and biochemical traits, resulted in the highest leaf yield of *stevia* plants.

Keywords: Antioxidant, Humic acid, Magnesium Nanooxide, Organic Fertilizer, *Stevia*

Iranian Journal of Plant & Biotechnology
Summer 2025, Vol 20, No 2, Pp 62-72

چکیده

به منظور مطالعه تاثیر کاربرد اسید هیومیک و نانوذرات منیزیم بر خصوصیات فیزیولوژیک و عملکرد گیاه دارویی استویا، آزمایشی در مزرعه‌ای واقع در منطقه صفادشت و در سال‌های ۱۴۰۰ و ۱۴۰۱ انجام شد. این تحقیق به صورت فاکتوریل در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی و در سه تکرار اجرا شد. فاکتور اول شامل محلول پاشی با غلظت‌های متفاوت اسید هیومیک (صفر (شاهد)، ۱ و ۲ گرم در لیتر) و فاکتور دوم شامل محلول پاشی با غلظت‌های مختلف نانواکسید منیزیم (صفر (شاهد)، ۰/۱ و ۰/۲ گرم در لیتر) بود. نتایج حاصل از تجزیه واریانس صفات نشان داد که مقادیر صفات میزان آنتوسیانین‌ها، فعالیت آنزیم‌های کاتالاز، پراکسیداز و سوپراکسید دیسموتاز، قندهای محلول، کارتنوئیدها، فلاونوئیدها و عملکرد برگ تحت تاثیر محلول پاشی با اسید هیومیک و نانوذره منیزیم افزایش معنی‌داری یافت، در حالی که مقادیر صفات مالون دی‌آلدئید، نفوذپذیری غشاء و پراکسید هیدروژن تحت تاثیر کاربرد این عنصر و ترکیب آلی اسید هیومیک، کاهش معنی‌داری نشان داد. نتایج نهایی نشان داد که محلول پاشی گیاه استویا با غلظت ۲ گرم در لیتر اسید هیومیک و غلظت ۰/۲ گرم در لیتر نانوذره منیزیم، از طریق بهبود صفات فیزیولوژیک و بیوشیمیایی، موجب حصول بالاترین مقدار عملکرد برگ گیاه استویا شد.

کلمات کلیدی: استویا، اسید هیومیک، آنتی اکسیدان، کود آلی، نانواکسید منیزیم

فصلنامه گیاه و زیست فناوری ایران

تابستان ۱۴۰۴، دوره ۲۰، شماره ۲، صص ۶۲-۷۲

مقدمه و کلیات

گیاه استویا یک گیاه بوته‌ای، چندساله متعلق به خانواده آستراسه است که به عنوان یک شیرین‌کننده طبیعی، مکمل غذایی و محصول دارویی، تاثیر قابل‌توجهی بر اقتصاد بسیاری از کشورها دارد (Youssef *et al.*, 2021). برگ‌های گیاه استویا حاوی مقادیر زیادی از استویول است. استویول عضوی از خانواده گسترده گلیکوزیدهای دی‌ترپونوئید است که به عنوان جایگزین شیرین‌کننده‌های مصنوعی مورد استفاده قرار می‌گیرد. (Gasmalla, 2014). این گیاه در درمان دیابت، چاقی و فشار خون موثر است (Pol *et al.*, 2007). یکی از عناصر مهم در رشد و نمو گیاهان، عنصر منیزیم است. عنصر منیزیم در بیوسنتز اسیدهای نوکلئیک و پروتئین‌ها، نقل و انتقال فتواسمیلات‌ها در آوند آبکش، کنترل بیماری‌های گیاهی و در نهایت در افزایش رشد و میزان عملکرد و کیفیت محصول گیاهان نقش اساسی دارد (Le *et al.*, 2020). امروزه کاربرد نانوذرات در کشاورزی در حال گسترش است. مواد نانو ساختار به موادی گفته می‌شود که اندازه ابعاد آنها کمتر از ۱۰۰ نانومتر باشد. به طوری که این مقیاس کوچک و اتمی، موجب بروز خصوصیات و رفتارهای جالب و قابل‌توجه از قبیل تحرک بالا، خصوصیات خودکنترلی و هوشمندی در این ذرات می‌شود (Bisht and Chauhan, 2020). در مورد تاثیر عنصر منیزیم به صورت بالک و یا نانوذرات بر صفات گیاهان گزارشاتی ثبت شده است. افزایش محتوی آنتوسیانین - ها، فعالیت آنزیم‌های پراکسیداز و کاتالاز و فلاونوئیدها گیاه (Kiapour *et al.*, 2020)، افزایش مقادیر پرولین، عملکرد بیولوژیک، کلروفیل، پرولین و

فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز (Khordadi Varamin *et al.*, 2020)، کاهش نشت یونی غشا، مالون دی‌آلدئید و پراکسید هیدروژن گیاه (Siddiqui و همکاران، ۲۰۱۸). افزایش ارتفاع بوته، قندهای محلول و همچنین محتوی استویوزید گیاه استویا (Azzony and AhmedEl-Moghazy, 2019)، از تیمار محلول‌پاشی با عنصر منیزیم حاصل شد. کاربرد کودهای آلی به‌عنوان جایگزین کودهای شیمیایی، یکی از بااهمیت‌ترین مسائل تاثیرگذار بر سلامت انسان و محیط‌زیست و رویکردی پایدار برای بهره‌وری محصول می‌باشد (Bisht and Chauhan, 2020). اسید هیومیک به عنوان یکی از کودهای آلی، ترکیب قهوه‌ای مایل به سیاه رنگ، با وزن مولکولی بزرگ است که از تجزیه بقایای حیوانی، گیاهی، پیت، لیگنین و غیره تولید می‌شود و به عنوان اصلاح‌کننده برای بهبود ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی خاک و به منظور افزایش عملکرد و کیفیت محصولات گیاهان باغی و زراعی کاربرد دارد (Noroozisharaf and Kaviani, 2018). در این زمینه کاربرد اسید هیومیک تاکنون تحقیقاتی در زمینه تاثیر این ترکیب آلی بر افزایش مقادیر صفات عملکرد، کارتنوئیدها، فلاونوئیدها و میزان فعالیت آنزیم‌های کاتالاز، سوپراکسید دیسموتاز گیاه (Zaremane *et al.*, 2021)، قندهای محلول (Karakurt *et al.*, 2009)، آنتوسیانین‌ها، درصد اسانس و محتوی کلروفیل (Miri Nargesi *et al.*, 2022) و کاهش معنی‌دار نشت یونی غشاء و محتوی مالون دی‌آلدئید (Khodamoradi *et al.*, 2018)، گیاهان تحت تاثیر کاربرد اسید هیومیک صورت گرفته است. با توجه به اهمیت اقتصادی و تقاضای روزافزون

میزان عملکرد برگ استویا: به منظور سنجش میزان عملکرد برگ استویا، در زمان اوج رشد رویشی و آغاز گلدهی بوته‌های استویا، برداشت بوته‌ها با حذف اثر حاشیه و از یک مترمربع از هر کرت آزمایشی انجام شد و سپس برگ‌ها از بوته جدا گردید و در سایه خشک شدند و پس از توزین به عنوان عملکرد برگ، ثبت شد (Sana et al., 2017).

نشت یونی غشاء سلول: به منظور اندازه‌گیری نشت یونی غشاء سلول گیاه استویا، ۱۵ عدد دیسکت برگ از هر تیمار در داخل ۱۰ میلی لیتر آب دوبار تقطیر شده با هدایت الکتریکی دو میکروزیمنس بر مترمربع بر ثانیه، قرار گرفت سپس هدایت الکتریکی محلول آن اندازه‌گیری شدند. آنگاه ظروف حاوی نمونه‌ها در حمام آب جوش (۹۵ درجه سانتی‌گراد) به مدت ۱۵ دقیقه قرار داده شد. پس از سرد شدن شیشه‌ها، مجدداً هدایت الکتریکی محلول درون هر شیشه اندازه‌گیری شد و درصد نشت یونی با توجه به فرمول زیر محاسبه شد (Sairam and Srivastava, 2001).

$$CMS = 1 - (EC0/EC1) * 100$$

CMS = پایداری غشاء سلول، EC0 = هدایت الکتریکی قبل از اتوکلاو EC1 = هدایت الکتریکی بعد از اتوکلاو

قندهای محلول: برای اندازه‌گیری قندهای محلول برگ استویا، از روش فنل-اسید سولفوریک متعلق به Dubois و همکاران (۱۹۵۶) استفاده شد. بدین منظور مقدار ۱۰ میلی لیتر الکل اتانول (۹۵ درصد) به همراه ۰/۰۳ گرم از بافت برگ خشک گیاه استویا در لوله‌های درب‌دار قرار گرفت. سپس مقدار یک میلی لیتر فنل (۵ درصد) و پنج میلی لیتر اسید سولفوریک (۹۸ درصد) به نیم میلی لیتر از نمونه‌ها افزوده شد. میزان جذب نور

گیاه استویا، هدف از انجام این پژوهش، بررسی تاثیر کاربرد نانوذرات منیزیم و اسید هیومیک بر برخی صفات فیزیولوژیک، بیوشیمیایی و عملکرد گیاه استویا بود.

فرآیند پژوهش

به منظور بررسی تاثیر محلول پاشی اسید هیومیک و نانوذرات منیزیم بر صفات فیزیولوژیک و عملکرد گیاه دارویی استویا (*Stevia rebaudiana* L.)، آزمایشی به صورت فاکتوریل در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی با سه تکرار در مزرعه‌ای واقع در منطقه صفادشت و در سال‌های ۱۴۰۰ و ۱۴۰۱، اجرا شد. فاکتورهای مورد تحقیق شامل غلظت‌های مختلف هیومیک اسید (صفر، ۱ و ۲ گرم در لیتر) و محلول-پاشی با غلظت‌های مختلف نانودی‌اکسید منیزیم (صفر یا محلول پاشی با آب مقطر، ۰/۱ و ۰/۲ گرم در لیتر)، بود. عملیات آماده‌سازی زمین جهت کشت گیاه استویا با اجرای یک شخم و دو دیسک عمود برهم پیش از کاشت انجام شد. هر واحد آزمایشی شامل چهار خط کاشت به طول سه متر و با فاصله ۵۰ سانتی‌متر از یکدیگر بود. فاصله کرت‌ها از یکدیگر، ۰/۵ متر و فاصله بلوک‌ها از هم، یک متر بود. کشت بذور استویا در تاریخ ۱۵ اسفندماه سال‌های ۱۴۰۰ و ۱۴۰۱، بذور گیاه دارویی استویا در بستر پرلیت و پیت ماس به نسبت ۱:۱ انجام شد. سپس نشاء‌ها در تاریخ ۱۵ اردیبهشت به زمین اصلی منتقل و با فاصله ۲۰ سانتی-متر ب روی ردیف‌ها، کشت شدند. تیمار محلول پاشی بوته‌های استویا با اسید هیومیک و نانودی‌اکسید منیزیم، در دو مرحله استقرار بوته و ساقه‌دهی اعمال شد.

هر نمونه توسط دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۴۹۰ نانومتر اندازه‌گیری شد.

کارتونوئیدها: به‌منظور سنجش محتوی کارتونوئیدهای گیاه استویا، ۱۰۰ میلی‌گرم بافت تر این گیاه به همراه ۱۵ میلی‌لیتر نیتروژن مایع (۸۰ درصد) در یک هاون چینی خرد شد و حجم آن نیز توسط استون ۸۰ درصد، به ۱۰ میلی‌لیتر رسید و پس از سانتریفیوژ، میزان جذب عصاره در طول موج‌های ۴۷۰، ۶۴۵، ۶۶۳ نانومتر قرائت و با استفاده از فرمول زیر برحسب واحد میلی-گرم بر گرم وزن تر بافت برگ محاسبه شد (Lichtenthaler, 1987).

$$Car(x+c) = (1000 A_{Abs\ 470} - 1.82 Chl\ a - 85.02 Chl\ b) / 189$$

فلاونوئیدها: به‌منظور سنجش مقدار فلاونوئیدهای گیاه استویا، با توجه به روش Krizek و همکاران (۱۹۹۸)، ۰/۲ گرم بافت برگ گیاه استویا به همراه اتانول اسیدی (اتانول و هیدوکلرویک اسید با نسبت ۱ به ۹۹) سائیده شد. مقدار جذب عصاره هر نمونه توسط دستگاه اسپکتروفتومتر در طول‌موج ۳۰۰ نانومتر قرائت شد.

آنتوسیانین‌ها: در این پژوهش، به‌منظور سنجش محتوی آنتوسیانین‌های برگ گیاه استویا، ۰/۵ گرم از بافت تازه برگ این گیاه به همراه ۱۰ میلی‌لیتر متانول اسیدی (متانول خالص و اسید کلریدریک با نسبت ۱:۹۹) در هاون چینی سائیده شد پس از عمل سانتریفیوژ، مقدار جذب آن در طول موج ۵۵۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. مقدار ضریب خاموشی در این روش، ۳۳۰۰۰ میلی‌مولار بر سانتی‌متر بود (Wanger et al., 1979).

فعالیت آنزیم پراکسیداز: به‌منظور تعیین مقدار فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی ابتدا عصاره آنزیمی بافت برگ استخراج شد. بدین‌منظور، یک گرم بافت تر برگ استویا، در یک هاون چینی محتوی سه میلی-لیتر بافر فسفات ۵۰ میلی‌مولار با اسیدیته ۷/۲ (شامل اتیلن دی‌آمین تتراسدیک اسید یک مولار، فنیل متان سولفونیل فلورید یک میلی‌مولار و پلی‌وینیل پیرولیدون یک درصد) سائیده شد. پس از سانتریفیوژ عصاره، از محلول رویی برای مطالعه فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی استفاده شد. مقدار فعالیت آنزیم آنتی‌اکسیدانی پراکسیداز گیاه استویا، مطابق با روش Maehley و Chance (۱۹۵۴)، اندازه‌گیری شد.

بنابراین ۲۵۰ میکرولیتر از بافر فسفات‌پتاسیم، به ۲۵۰ میکرولیتر گایاکول ۱۰ میلی‌مولار (محلول در آب دو بار تقطیر)، ۳۴ میکرولیتر از پراکسید هیدروژن ۷۰ میلی‌مولار (محلول در بافر فسفات‌پتاسیم ۱۰۰ میلی‌مولار) و ۴۶۷ میکرولیتر آب مقطر استریل‌شده، اضافه گردید. پس از افزودن ۲۰ میکرولیتر از عصاره آنزیمی به آن، فعالیت آنزیم پراکسیداز در مدت زمان ۱۸۰ ثانیه و در طول موج ۴۷۰ نانومتر قرائت گردید.

فعالیت آنزیم کاتالاز: مقدار فعالیت آنزیم آنتی‌اکسیدانی کاتالاز برگ‌های گیاه استویا، مطابق با روش Aebi (۱۹۸۴)، اندازه‌گیری شد. بنابراین ابتدا ۲۵۰ میکرولیتر از بافر فسفات‌پتاسیم، به همراه ۵۰۰ میکرولیتر آب مقطر استریل و ۲۵۰ میکرولیتر از پراکسید هیدروژن ۷۰ میلی‌مولار (محلول در بافر فسفات‌پتاسیم) افزوده شد. پس از افزودن ۲۰ میکرولیتر از عصاره آنزیمی استخراج‌شده، میزان فعالیت آنزیم کاتالاز، در طول موج ۲۴۰ نانومتر و در

استفاده از فرمول زیر غلظت مالون دی آلدئید برحسب میکرومول بر گرم وزن تر، حاسبه شد.

$$MDA (\mu\text{mol/g dw}) = 6.45 (A532 - A600) - 0.56 \times A440$$

A532: جذب در طول موج ۵۳۲، A440: جذب در

طول موج ۴۴۰ و A600: جذب در طول موج ۶۰۰

تجزیه واریانس داده‌های این تحقیق، پس از اطمینان از یکنواختی داده‌ها توسط نرم‌افزار SAS (ورژن ۹.۱) صورت گرفت و مقایسه میانگین‌ها توسط آزمون حداقل تفاوت معنی‌دار انجام شد.

نتایج و بحث

در این پژوهش مشخص شد که کاربرد غلظت‌های بالاتر نانوذرات منیزیم و اسید هیومیک در مقایسه با تیمار شاهد، منجر به افزایش فعالیت سیستم آنتی‌اکسیدانی آنزیمی پراکسیداز، کاتالاز و سوپراکسید دیسموتاز و سیستم آنتی‌اکسیدانی غیر آنزیمی آنتوسیانین‌ها، کارتنوئیدها و فلاونوئیدهای گیاه استویا شده است (جدول ۱). یون‌های منیزیم، از جمله کوفاکتور و فعال‌کننده بسیاری از آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان مانند آنزیم‌های کاتالاز و پراکسیداز است (Ozgun et al., 2017) و از این طریق موجب غیرفعال شدن و حذف رادیکال‌های آزاد اکسیژن در سلول‌های گیاه می‌شوند در نتیجه تنش اکسیداتیو را در گیاه کم می‌کنند. نتایج این تحقیق با نتایج Siddiqui و همکاران (۲۰۱۸) و Khordadi Varamin و همکاران (۲۰۲۰)، مطابقت داشت. در این بررسی افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی گیاه تحت تاثیر کاربرد اسید هیومیک، احتمالاً به دلیل نقش کاربردی این ترکیب به عنوان یک آنتی‌اکسیدان و فعال‌کننده اکسین (Cordeiro et al., 2011) و یا توانایی اسید

مدت زمان ۱۸۰ قرائت و به ازای هر میلی گرم پروتئین در عصاره آنزیمی بیان شد.

فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز: به منظور سنجش فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز ترکیبات نیتروبلو تترازولیوم ۷۵ میکرومولار، اتیلن دی‌آمین تترا استیک اسید ۰/۱ میلی مولار، ریپوفلاوین ۴ میکرومولار، متیونین ۱۳ میلی مولار، به ترتیب به محلول بافر فسفات ۵۰ میلی مولار افزوده شد. پس از افزودن عصاره آنزیمی به آن، میزان جذب نمونه‌ها در طول موج ۵۶۰ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر قرائت شد (Giannopolitis and Ries, 1977).

پراکسید هیدروژن: مقدار پراکسید هیدروژن گیاه استویا با توجه به روش Huang و همکاران (۲۰۰۵)، مورد سنجش قرار گرفت. محلول تری کلرو استیک اسید یک درصد به ۰/۳ گرم از بافت خرد شده گیاه افزوده شد و پس از افزودن محلول بافر فسفات پتاسیم ۱۰ میلی مولار و یدید پتاسیم یک مولار، میزان جذب آن در طول موج ۳۹۰ نانومتر دستگاه اسپکتروفتومتر قرائت شد.

پراکسیداسیون لیپیدهای غشاء: پراکسیداسیون لیپیدهای غشاء براساس روش Popham و Novacky (۲۰۱۰) اندازه‌گیری شد. بدین منظور، یک گرم از نمونه برگ منجمد شده گیاه استویا، در دو میلی لیتر تری کلرو استیک اسید ۱۰ درصد عصاره‌گیری شدند و یک میلی لیتر تیوباریتوریک اسید ۰/۵ درصد، به هر یک از نمونه‌ها اضافه شد و در حمام آب گرم ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت و بلافاصله در حمام یخ، سرد شدند. سپس میزان مالون دی‌آلدئید، با اندازه‌گیری جذب در طول موج‌های ۴۴۰، ۵۳۲ و ۶۰۰ نانومتر و با

هیومیک به عنوان جاروبگر گونه‌های اکسیژن فعال بوده است (Bailly, 2004). نتایج این تحقیق با نتایج Zaremanesh و همکاران (۲۰۲۱) مطابقت داشت. در بافت‌های گیاهان متابولیت‌های ثانویه زیادی از مسیر فنیل پروپانویید تولید می‌شوند که شامل ترکیبات فنلی فلاونوئیدها، آنتوسیانین‌ها، تانن‌ها، هیدروکسی‌سنامیک استرها و لیگنین‌ها می‌باشند (Vogt, 2010). تیمار منیزیم باعث تشکیل کمپلکس پایدار آنتوسیانین - فلز پایدار می‌شود و در نهایت مانع تجزیه آنتوسیانین می‌شود و بدین ترتیب محتوی آنتوسیانین‌ها در تیمارهای محلول‌پاشی با منیزیم در مقایسه با تیمار شاهد، بیشتر بوده است (Cai et al., 2018). افزایش محتوی فلاونوئیدها در بوته‌های محلول‌پاشی شده استویا با منیزیم احتمالاً به دلیل نقش این عنصر به عنوان یک کاتالیزور برای مسیر بیوسنتز از مالونات استات به جدول ۱- مقایسه میانگین اثرات متقابل هیومیک اسید و نانوذرات اکسید منیزیم بر برخی صفات بیوشیمیایی و فیزیولوژیک گیاه استویا در دو سال آزمایش

استیل‌کوا از هر دو مسیر بیوسنتزی مالونیک استات و شیکیمیک اسید بوده است که در نهایت منجر به تولید ترکیبات فلاونوئیدی در گیاه شده است (Hanudin et al., 2012). نتایج این تحقیق با نتایج Kiapour و همکاران (۲۰۲۰) نیز مطابقت داشت. در این آزمایش کاربرد اسید هیومیک به طور چشمگیری بر میزان آنتوسیانین و فلاونوئیدهای گیاه استویا افزوده است. آنتوسیانین‌ها متعلق به ترکیبات فنلی هستند که گروه وسیعی از متابولیت‌های ثانویه گیاهی را تشکیل می‌دهند. احتمالاً کاربرد اسید هیومیک (مشتقات ترکیب فنلی) با افزایش سنتز پیش‌ماده آنتوسیانین (ساختار فلاونوئید) موجب افزایش مقدار این ترکیبات شده است (Aprile et al., 2019). نتایج این تحقیق با نتایج Miri Nargesi و همکاران (۲۰۲۲) و Zaremanesh و همکاران (۲۰۲۱) مطابقت داشت.

Table 1- Means comparison of the humic acid and magnesium oxide nanoparticles on the stevia plant traits in two years of experiment

اسید هیومیک (گرم در لیتر)	نانواکسید منیزیم (گرم در لیتر)	آنزیم پراکسیداز	آنزیم کاتالاز	آنزیم سوپراکسید دیسموتاز (میکرومول بر میلی‌گرم پروتئین در دقیقه)	کارتونوئیدها (میلی‌گرم بر گرم وزن تر)	آنتوسیانین‌ها (میکرومول برگرم وزن تر)	فلاونوئیدها (درصد)
۰	۹/۵۴e	۲۸/۹۱ e	۲۸۴/۰d	۰/۵۸e	۳۹/۴۸d	۰/۸۴e	۰/۸۴e
۰/۱	۱۰/۰۶de	۳۴/۸۰de	۲۹۴/۱cd	۰/۷۷d	۴۷/۹۵c	۰/۸۸de	۰/۸۸de
۰/۲	۱۱/۱۳cd	۴۶/۱۸ c	۳۰۰/۸cd	۰/۸۰c	۴۷/۴۴c	۱/۱۲cd	۱/۱۲cd
۰	۱۱/۵۵c	۴۱/۳۰cd	۲۹۵/۰cd	۰/۶۱e	۴۸/۸۸bc	۱/۰۰cde	۱/۰۰cde
۱	۱۲/۳۴c	۴۲/۰۲cd	۳۴۴/۷b	۰/۹۴ab	۴۹/۵۴bc	۱/۲۱c	۱/۲۱c
۰/۲	۱۳/۸۷b	۷۶/۰۶b	۳۴۸/۶b	۰/۹۵ab	۵۵/۱۵a	۱/۷۱b	۱/۷۱b
۰	۱۱/۵۰c	۴۴/۲۷c	۳۱۲/۹c	۰/۸۸bc	۵۲/۸۷ab	۰/۹۸cde	۰/۹۸cde
۰/۱	۱۴/۸۴ab	۸۰/۴۴b	۳۶۷/۱ab	۰/۹۳ab	۵۵/۱۷a	۱/۶۶b	۱/۶۶b
۲	۱۵/۴۱a	۹۱/۸۳a	۳۸۷/۵a	۰/۹۹a	۵۵/۴۱a	۱/۹۹a	۱/۹۹a

اعدادی که در هر ستون حداقل دارای یک حرف مشترک هستند، فاقد اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال پنج درصد می‌باشند

The numbers that have a common letter in each column are without significant difference in the probability of 5%

۶۹ بررسی تاثیر محلول پاشی اسید هیومیک و نانوذرات منیزیم بر خصوصیات فیزیولوژیک و عملکرد گیاه دارویی استویا

جدول ۲- مقایسه میانگین اثرات متقابل هیومیک اسید و نانوذرات اکسید منیزیم بر صفات گیاه استویا در دو سال آزمایش

Table 2- Means comparison of the humic acid and magnesium oxide nanoparticles on the stevia plant traits in two years of experiment

پراکسید	نانو اکسید منیزیم (گرم در لیتر)	مالون دی آلدئید (میکرومول برگرم وزن تر)	نشت یونی غشاء (میکروزیمنس بر سانتی متر)	قندهای محلول (میلی گرم بر گرم وزن خشک)	عملکرد برگ (کیلوگرم در هکتار)
۰/۴۴a	۰	۱۵/۱۹ a	۷۲/۳۵e	۷۲/۳۵e	۲۸۴/۰d
۰/۴۱b	۰/۱	۱۴/۵۲ ab	۸۸/۶۴d	۸۸/۶۴d	۲۹۴/۱cd
۰/۲۳c	۰/۲	۱۳/۱۰ c	۹۰/۴۰cd	۹۰/۴۰cd	۳۰۰/۸cd
۰/۴۲ab	۰	۱۳/۵۳bc	۷۷/۷۵e	۷۷/۷۵e	۲۹۵/۰cd
۰/۲۱c	۰/۱	۱۱/۹۱de	۱۰۰/۶۵b	۱۰۰/۶۵b	۳۴۴/۷b
۰/۱۸d	۰/۲	۱۱/۳۹e	۱۱۲/۷۲a	۱۱۲/۷۲a	۳۴۸/۶b
۰/۲۲c	۰	۱۲/۶۸ cd	۹۷/۵۹bc	۹۷/۵۹bc	۳۱۲/۹c
۰/۱۸d	۰/۱	۱۱/۴۳e	۱۰۴/۷۲ab	۱۰۴/۷۲ab	۳۶۷/۱ab
۰/۱۴e	۰/۲	۸/۰۰f	۱۱۰/۲۰a	۱۱۰/۲۰a	۳۸۶/۵a

اعدادی که در هر ستون حداقل دارای یک حرف مشترک هستند، فاقد اختلاف معنی دار در سطح احتمال پنج درصد می باشند

The numbers that have a common letter in each column are without significant difference in the probability of 5%

کاربرد غلظت های بالاتر اسید هیومیک و نانوذره منیزیم به طور معنی دار، از مقدار مالون دی آلدئید، پراکسید هیدروژن و میزان نشت یونی غشاء این گیاه کاسته است. در حالی که تیمار شاهد حاوی بیشترین مقادیر این صفات بود (جدول ۲). در شرایط تنش خشکی، رادیکال های آزاد اکسیژن تولید و موجب تخریب سلول و ملکول های زیستی می شوند لذا برای مقابله با اثرات منفی آن ها، آنتی اکسیدان های آنزیمی و غیر آنزیمی به عنوان سد دفاعی گیاه، از تجمع پراکسید هیدروژن در سلول، جلوگیری می کند (Ojaq et al., 2020). در حقیقت با کاهش عنصر منیزیم به عنوان عنصر مغذی گیاه، رادیکال های آزاد اکسیژن در گیاه تولید شده و در نتیجه گیاه دچار تنش اکسیداتیو می شود (Miao et al., 2010). رادیکال های آزاد اکسیژن، موجب تخریب ترکیب های مهم سلول مانند اسیدهای چرب غیر اشباع، پروتئین ها و اسیدهای نوکلئیک می شوند و با چنین واکنشی در سلول، خصوصیات و ویژگی های طبیعی سلول مانند سیالیت غشاها، نقل و انتقال یونی در سلول، فعالیت آنزیم ها و ستر پروتئین ها مختل شده و به دنبال آن منجر به مرگ سلول گیاه می شوند (Sharma et al., 2012). با توجه به اینکه مقادیر آنزیم های آنتی اکسیدان ها در تیمارهایی که مقدار کافی عنصر منیزیم را به صورت نانوذرات دریافت کرده اند، افزایش می یابد. بنابراین پراکسید هیدروژن توسط آنزیم های کاتالاز و پراکسیداز به آب تغییر هویت داده و بدین طریق مقادیر ترکیبات مضر مالون دی آلدئید و پراکسید هیدروژن و در نتیجه نشت الکترولیت ها کاهش می یابد (Mittler, 2002). نتایج

این تحقیق با نتایج Siddiqui و همکاران (۲۰۱۸)، مطابقت داشت. با توجه به نتایج تحقیقات Ashraf و Foolad (۲۰۰۷) در این پژوهش، محلول پاشی گیاه استویا با ترکیب اسید هیومیک به دلیل افزایش سطح ترکیبات فنلی، آنتی اکسیدان های آنزیمی و غیر آنزیمی و پرولین، موجب کاهش ترکیبات مضر مالون دی-آلدئید، پراکسید هیدروژن و نشت یونی غشاء شده است. نتایج این تحقیق با نتایج Khodamoradi و همکاران (۲۰۱۸) مطابق بود. در این پژوهش محلول-پاشی با غلظت های بالاتر هیومیک اسید و نانوذره منیزیم در مقایسه با عدم کاربرد این ترکیبات، منجر به افزایش معنی دار محتوی قندهای محلول در بوته های گیاه استویا شده است (جدول ۲). علت این افزایش احتمالا به دلیل نقش منیزیم در فعال سازی آنزیم ها، سنتز قند، کنترل جذب مواد مغذی و سایر فرآیندها باشد (Azzony and AhmedEl-Moghazy, 2019). نتایج این تحقیق با تحقیق Karakurt و همکاران (۲۰۰۹) مطابقت داشت. کاربرد برگ گیاه استویا به نانو ذرات منیزیم و هیومیک اسید نسبت به تیمار شاهد، منجر به افزایش عملکرد برگ گیاه استویا شد. همچنین تفاوت بین غلظت های مختلف کاربرد این ترکیبات نیز معنی دار بود (جدول ۲). احتمالا نانو ذرات منیزیم با افزایش محتوی کلروفیل، میزان فتوسنتز و فتواسمیلات های تولیدی و با ممانعت از پیری برگ ها، موجب تقویت قدرت منبع و در نتیجه افزایش عملکرد برگ این گیاه شده است (Jamali Jaghdani et al., 2021). نتایج این تحقیق با نتایج Khordadi Varamin و همکاران (۲۰۲۰) و Kiapour و همکاران (۲۰۲۰) مطابق بود. در این پژوهش اسید هیومیک نیز احتمالا

با افزایش جذب عناصر میکرو و ماکروبی در دسترس گیاه، پروتئین، ویتامین ها و تنظیم کننده های رشد از جمله اکسین و سیتوکینین، موجب افزایش عملکرد گیاه استویا شده است (Jan et al., 2020). نتایج این تحقیق با نتایج Zaremanesh و همکاران (۲۰۲۱) مطابق بود. همچنین Khorasani و همکاران (۲۰۲۳) اعلام کردند کاربرد اسید هیومیک با افزایش راندمان جذب مواد مغذی به ویژه نیتروژن و آهن موجب بهبود بازدهی فتوسنتز و در نتیجه افزایش عملکرد می شوند.

نتیجه گیری کلی

محلول پاشی گیاه استویا با غلظت های مختلف اسید هیومیک و نانو اکسید منیزیم، با افزایش فعالیت آنتی اکسیدان های آنزیمی و غیر آنزیمی، کاهش رادیکال های آزاد اکسیژن و افزایش پایداری غشاء، موجب افزایش مقدار عملکرد این گیاه دارویی در مقایسه با تیمار عدم کاربرد این ترکیب آلی و نانوذره منیزیم شده است و غلظت ۲ گرم در لیتر اسید هیومیک و غلظت ۰/۲ درصد نانوذره منیزیم، به عنوان بهترین غلظت های تیمارهای مورد پژوهش برای افزایش عملکرد برگ این گیاه دارویی مشخص شدند.

منابع

- 1) Aebi, H.E. 1983. Catalase. In: Bergmeyer, H.U. Editors. Methods of Enzymatic Analysis. Verlag Chemie, Weinheim, pp. 273-286.
- 2) Aprile, A., Negro, C., Sabella, E., Luvisi, A., Nicoli, F., Nutricati, E., Vergine, M., Miceli, A., Blando, F. and De L, Bellis. 2019. Antioxidant activity and anthocyanin contents in olives (cv Cellina di Nardò) during ripening and after fermentation. *Antioxidant*, 8(5): 1-12.
- 3) Ashraf, M. and M.R, Foolad. 2007. Roles of glycine betaine and proline in improving plant abiotic stress resistance. *Environmental Experimental Botany*, 59(2): 206-216.

- 14) Jamali Jaghdani, S., Jahns, P. and M, Tr'ankner. 2021. The impact of magnesium deficiency on photosynthesis and photoprotection in *Spinacia oleracea*. *Plant Stress*, 2: 1-11.
- 15) Jan, J.A., Nabi, G., Khan, M., Ahmad, S., Shah, P.S., Hussain, S. and S, Sehrish. 2020. Foliar application of humic acid improves growth and yield of chilli (*Capsicum annum* L.) varieties. *Pakistan Journal of Agricultural Research*, 33(3): 461-472.
- 16) Karakurt, Y., Husnu, U., Halime, U. and P, Huseyin. 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.
- 17) Khorasani, H., Rajabzadeh, F., Mozafari, H. and A.G, Pirbalouti. 2023. Water deficit stress impairment of morphophysiological and phytochemical traits of *Stevia* (*Stevia rebaudiana* Bertoni) buffered by humic acid application. *South African Journal of Botany*, 154: 365-371.
- 18) Khodamoradi, P., Amiri, J. and B, Dovlati. 2018. Effect of humic acid on some morphological and physiological characteristics of strawberry (*Fragaria ananassa* Duch. cv. Sabrina) under salinity stress. *Pomology Research*, 2(2): 109-135.
- 19) Khordadi Varamin, J., Fanoodi, F., Sinaki, J.M., Rezvan, SH. and A, Damavandi. 2020. Foliar application of chitosan and nano-magnesium fertilizers influence on seed yield, oil content, photosynthetic pigments, antioxidant enzyme activities of sesame (*Sesamum indicum* L.) under water-limited conditions. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 48(4): 2228-2243.
- 20) Kiapour, H., Moaveni, P., Sani, B., Rajabzadeh, F. and H, Mozafari. 2020. Investigating the effect of magnesium and iron oxide nanoparticles on the levels of enzymatic and non-enzymatic antioxidants in roselle. *Journal of Medicinal Plants and By-products*, 9(1): 19-31.
- 21) Krizek, D.T., Britz, S.J. and R.M, Mirecki. 1998. Inhibitory effects of ambient levels of solar UV-A and UV-B radiation on growth of c.v. new red fire lettuce. *Physiologia Plantarum*, 103(1): 1-7.
- 22) Le, T.M., Hong Phung, T.L. and PH.B, Cao. 2020. Effect of magnesium on growth, fruit yield
- 4) Azzony, E.A-E.A- E.A. and T.F, AhmedEl-Moghazy. 2019. Effect of magnesium, iron and carbon dioxide on quality of *Stevia rebaudiana* (Bertoni) pants. *International Journal of Herbal Medicine*, 7(6): 16-22.
- 5) Bisht, N. and P.S, Chauhan. 2020. Excessive and disproportionate use of chemicals cause. In: Larramendy, M.L., Soloneski, S. Editors. *Soil contamination- Threats and sustainable solutions*. London, UK: IntechOpen. p. 298.
- 6) Cai, L., Chen, J., Liu, Z., Wang, H., Yang, H. and W, Ding. 2018. Magnesium oxide nanoparticles: Effective agricultural antibacterial agent against *ralstonia solanacearum*. *Frontiers in Microbiology*, 9: 1-19.
- 7) Chance, B. and A.C, Maehley. 1955. Assay of catalases and peroxidases. *Methods in Enzymology*, 2: 764.
- 8) Cordeiro, F.C., Santa-Catarina, C., Silveira, V. and S.R, Souza. 2011. Humic acid effect on catalase activity and the generation of reactive oxygen species in corn (*Zea mays*). *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 75(1): 70-74.
- 9) Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A. and F, Smith. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*, 28(3): 350-356.
- 10) Gasmalla, M.A.A., Yang, R., Amadou, I. and X, Hua. 2014. Nutritional composition of *Stevia rebaudiana* Bertoni leaf: effect of drying method. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research January*, 13(1): 61-65.
- 11) Giannopolitis, C.N. and S.K, Ries. 1977. Superoxide Dismutases: I Occurrence in higher plants. *Plant Physiology*, 59(2): 309-314.
- 12) Hanudin, E., Wismarini, H., Hertiani, T. and B.H, Sunarminto. 2012. Effect of shading, nitrogen and magnesium fertilizer on phyllanthin and total flavonoid yield of *Phyllanthus niruri* in Indonesia soil. *Journal of Medicinal Plants Research*, 6(30): 4586-4592.
- 13) Huang, D-F., Wang, L-M., Wei, X-Q. and T, Luo. 2016. Effects of applying magnesium fertilizer on Chinese cabbage's yield, nutrient elements' uptake and soil's fertility. 2nd Annual International Conference on Energy, Environmental & Sustainable Ecosystem Developmen, *Advances in Engineering Research*, 115: 405-410.

accumulation and antioxidant activity in tolerant and susceptible genotype. *Journal Agronomy and Crop Science*, 186: 63-70.

33) Sana, N., Bajwam, R., Javaidm, A. and A, Shoaib. 2017. Effect of biopower application on weed growth and yield of rice. *Planta Daninha*, 35(e017164872): 1-11.

34) Sharma, P., Jha, A.B., Dubey, R.S. and M, Pessaraki. 2012. Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions. *Journal of Botany*, 2012(1): 1- 26.

35) Siddiqui, M.H., Alamri, S.A., Al-Khaishany, M.Y.Y., Al-Qutami, M.A., Ali, H.M., Mohamed, H., Al-Whaibi, M.H., Al-Wahibi, M.S. and H.F, Alharby. 2018. Mitigation of adverse effects of heat stress on *Vicia faba* by exogenous application of magnesium. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 25(7): 1393-1401.

36) Vogt, T. 2010. Phenylpropanoid biosynthesis. *Molecular Plant*, 3(1): 2-20.

37) Wanger, G.J. 1979. Content and vacuole/extra vacuole distribution of neutral sugars, free amino acids, and anthocyanis in protoplasts. *Plant Physiology*, 64(1): 88-93.

38) Youssef, M.A., Yousef, A.F., Ali, M.M., Ahmed, A.I., Lamlo, S.F., Strobel W.R. and H.M, Kalaji. 2021. Exogenously applied nitrogenous fertilizers and effective microorganisms improve plant growth of stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni) and soil fertility. *AMB Express*, 11: 1-10.

39) Zaremanesh, H., Eisvand, H.R., Akbari, N., Ismaili, A. and M, Feizian. 2021. Humic acid affects some growth parameters, chlorophyll, flavonoids, antioxidant enzymes, and essential oil profile of *Satureja khuzestanica* Jamzad under salinity stress. *Iranian Journal of Plant Physiology*, 11(3): 3683-3700.

and some biochemical indices of hydroponic black tomato. *Asian Journal of Plant Science*, 19(3): 273-278.

23) Lichtenthaler, H.K. 1987. Chlorophylls and carotenoids: Pigments of photosynthetic biomembranes. *Methods in Enzymology*, 148: 350-382.

24) Miao, B.H., Han, X.G. and W.H, Zhang. 2010. The ameliorative effect of silicon on soybean seedling grown in potassium deficient medium. *Annals of Botany*, 105(6): 967-973.

25) Miri Nargesi, M., Sedaghatoor, S. and D, Hashemabadi. 2022. Effect of foliar application of amino acid, humic acid and fulvic acid on the oil content and quality of olive. *Saudi journal of biological sciences*, 29(5): 3473-3481.

26) Mittler, R. 2002. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plant Science*, 7(9): 405-410.

27) Ojaq, S. M. M., Mozafari, H., Jabbari, H. and B, Sani. 2020. Evaluation of yield of safflower (*Carthamus tinctorius* L.) genotypes under semi-arid conditions. *Plant Genetic Resources*, 18(4), 270-277.

28) Noroozisharaf, A.R. and, M Kaviani. 2018. Effect of soil application of humic acid on nutrients uptake, essential oil and chemical compositions of garden thyme (*Thymus vulgaris* L.) under greenhouse conditions. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 24(3): 423-431.

29) Ozgur Uzilday, R., Uzilday, B., Yalcinkaya, T. and I, Turkan. 2017. Mg deficiency changes the isoenzyme pattern of reactive oxygen species-related enzymes and regulates NADPH-oxidase-mediated ROS signaling in cotton. *Turkish Journal of Biology*, 41: 868-880.

30) Pol, J., Ostra, E.V., Karasek, P., Roth, M., Benesova, K., Kotlarlkova, P. and J, Caslavsky. 2007. Comparison of two different solvents employed for pressurised fluid extraction of stevioside from *Stevia rebaudiana*: methanol versus water. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 388(8): 1847-1857.

31) Popham, P.L. and A, Novacky. 1991. Use of dimethyl sulfoxide to detect hydroxyl radical during bacteria-induced hypersensitive reaction. *Plant Physiology*, 96(4): 1157-1160.

32) Sairam, R.K. and G.C, Srivastava. 2001. Water stress tolerance of wheat *Triticum aestivum* L.: Variation in hydrogen peroxide