

اثر محلول پاشی اسیدهیومیک بر افزایش قدرت تحمل استویا تحت رژیم‌های مختلف آبیاری

فاطمه زارعی^۱، ابوطالب هزارجریبی^{۲*}، سارا خراسانی‌نژاد^۳ و مهدی ذاکری‌نیا^۴

۱- دانش‌آموخته کارشناسی‌ارشد، آبیاری و زهکشی، دانشکده آب و خاک، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان

۲- نویسنده مسئول مکاتبات، دانشیار، دانشکده آب و خاک، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان

پست‌الکترونیکی: hezarjaribi@gau.ac.ir

۳- استادیار، دانشکده تولیدات گیاهی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان

۴- دانشیار، دانشکده آب و خاک، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۵/۲۳ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۱۲/۱۷

چکیده

به منظور بررسی اثر محلول پاشی اسیدهیومیک بر عملکرد و اجزای عملکرد و برخی ویژگی‌های فیزیولوژیکی و فیتوشیمیایی گیاه دارویی استویا (*Stevia rebaudiana*) تحت رژیم آبیاری‌های مختلف، آزمایشی در قالب فاکتوریل بر پایه طرح بلوک‌های کامل تصادفی با سه تکرار در محوطه تحقیقاتی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان انجام شد. تیمارهای مورد بررسی شامل رژیم آبیاری در چهار سطح (۷۰، ۸۵، ۱۰۰ (شاهد) و ۱۱۵ درصد ظرفیت زراعی) و تیمار محلول پاشی اسیدهیومیک در چهار غلظت (صفر، ۲۵۰، ۵۰۰ و ۷۵۰ میلی‌گرم در لیتر) بود. تیمارهای آبیاری و اسیدهیومیک از مرحله ۱۰ برگی آغاز و تا مرحله گلدهی ادامه یافت. در زمان گلدهی کامل، صفات ارتفاع بوته، طول و قطر ریشه، وزن تر و خشک اندام هوایی و ریشه، تعداد شاخه‌های جانبی، تعداد گل، تعداد میانگره، تعداد برگ، سطح برگ، وزن زیست توده تر و خشک، فعالیت آنتی‌اکسیدانی ریشه، فنل کل ریشه، فلاونوئیدکل ریشه، پرولین ریشه، نشت یونی ریشه و محتوای نسبی آب برگ اندازه‌گیری شد. نتایج نشان داد اثر سطوح مختلف آبیاری بر ارتفاع بوته، وزن تر و خشک اندام هوایی، تعداد شاخه جانبی، تعداد میانگره، وزن زیست توده تر و خشک در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود. با اعمال غرقابی ارتفاع بوته، وزن تر و خشک اندام هوایی، وزن تر و خشک زیست توده افزایش یافت. اثر متقابل تنش کم آبیاری و اسیدهیومیک به طور معنی‌داری سبب افزایش میزان ارتفاع بوته، فعالیت آنتی‌اکسیدانی و پرولین ریشه گردید. تنش کم آبیاری تاثیر منفی بر صفات رشد داشته و محلول پاشی اسیدهیومیک باعث تعدیل اثرات منفی ناشی از تنش کم آبیاری شده است. بنابراین براساس یافته‌ها می‌توان نتیجه گرفت، استویا در برابر غرقابی و خشکی مقاوم است و مکانیسم مقاومت در آن در برابر تنش خشکی برای حفظ اجزای عملکرد رویشی، افزایش اسمولیت‌ها و ترکیبات فنلی می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: پرولین، فعالیت آنتی‌اکسیدانی، فلاونوئیدکل، فنل کل، وزن خشک

مقدمه

بیشتر مزارع کشاورزی جهان است (Abedi & Pakniyat, 2007; Tas & Tas, 2010) که منجر به مهار فتوسنتز گیاهان، تغییر در محتوا و اجزای کلروفیل و آسیب رساندن به دستگاه

خشکسالی یکی از تنش‌های محیطی و مهمترین عامل محدودکننده رشد گیاهان و بهره‌وری محصولات زراعی در

مقادیر بسیار کم این ترکیبات آثار چشمگیری در بهبود کمیت و کیفیت محصولات باغی دارد. از جمله کودهای آلی اسید هیومیک است که سبب افزایش حاصل خیزی خاک و بهبود ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی خاک مانند نفوذ پذیری، تهویه، دانه بندی، ظرفیت نگهداری آب در خاک، تحرک و در دسترس قرار دادن عناصر غذایی می‌شود. افزایش جذب نیتروژن، فسفر، پتاسیم، کلسیم و منیزیم از طریق افزایش قابلیت تحرک این عناصر گزارش شده است (Mohammadi et al., 2016; Khan et al., 2012). در بررسی اثر اسید هیومیک بر رشد و عملکرد گندم (*Triticum aestivum* L.)، نتایج نشان داد که اثر متقابل محلول پاشی اسید هیومیک در زمان‌های مختلف بر اجزای عملکرد شامل وزن تر گیاه، وزن تر و خشک اندام هوایی و ریشه، طول ریشه و اندام هوایی وزن دانه معنی دار بوده است (Sabzevari & Khazaei, 2009). همچنین در تحقیقی دیگر به منظور بررسی اثر تنش کم آبیاری و اسید هیومیک بر برخی ویژگی‌های مورفولوژیکی و فیزیولوژیکی سرخارگل مشخص شد که اسید هیومیک باعث افزایش معنی دار ویژگی‌های رشدی و مورفولوژیکی می‌شود (Alizade ahmad abadi et al., 2017).

استویا (*Stevia rebaudiana*) گیاهی چندساله علفی از خانواده کاسنی (Asteraceae) است (Kumar et al., 2014). معمولاً به عنوان شیرین کننده طبیعی، یکی از باارزش ترین گیاهان چندساله مناطق گرمسیری شناخته شده است که به طور وحشی در پاراگوئه (Paraguay) و برزیل رشد می‌کند (Singh et al., 2011) و امروزه از طریق کشت، در هند اهلی شده است (Das et al., 2007). گیاه استویا با توجه به شرایط محیطی دارای ارتفاع ۶۵-۸۰ سانتی متر و برگ‌های بیضی و متقابل است، در خاک‌های لوم-شنی با pH در محدوده ۶/۵ تا ۷/۵ به خوبی رشد می‌کند (Goyal et al., 2009). از ویژگی‌های جالب توجه این گیاه، شیرینی شدید برگ‌ها و عصاره آبی آن است. استویوزیدها (Stevioside)، گلیکوزیدهای دی‌ترین که عامل طعم شیرین گیاه می‌باشند، فاقد کالری و ۲۰۰-۳۰۰ برابر شیرین تر از

فتوستنتزی می‌شود (Abedi & Pakniyat, 2010; Nayyar & Gupta, 2006). طبق آمار هواشناسی، بسیاری از مناطق ایران در معرض کمبود بارش سالانه و تنش آب است (Abedi & Pakniyat, 2010) و زمین‌های کشاورزی و آب آبیاری به دلیل صنعتی شدن و توسعه شهری به سرعت در حال کاهش هستند، بنابراین برای به دست آوردن حداکثر سود در واحد سطح، نیاز به افزایش بازدهی مصرف آب می‌باشد (Forouzandeh et al., 2012). از سوی دیگر پدیده گرمایش جهانی سبب افزایش تبخیر آب از خاک، شور شدن بیشتر خاک‌ها، بالا آمدن سطح آب‌های آزاد، وقوع بارش‌ها به صورت رگبار و غرقاب شدن خاک می‌شود (Najafi & Mardomi., 2012; Rozitalab, 2007).

در همین راستا، در تحقیقات انجام شده روی گیاه دارویی نعناع فلفلی (*Mentha piperita* L.) مشخص شد که تنش خشکی باعث کاهش معنی داری در بسیاری از پارامترهای رشد شامل طول اندام هوایی و ریشه، تعداد ریزوم، طول ریزوم و اجزای عملکرد شامل وزن تر و خشک اندام هوایی می‌شود (Khorasaninejad et al., 2011). همچنین در تحقیقی دیگر که روی گیاه دارویی سرخارگل (*Echinacea purpurea* L.) انجام شد، مشخص گردید که تنش کم آبی منجر به کاهش محتوای نسبی آب، افزایش نشت یونی و محتوای پرولین گیاه می‌شود (Khorasaninejad et al., 2018) و در مطالعاتی که روی اثر تنش کم آبی بر گیاهان قلم (*Fortuynia bungei* Bioss) (Tajamoliyan et al., 2012)، چهار گونه اسپرس ایرانی (*Onobrychis* sp.) (Farahdost & Jafari, 2020) و دو گونه از گیاه اسپرس (*Onobrychis radiata*) و (*Onobrychis viciifolia*) (Ramak et al., 2006) انجام شد مشخص گردید که کم آبی سبب کاهش عملکرد رویشی گیاه می‌گردد.

امروزه استفاده وسیع از کودهای شیمیایی سبب افزایش نگرانی در مورد سلامت انسان شده است که با جایگزین کردن کودهای آلی می‌توان تا حدودی این نگرانی را کاهش داد (Bahrami et al., 2015; Shehata et al., 2011).

مواد و روش‌ها

این آزمایش به صورت گلدانی و فاکتوریل دو فاکتوره در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی در گلخانه تحقیقاتی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان طی سال زراعی ۹۸-۱۳۹۷ اجرا شد. فاکتور A شامل رژیم‌های آبیاری در چهار سطح (۷۰، ۸۵، ۱۰۰ (شاهد) و ۱۱۵ درصد ظرفیت زراعی) و فاکتور B اسیدهیومیک در چهار غلظت (صفر شاهد، ۲۵۰، ۵۰۰ و ۷۵۰ میلی‌گرم در لیتر) بود که در سه تکرار (در هر تکرار دو واحد آزمایشی) انجام گردید. دو عدد نشاء استویا در گلدان‌های یکدست، با وزن و شکل یکسان، از نوع پلاستیکی، با قطر دهانه ۲۰ سانتی‌متر و ارتفاع ۲۶ سانتی‌متر، در کف هر یک از گلدان‌ها به مقدار مساوی سنگ‌ریزه (برای انجام زهکشی و تهویه) و در هر گلدان وزن مشخصی از خاک مزرعه (رس، خاکبرگ، ماسه) که یکنواخت تهیه شده بود، ریخته شد. مشخصات نمونه خاک استفاده شده در جدول ۱ نشان داده شده است.

ساکارز هستند (Ali et al., 2010; Midmore & Rank, 2002). از این گیاه برای درمان بسیاری از بیماری‌ها مانند فشار خون بالا، چاقی، سوزش قلب، هیپوگلیسمی (پایین افتادن قند خون) و کاهش سطح اسید اوریک استفاده می‌شود (Ahmed et al., 2007; Singh et al., 2011).

از مهمترین مسائل و مشکلات کشاورزی ایران تنش خشکی و کم‌آبی است و از این پدیده طبیعی و غیرقابل تغییر راه فراری نیست. با عنایت به تغییرات اقلیمی و بارندگی‌های سیل‌آسا در سال‌های اخیر و نیاز به ارزیابی گیاهان متحمل به هر دو شرایط خشکی و غرقابی و همزمان معرفی روش‌های مدیریتی مانند کاربرد کودهای آلی از طریق چنین بررسی‌هایی ضروریست، از این رو با توجه به اهمیت عملکرد رویشی و فعالیت آنتی‌اکسیدانی مبتنی بر ترکیبات فنلی استویا، این پژوهش به منظور بررسی اثر سطوح مختلف اسیدهیومیک بر بهبود ویژگی‌های رشدی فیزیولوژیکی و فیتوشیمیایی گیاه استویا در رژیم‌های مختلف آبیاری انجام شد.

جدول ۱- خصوصیات فیزیکی و شیمیایی خاک گلدان‌ها

بافت خاک	رس (%)	لای (%)	ماسه (%)	درصد مواد خنثی‌کننده	درصد پتاسیم	فسفر	ازت	کربن	قدرت هدایت الکتریکی
	(%)	(%)	(%)	اشباع	(میلی‌گرم بر کیلوگرم)	(میلی‌گرم بر کیلوگرم)	(میلی‌گرم بر کیلوگرم)	(میلی‌گرم بر کیلوگرم)	هیدروژن
				(%)	(%)				(ds/m)
سیلت لومی	۱۸	۵۸	۲۴	۳۱/۵	۷۸	۱۱/۲	۰/۲۱۸	۲/۱۸	۷/۹
				۴۵/۸۰					۰/۹۴

گلدان پس از زهکشی آب اضافی به ظرفیت زراعی برسد. در این مرحله گلدان‌ها به سرعت وزن شده و خاک آنها در دمای ۱۰۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۸ ساعت کاملاً خشک گردید. در ادامه پس از مشخص شدن درصد وزنی رطوبت خاک در ظرفیت زراعی مزرعه، میزان رطوبت موجود در خاک برای اعمال تیمارهای رطوبتی مختلف مشخص شد تا با توزین روزانه گلدان نمونه در هر بلوک (بدون گیاه برای لحاظ نشدن وزن گیاه در وزن گلدان و خاک)، کسری آب محاسبه و مقدار آب مورد نیاز به

پس از استقرار کامل گیاه، در مرحله ۱۰ برگی، تیمار رژیم آبیاری در سطوح (۷۰، ۸۵، ۱۰۰ (شاهد) و ۱۱۵ درصد حد ظرفیت زراعی) با روش اعمال تیمارهای تنش خشکی به روش وزنی بود. به طوری که ابتدا در کف هر یک از گلدان‌ها به مقدار مساوی سنگ‌ریزه (برای انجام زهکشی) ریخته شد و با استفاده از ترازو به صورت هم‌وزن از خاک پر شدند (در داخل هر گلدان ۹ کیلوگرم خاک). سپس با افزودن آب، خاک هر گلدان را به درجه اشباع رسانده و به مدت ۴۸ ساعت روی سطح مشبک قرار داده شد تا هر

به صورت دستی مورد شمارش قرار گرفتند و یادداشت شدند.

اندازه گیری طول و قطر ریشه: ابتدا ریشه ها از خاک خارج و ریشه ها با آب شسته شدند، سپس طول و قطر ریشه ها (با خطکش) اندازه گیری شد (Čereković *et al.*, 2013).

اندازه گیری وزن تر و خشک اندام هوایی و ریشه: پس از برداشت گیاه ریشه و اندام هوایی از هم جدا و خاک از ریشه شسته شد و برگ و ساقه خشک و نکروده شده نیز جدا شده و به کمک ترازو وزن تر و بعد خشک شده (آون با دمای ۷۰ درجه سانتی گراد و به مدت ۴۸ ساعت) و وزن خشک آنها با ترازوی دقیق اندازه گیری و ثبت گردید (Zollinger *et al.*, 2006).

اندازه گیری سطح برگ: برای اندازه گیری شاخص سطح برگ از هر واحد تکرار پنج برگ به طور تصادفی انتخاب شد و سطح برگ آنها توسط دستگاه اندازه گیری سطح برگ (Leaf area meter) اندازه گیری و میانگین آنها محاسبه شد. سطح برگ تولیدی در مترمربع (سانتی مترمربع) اندازه گیری شد (Chaudhary *et al.*, 2012).

اندازه گیری محتوای نسبی آب برگ (RWC): پس از کامل شدن رشد رویشی گیاهان، بالاترین برگ گیاه در هر تکرار برداشت و بلافاصله وزن تر برگ ها اندازه گیری شد. به منظور تعیین وزن آماس، برگ ها به مدت ۲۴ ساعت در شدت نور کم (برای آنکه کاهش وزنی در اثر فعالیت تنفسی رخ ندهد) در داخل آب مقطر قرار داده شدند و پس از اندازه گیری وزن برگ ها در این شرایط، برگ ها به مدت ۴۸ ساعت در آون دمای ۱۰۵ درجه سانتی گراد قرار گرفتند و وزن خشک آنها با ترازوی دقیق اندازه گیری شد. مقدار RWC از رابطه (۲) به دست می آید.

گلدان ها اضافه شود. برای کنترل وزن خشک بوته ها، هر تیمار رطوبتی دارای گلدان اضافی بود تا وزن خشک بوته ها به وزن خشک گلدان ها اضافه نشده و مقدار صحیحی از آب در زمان اعمال تیمارهای رطوبتی به هر گلدان اختصاص یابد. به نحوی که تا ۲ ماه بعد از انتقال گلدان های اصلی به فضای آزاد (اواسط خرداد ۹۷)، گلدان ها با رژیم های یکسان آبیاری شدند و از این مرحله به بعد، برای تعیین رژیم های آبیاری به طور روزانه، رطوبت از هریک از گلدان های نمونه اندازه گیری گردید و بر اساس درصد وزنی رطوبت خاک، مقدار آب مورد نیاز محاسبه گردید (Khorasaninejad *et al.*, 2018). آبیاری به مدت ۱۲ هفته به صورت مساوی ادامه و از این مرحله به بعد، در زمان رشد رویشی، سطوح مختلف آبیاری اعمال گردید و اسیدهیومیک به صورت محلول پاشی در چهار غلظت (صفر، ۲۵۰، ۵۰۰ و ۷۵۰ میلی گرم در لیتر) در چهار مرحله، مرحله اول پس از استقرار نشاء و شروع اعمال رژیم آبیاری مراحل بعدی به ترتیب رشد رویشی کامل گیاه (ابتدای گلدهی) و گلدهی کامل اعمال گردید.

در مرحله گلدهی کامل گیاه استویا، صفات فیزیولوژیک و فیتوشیمیایی پرولین ریشه، نشستیونی ریشه (Electrical conductivity) و محتوای نسبی آب ریشه (Relative Water Content)، برخی صفات فیتوشیمیایی شامل فنل کل ریشه، فعالیت آنتی اکسیدانی ریشه، فلاونوئیدکل ریشه و اجزای عملکرد شامل ارتفاع بوته (سانتی متر)، طول و قطر ریشه (سانتی متر)، وزن تر و خشک اندام هوایی و ریشه (گرم در بوته)، تعداد شاخه های جانبی، تعداد گل، تعداد میانگره، تعداد برگ، سطح برگ، وزن زیست توده تر و خشک (گرم در بوته) برای هر تکرار میانگین دو بوته اندازه گیری گردید. برای اندازه گیری ارتفاع بوته از متر و تعداد گل، میانگره، برگ و شاخه های جانبی استفاده و

$$RWC (\%) = [(fw - dw) / (sw - dw)] \times 100 \quad (2)$$

کالیبراسیون به دست آمد. در این روش مقدار کل ترکیبات فنلی براساس یک ترکیب فنلی انتخاب شده به عنوان استاندارد (گالیک اسید) اندازه گیری و نتایج به صورت میلی گرم گالیک اسید بر گرم وزن خشک بیان می شود (Ordone *et al.*, 2008).

اندازه گیری محتوای فلاونوئید کل ریشه: بدین منظور ابتدا نیم سی سی از عصاره متانولی با ۱/۵ سی سی متانول، ۲/۸ سی سی آب مقطر، ۱۰۰ میکرو لیتر استات پتاسیم یک مولار و ۱۰۰ میکرو لیتر آلومینیم کلرید ۱۰ درصد در اتانول مخلوط شد و به مدت نیم ساعت در محیط تاریکی قرار گرفته و بلافاصله در طول موج ۴۱۵ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر قرائت شد. برای رسم منحنی استاندارد از غلظت های مختلف محلول استاندارد کوئرستین (صفر، ۲۰، ۴۰، ۶۰، ۸۰ و ۱۰۰ میلی گرم بر میلی لیتر) استفاده شد و میزان فلاونوئید کل براساس خط استاندارد کوئرستین تعیین گردید. برای تهیه بلانک به جای عصاره متانولی، از متانول خالص استفاده شد (Chang *et al.*, 2012).

اندازه گیری محتوای فعالیت آنتی اکسیدانی ریشه: برای اندازه گیری فعالیت آنتی اکسیدانی توسط درصد مهار رادیکال های آزاد از روش درصد مهار رادیکال های آزاد DPPH استفاده شد. ابتدا دو میلی لیتر از DPPH با غلظت ۰/۱ میلی مولار به لوله آزمایش ریخته شد و بعد دو میلی لیتر از عصاره متانولی تهیه شده به آن اضافه شد. لوله های آزمایش به مدت ۳۰ دقیقه در محیط تاریک قرار داده شد. بعد از پایان واکنش بلافاصله جذب نمونه ها با دستگاه اسپکتروفتومتر (مدل UV-VIS 2800، کشور چین) در طول موج ۵۱۷ نانومتر قرائت شد. نمونه شاهد حاوی دو میلی لیتر DPPH و دو میلی لیتر متانول بود (Ebrahimzadeh *et al.*, 2008).

اندازه گیری پرولین ریشه: برای تهیه محلول استخراج پرولین، ۰/۱ گرم ریشه خشک شده را در هاون چینی همراه با ۱۰ میلی لیتر اسیدسولفوسالیسیلیک ۳/۳ درصد ابتدا به خوبی سائیده و بعد با عبور از کاغذ صافی، عصاره حاصل را در لوله آزمایش ریخته و در مخلوط آب و یخ

در این رابطه، fw وزن تازه برگ، sw وزن آماس برگ و dw وزن خشک برگ است (Sun *et al.*, 2013).

اندازه گیری نشت یونی ریشه (EC): برای این منظور، وزن مشخصی از قسمت وسطی نمونه های برگ مربوط به هر تیمار جدا کرده، ابتدا با آب مقطر شسته و در لوله های درب دار قرار داده شدند. سپس ۲۰ میلی لیتر آب مقطر به آنها اضافه و در شرایط دمای ۲۵ درجه سانتی گراد به مدت ۲۴ ساعت روی شیکر دورانی قرار گرفتند. هدایت الکتریکی محلول (C₁) به کمک دستگاه هدایت سنج اندازه گیری و نمونه ها به مدت ۲۰ دقیقه در اتوکلاو در دمای ۱۲۰ درجه سانتی گراد قرار گرفتند و دوباره هدایت الکتریکی آنها (C₂) اندازه گیری شد (Jin *et al.*, 2015). نشت یونی EC براساس رابطه (۳) محاسبه شد.

$$EC (\%) = (C_1/C_2) \times 100 \quad (3)$$

که (C₁) هدایت الکتریکی محلول ۲۴ ساعت بعد از قرار گرفتن نمونه ها در آب مقطر و (C₂) دومین قرائت یعنی ۲۰ دقیقه بعد از قرار گرفتن در اتوکلاو است.

تهیه عصاره متانولی: به منظور تهیه عصاره متانولی برای اندازه گیری فنل کل، فلاونوئید کل و فعالیت آنتی-اکسیدانی یک گرم از ریشه خشک پودر شده وزن کرده، بعد ۱۰ میلی لیتر متانول ۸۰ درصد به آن اضافه و به مدت ۲۴ ساعت روی شیکر قرار داده شد، سپس از کاغذ صافی عبور داده شد.

اندازه گیری محتوای فنل کل ریشه: بدین منظور ۲۰ میکرو لیتر از عصاره متانولی تهیه شده با ۱/۱۶ میلی لیتر آب مقطر مخلوط و ۱۰۰ میکرو لیتر معرف فولین به محلول اضافه شد. پس از پنج دقیقه ۳۰۰ میکرو لیتر محلول کربنات سدیم ۲۰ درصد به محلول اضافه، سپس جذب نمونه ها توسط دستگاه اسپکتروفتومتر (مدل UV-VIS 2800) در طول موج ۷۶۰ نانومتر قرائت شد. با استفاده از غلظت های متفاوت استاندارد اسید گالیک (صفر، ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰، ۲۰۰ و ۲۵۰ میلی گرم بر میلی لیتر)، منحنی

نتایج و بحث

نتایج تجزیه واریانس نشان داد، اثرهای ساده سطوح مختلف آبیاری بر ارتفاع بوته، وزن تر و خشک اندام هوایی، تعداد شاخه جانبی، تعداد میانگره و زیست توده خشک در سطح احتمال یک درصد معنی دار بود، اما روی طول و قطر ریشه، وزن تر و خشک ریشه، تعداد گل و برگ، سطح برگ، فعالیت آنتی اکسیدانی ریشه، فنل کل ریشه، فلاونوئیدکل ریشه، پرولین ریشه، محتوای نسبی ریشه و نشت یونی ریشه اثر معنی داری نداشت،

اثرهای ساده اسیدهیومیک بر وزن خشک اندام هوایی، وزن زیست توده خشک و فنل کل ریشه در سطح پنج درصد و بر فلاونوئیدکل و پرولین ریشه در سطح احتمال یک درصد تأثیر معنی دار داشت و بر سایر صفات تأثیر معنی داری نداشت. نتایج نشان داد که اثر متقابل سطوح مختلف آبیاری و اسیدهیومیک روی ارتفاع بوته و فعالیت آنتی اکسیدانی در سطح احتمال پنج درصد و روی پرولین ریشه در سطح احتمال یک درصد دارای اختلاف معنی دار آماری بود و بر سایر صفات تأثیر معنی داری نداشت (جدول های ۲ و ۳).

نگهداری گردید. در مرحله بعد دو میلی لیتر از معرف ناین هیدرین (۱/۲۵) گرم ناین هیدرین، ۲۰ میلی لیتر اسیدسولفوریک ۶ مولار و ۳۰ میلی لیتر اسیداستیک خالص) و دو میلی لیتر اسیداستیک گلاسیال (خالص) به هر یک از لوله های محتوای عصاره افزوده شد. لوله ها به مدت یک ساعت در حمام آب جوش (بن ماری) در دمای ۱۰۰ درجه سانتی گراد قرار گرفتند، سپس به مخلوط آب و یخ منتقل شدند. در این مرحله شش میلی لیتر تولوئن به هر یک از لوله های آزمایش افزوده و به مدت ۱۵ تا ۲۰ ثانیه بشدت تکان داده شده و در نهایت از مواد داخل لوله که به حالت دو فاز، فاز فوقانی برداشته شده و توسط دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۲۰ نانومتر قرائت شد. غلظت پرولین نمونه ها با استفاده از منحنی استاندارد پرولین محاسبه و به صورت میکرومول بر گرم ارزیابی گردید (Bathes et al., 1973).

روش تجزیه و تحلیل داده ها با استفاده از نرم افزار SAS (نسخه ۹/۱) و مقایسه میانگین داده ها با آزمون LSD در سطح معنی داری پنج درصد انجام شده و نمودارها با نرم افزار Excel رسم گردید.

جدول ۲- تجزیه واریانس تأثیر اسیدهیومیک بر اجزای عملکرد و صفات مورفولوژیکی استویا تحت رژیم های آبیاری

میانگین مربعات							درجه آزادی	منابع تغییرات
وزن زیست توده خشک	وزن زیست توده تر	تعداد میانگره	تعداد شاخه جانبی	وزن خشک اندام هوایی	وزن تر اندام هوایی	ارتفاع بوته		
۶۱/۲۷*	۴۳۹/۱۹ ^{ns}	۱۰۸۹/۱۸ ^{ns}	۰/۱۵ ^{ns}	۲۱/۶۳ ^{ns}	۱۴۴/۲۷ ^{ns}	۶۴۷/۵۸*	۲	بلوک
۱۹۷/۶۸**	۳۰۷۲/۸۱**	۴۷۰۶/۵۰**	۱۷/۶۴**	۱۷۴/۹۶**	۱۸۱۶/۶۷**	۳۵۱۷/۵۸**	۳	آبیاری (W)
۶۳/۳۳*	۶۷۱/۱۴ ^{ns}	۲۰۸۷/۸۳ ^{ns}	۰/۹۲ ^{ns}	۳۰/۸۸*	۲۶۱/۱۱ ^{ns}	۳۱۸/۵۳ ^{ns}	۳	اسیدهیومیک (H)
۲۶/۲۲ ^{ns}	۱۹۷/۴۹ ^{ns}	۱۲۱۳/۸۱ ^{ns}	۰/۲۷ ^{ns}	۳/۷۷ ^{ns}	۷۷/۷۸ ^{ns}	۳۷۵/۴۳*	۹	W × H
۱۶/۷۴	۳۱۱/۳۹	۸۲۴/۴۱	۰/۱۸	۷/۳۶	۱۱۶/۴۹	۱۲۹/۵۸	۳۰	خطا
۱۴/۱۶	۱۷/۲۳	۲۴/۸۶	۲۵/۲۲	۱۲/۱۲	۱۳/۲۲	۸/۹۷		ضریب تغییرات %

*، ** و ^{ns} به ترتیب معنی دار در سطح احتمال پنج و یک درصد و عدم معنی داری

ادامه جدول ۲-

میانگین مربعات							درجه آزادی	منابع تغییرات
سطح برگ	تعداد برگ	تعداد گل	وزن خشک ریشه	وزن تر ریشه	قطر ریشه	طول ریشه		
۱۸/۰۹ ^{ns}	۱۰۷۲/۳۳ ^{ns}	۱۷۰/۸۹ ^{ns}	۰/۱۰ ^{ns}	۲/۶۲ ^{ns}	۷/۱۴ ^{ns}	۸۳/۲۵ ^{**}	۲	بلوک
۳/۲۹ ^{ns}	۱۳۱۶۴/۷ ^{ns}	۲۰۶۳/۹۶ ^{ns}	۰/۰۷ ^{ns}	۶/۴۵ ^{ns}	۳/۰۵ ^{ns}	۳/۶۳ ^{ns}	۳	آبیاری (W)
۱۳/۸۸ ^{ns}	۴۹۴/۴۶ ^{ns}	۴۴۹/۰۲ ^{ns}	۰/۰۹ ^{ns}	۴/۴۹ ^{ns}	۴/۰۵ ^{ns}	۱۶/۴۷ ^{ns}	۳	اسیدهیومیک (H)
۶/۰۲ ^{ns}	۴۱۷۷/۳۵ ^{ns}	۱۴۳۰/۶۱ ^{ns}	۰/۱۸ ^{ns}	۰/۳۴ ^{ns}	۴/۷۰ ^{ns}	۲۱/۸۰ ^{ns}	۹	W × H
۹/۷۷	۵۸۸۲/۳۳	۱۷۴۸/۳۴	۰/۰۷	۰/۰۱	۳/۱۲	۱۱/۰۷	۳۰	خطا
۲۷/۶۲	۲۱/۱۴	-	۲۰/۴۱	۲۲/۵۵	۱۹/۴۵	۹/۹۷	-	ضریب تغییرات %

** و ns: به ترتیب معنی دار در سطح احتمال یک درصد و عدم معنی داری

جدول ۳- تجزیه واریانس تأثیر اسیدهیومیک بر صفات فیزیولوژیکی و فیتوشیمیایی استویا تحت رژیم‌های آبیاری

میانگین مربعات						درجه آزادی	منابع تغییرات
محتوای نسبی برگ	نشت یونی ریشه	پرولین ریشه	فلاونوئید کل ریشه	فنل کل ریشه	فعالیت آنتی‌اکسیدانی ریشه		
۷/۴۰ ^{ns}	۷/۰۲ ^{ns}	۸/۷۶ ^{ns}	۱/۴۷ ^{ns}	۳/۷۶ ^{ns}	۷۴/۸۴ ^{ns}	۲	بلوک
۱/۷۴ ^{ns}	۰/۱۶ ^{ns}	۲/۸۹ ^{ns}	۱/۷۰ ^{ns}	۰/۷۴ ^{ns}	۶۸/۴۲ ^{ns}	۳	آبیاری (W)
۶/۶۰ ^{ns}	۰/۳۴ ^{ns}	۲۴۸/۶۹ ^{**}	۲۸/۱۰ ^{**}	۵۱/۴۱ [*]	۱۶/۵۵ ^{ns}	۳	اسیدهیومیک (H)
۴/۴۵ ^{ns}	۱/۷۱ ^{ns}	۱۶۶/۶۷ ^{**}	۵/۹۶ ^{ns}	۷/۰۷ ^{ns}	۹۷/۰۸ [*]	۹	W×H
۲/۹۶	۱/۹۳	۳/۲۴	۵/۰۰	۴/۰۴	۳۹/۰۵	۳۰	خطا
۲۳/۳۴	۱۷/۳۱	۱۸/۴۷	۲۷/۳۰	۲۲/۴۲	۶/۷۳	-	ضریب تغییرات %

** و ns: به ترتیب معنی دار در سطح احتمال پنج و یک درصد و عدم معنی داری

مقایسه میانگین صفات

ارتفاع بوته

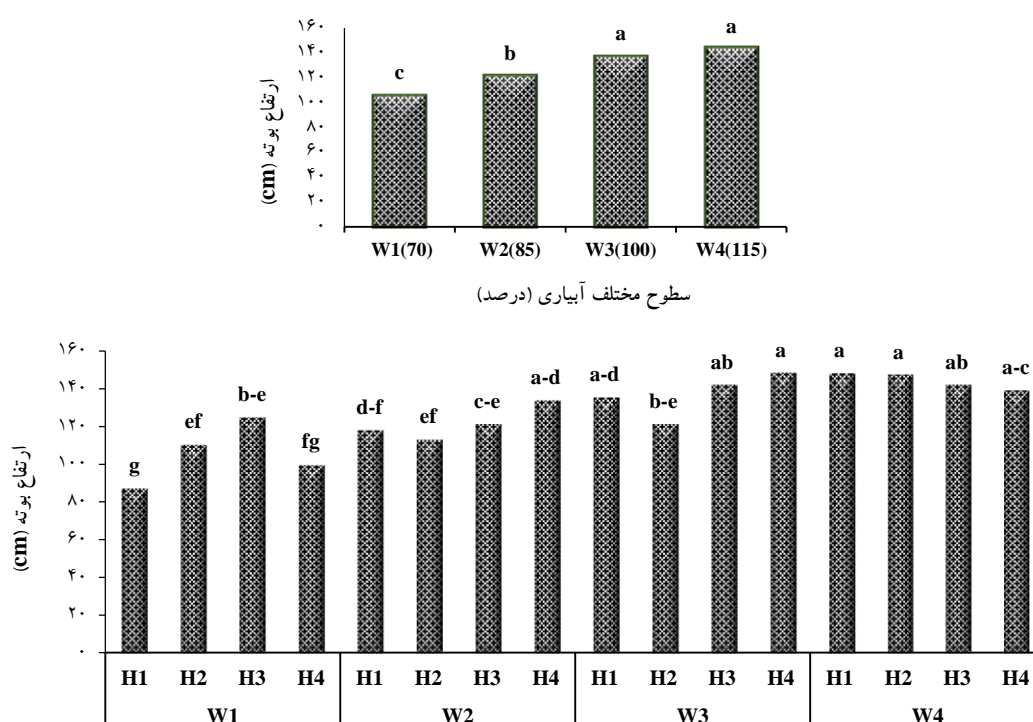
graecum L. (Farhadi et al., 2017) مطابقت داشت. همچنین در تحقیقی که در آن به بررسی عملکرد و کیفیت بذر اسفرزه (*Plantago ovata* Forssk) تحت تیمارهای مختلف نیتروژن و کم‌آبیاری پرداخته شد نتایج مشابهی به دست آمد (Ghasemi siani et al., 2011). ارتفاع بوته تحت تأثیر خصوصیات ژنتیکی، شرایط محیطی مانند رطوبت، نور، تغذیه، کمیت و کیفیت نور قرار می‌گیرد. یکی از دلایل کاهش ارتفاع بوته در شرایط تنش خشکی کاهش تقسیم و رشد سلولی است، کاهش تقسیم و رشد سلول سبب محدود شدن اندازه اندام‌های گیاه از جمله ارتفاع بوته می‌گردد، به طوری که یکی از اولین نشانه‌های کمبود آب در گیاهان را می‌توان از ارتفاع بوته تشخیص داد. به علاوه اینکه

ارتفاع بوته به طور معنی داری در سطح احتمال یک درصد تحت تأثیر رژیم‌های مختلف آبیاری قرار گرفت (جدول ۲). بیشترین مقدار برای این صفت با میانگین ۱۴۴/۰۸۳ سانتی‌متر در ۱۱۵ درصد ظرفیت زراعی تیمار رژیم آبیاری به دست آمد که اختلاف معنی داری با شاهد نداشت، ضمن آنکه موجب مصرف ۱۵ درصدی آب بیشتر نسبت به سطح شاهد شد و کمترین مقدار با میانگین ۱۰۵/۵۰ سانتی‌متر در ۷۰ درصد ظرفیت زراعی تیمار رژیم آبیاری به دست آمد، در نتیجه با افزایش شدت تنش، ارتفاع بوته کاهش پیدا کرد (شکل ۱). نتایج این تحقیق با نتایج اثر تنش خشکی روی گیاه شنبليله (*Trigonella foenum-*

نتایج می‌توان بیان کرد با افزایش غلظت اسیدهیومیک، بدون در نظر گرفتن رژیم آبیاری، ارتفاع بوته افزایش می‌یابد. اسیدهیومیک از مهمترین کودهای آلی به‌شمار می‌رود که جزیی از ترکیبات فعال مواد آلی خاک می‌باشند و فعالیت شبه‌هورمونی داشته و رشد رویش گیاهان را تحریک می‌کنند (Bahrami et al., 2015; Ferrara et al., 2008). از سوی دیگر سبب افزایش حاصلخیزی خاک و بهبود ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی خاک مانند نفوذپذیری، تهویه، دانه‌بندی، ظرفیت نگهداری آب در خاک، تحرک و در دسترس قرار دادن عناصر غذایی می‌شود (Mohammadi et al., 2016)، در نتیجه سبب افزایش تقسیم سلولی و رشد گردیده و در این تحقیق موجب افزایش ارتفاع گیاه شد.

در شرایط کم‌آبی جذب مواد غذایی کاهش یافته و رشد محدود می‌گردد. بنابراین به نظر می‌رسد علاوه‌براین، رقابت بین بوته‌ها برای به دست آوردن آب در تیمارهای تنش خشکی، کاهش تخصیص مواد فتوسنتزی ساقه را به‌دنبال داشته که این امر سبب کاهش ارتفاع بوته می‌گردد (Badalzadeh et al., 2016; Kouchaki et al., 1993).

مطابق شکل (۱) کمترین ارتفاع بوته با میانگین ۸۷/۳۳ سانتی‌متر در تیمار ۷۰ درصد ظرفیت زراعی و بدون مصرف اسیدهیومیک و بیشترین ارتفاع بوته با میانگین مقدار ۱۴۸/۳۳ در سطح تیمار شاهد رژیم آبیاری و ۷۵۰ میلی‌گرم در لیتر اسیدهیومیک مشاهده شد که این نتایج مشابه نتایج به‌دست آمده از آزمایش دیگری در این زمینه است که در آن تأثیر اسیدهیومیک بر رشد و عملکرد گندم معنی‌داری بود (Sabzevari & khazaei, 2009). با توجه به



شکل ۱- اثر اصلی سطوح مختلف آبیاری و اثر متقابل سطوح آبیاری و اسیدهیومیک بر ارتفاع بوته

تیمار آبیاری (W1): ۷۰ درصد ظرفیت زراعی، W2: ۸۵ درصد ظرفیت زراعی، W3: ۱۰۰ درصد ظرفیت زراعی (شاهد)، W4: ۱۱۵ درصد ظرفیت زراعی، تیمار اسیدهیومیک (H1): صفر میلی‌گرم در لیتر (شاهد)، H2: ۲۵۰ میلی‌گرم در لیتر، H3: ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر و H4: ۷۵۰ میلی‌گرم در لیتر. در هر ستون برای هر تیمار حروف متفاوت نمایانگر اختلاف معنی‌دار در سطح $p \leq 0.05$ تحت آزمون LSD می‌باشد.

وزن تر اندام هوایی

نتایج تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که اثر برهم‌کنش سطوح مختلف آبیاری بر وزن تر اندام هوایی در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود، به طوری که اثر ساده مقادیر مختلف اسیدهیومیک و اثر متقابل سطوح مختلف کم‌آبیاری و اسیدهیومیک بر وزن تر اندام هوایی اختلاف معنی‌داری نداشت (جدول ۲). بیشترین و کمترین وزن تر اندام هوایی به ترتیب با میانگین ۹۷/۵ و ۶۷/۵ گرم در بوته در سطح ۱۱۵ و ۷۰ درصد ظرفیت زراعی تیمار رژیم آبیاری می‌باشد. یعنی با کاهش نیاز آبی از ۱۱۵ درصد به ۷۰ درصد نیاز آبی گیاه، ۳۰ گرم از وزن تر اندام هوایی کاسته شده است (شکل ۲). در بررسی تأثیر کمبود آب بر صفات مورفولوژیک گیاه دارویی زوفا (*Hyssopus officinalis* L.) گزارش شده که افزایش شدت تنش آبی سبب کاهش وزن اندام هوایی می‌شود (Rassam et al., 2014). نتایج این تحقیق با نتایج اثر تنش خشکی روی کاهش وزن تر گیاه نعناع فلفلی (*Mentha piperita*) مطابقت داشت (Khorasaninejad et al., 2011). یکی از علل اصلی کاهش وزن تر اندام هوایی گیاه در طول تنش، به تولید گونه‌های فعال اکسیژن یا ROS مربوط می‌باشد، به طوری که در طول تنش خشکی، گونه‌های فعال اکسیژن افزایش یافته که موجب اختلال در سیستم انتقال الکترون شده و باعث ایجاد فعالیت‌های اکسیدانی در کلروپلاست، میتوکندری و میکروبادی‌ها (گلی‌اکسیزوم‌ها و پراکسیزوم‌ها) می‌شوند (Alizadeh et al., 2017; Reddy et al., 2004).

وزن خشک اندام هوایی

نتایج به‌دست آمده از تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد، اثر ساده سطوح مختلف آبیاری و اسیدهیومیک بر وزن خشک اندام هوایی به ترتیب در سطح احتمال یک و پنج درصد دارای اختلاف معنی‌دار آماری می‌باشد و اثر متقابل سطوح مختلف آبیاری و اسیدهیومیک بر این صفت اختلاف معنی‌داری نداشت (جدول ۲). بیشترین و کمترین وزن خشک اندام هوایی با میانگین ۲۷/۱۸ و ۱۸/۴۱ گرم به ترتیب در سطح ۱۱۵ و ۷۰ درصد ظرفیت زراعی بود. به طوری که افزایش سطوح آبیاری

باعث افزایش وزن خشک اندام هوایی شده است (شکل ۲).

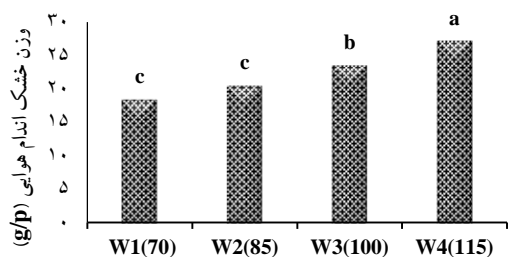
نتایج این تحقیق با نتایج اثر تنش کم‌آبیاری روی ریشه سرخارگل مطابقت داشت و مشخص شد که با افزایش تنش کم‌آبیاری، وزن خشک اندام هوایی کاهش می‌یابد (Alizadeh et al., 2017). همچنین در تحقیقی که به بررسی تأثیر تنش خشکی روی گیاه دارویی اکلیل کوهی (*Rosmarinus officinalis*) پرداخته شد نتایج مشابهی پیرامون کاهش وزن خشک اندام هوایی به‌دست آمد (Gorgini et al., 2017). تحت تنش کم‌آبی جذب مواد غذایی از طریق ریشه، به دلیل کاهش حجم آب خاک و همچنین توزیع عناصر غذایی در بافت خاک کاهش می‌یابد. علاوه بر این، انتقال مواد غذایی از ریشه به شاخه کاهش می‌یابد، در نتیجه از وزن خشک اندام هوایی کاسته می‌شود (Aghaei et al., 2017). بیشترین مقدار وزن خشک اندام هوایی در سطح ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر اسیدهیومیک و کمترین مقدار آن در سطح شاهد می‌باشد (شکل ۲). در تحقیقی که به منظور بررسی اثر تنش کم‌آبیاری و اسیدهیومیک بر ویژگی‌های مورفولوژیکی و فیتوشیمیایی سرخارگل (*Echinacea purpurea*) انجام شد، نتایج نشان داد که وزن خشک اندام هوایی در اثر افزایش مقادیر اسیدهیومیک افزایش یافت (Alizadeh et al., 2017) که مطابق نظر Jones و همکاران (2004)، اسیدهیومیک دسترسی بیشتر به عناصر غذایی را برای گیاه فراهم می‌کند، در نتیجه موجب افزایش اندام‌های هوایی می‌شود (Alizadeh et al., 2017)، بنابراین این افزایش توجیه‌پذیر است.

زیست‌توده خشک

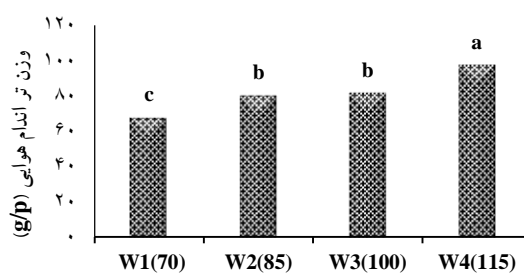
نتایج به‌دست آمده از تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد، اثر ساده سطوح مختلف آبیاری و اسیدهیومیک بر زیست‌توده خشک به ترتیب در سطح احتمال یک و پنج درصد دارای اختلاف معنی‌دار آماری می‌باشد و اثر متقابل سطوح مختلف آبیاری و اسیدهیومیک بر این صفت اختلاف معنی‌داری نداشت، به نحوی که بیشترین و کمترین مقدار زیست‌توده خشک به ترتیب با میانگین ۳۳/۶۴ و ۲۵/۱۴ گرم در سطح ۱۱۵ و ۷۰ درصد ظرفیت

مطابق شکل (۲) بیشترین مقدار زیست توده خشک با میانگین ۳۱/۷ گرم در تیمار ۵۰۰ میلی گرم در لیتر اسیدهیومیک و کمترین با میانگین مقدار ۲۶/۱۸ گرم در تیمار شاهد (بدون کود) می باشد که با سایر سطوح دارای اختلاف معنی دار آماری است و اثر متقابل سطوح مختلف آبیاری و اسیدهیومیک بر این صفت اختلاف معنی داری نداشت (جدول ۲).

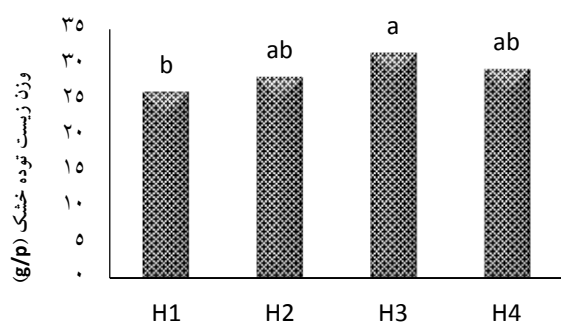
زراعی تیمار رژیم آبیاری می باشد که اختلاف معنی داری با شاهد ندارد و با کاهش رطوبت از ۱۱۵ تا ۷۰ درصد ظرفیت زراعی زیست توده خشک کاهش معنی داری یافت (شکل ۷). در تحقیقی که به بررسی اثر کم آبیاری و پلیمر سوپرچاذب بر خصوصیات مرفولوژیک و عملکرد لوییا سبز (*Phaseolus vulgaris* L.) پرداختند، نیز به نتایج مشابهی دست یافتند (Kameran et al., 2019).



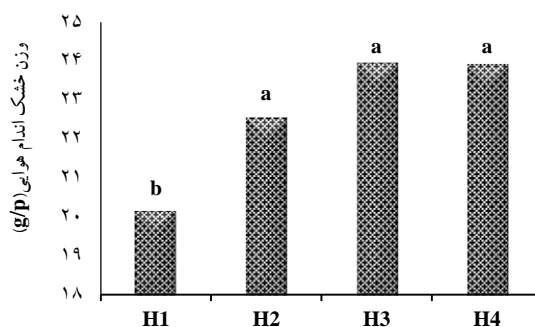
سطوح مختلف آبیاری (درصد ظرفیت زراعی)



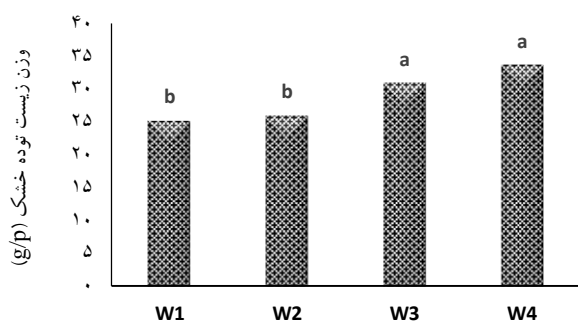
سطوح مختلف آبیاری (درصد ظرفیت زراعی)



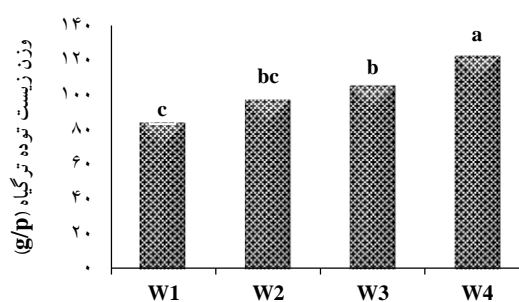
سطوح مختلف اسیدهیومیک (میلی گرم در لیتر)



سطوح مختلف اسیدهیومیک (میلی گرم در لیتر)



سطوح مختلف آبیاری (درصد)



سطوح مختلف آبیاری (درصد)

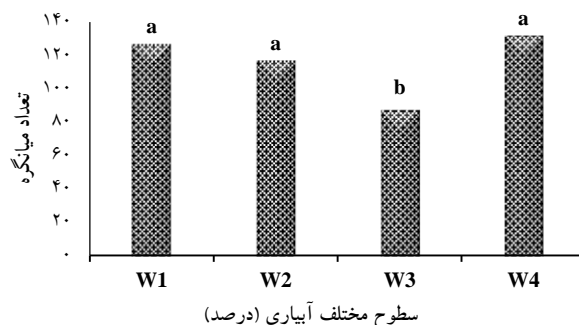
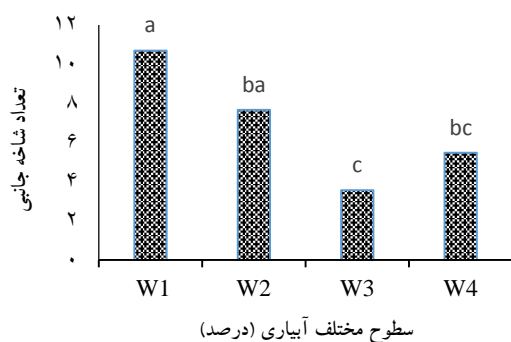
شکل ۲- تأثیر سطوح مختلف آبیاری بر وزن تر و خشک اندام هوایی و زیست توده کل استویا

تیمار آبیاری (W1: ۷۰ درصد ظرفیت زراعی، W2: ۸۵ درصد ظرفیت زراعی، W3: ۱۰۰ درصد ظرفیت زراعی (شاهد)، W4: ۱۱۵ درصد ظرفیت زراعی)، تیمار اسیدهیومیک (H1: صفر میلی گرم در لیتر (شاهد)، H2: ۲۵۰ میلی گرم در لیتر، H3: ۵۰۰ میلی گرم در لیتر و H4: ۷۵۰ میلی گرم در لیتر). در هر ستون برای هر تیمار حروف متفاوت نمایانگر اختلاف معنی دار در سطح $p \leq 0.05$ تحت آزمون LSD می باشد.

آبیاری بر تعداد شاخه جانبی، میانگرمه و زیست توده تر در سطح احتمال یک درصد معنی دار شد. به طوری که اثر ساده سطوح مختلف اسیدهیومیک و متقابل سطوح مختلف آبیاری و اسیدهیومیک بر تعداد شاخه جانبی و میانگرمه اختلاف معنی داری نداشت (جدول ۲). بیشترین و کمترین تعداد شاخه جانبی به ترتیب مربوط به سطح ۷۰ و ۱۰۰ درصد ظرفیت زراعی می باشد. سطوح آبیاری به جز سطح سوم بر تعداد میانگرمه تأثیر معنی داری نداشته است و هر سه سطح از نظر مرتبه در یک گروه قرار می گیرند. تیمارهای اول تا سوم آبیاری نسبت به تیمار چهارم آبیاری (۱۱۵ درصد ظرفیت زراعی) به ترتیب در حد ۳/۸۰، ۱۱/۲۲ و ۳۳/۶۵ درصد کاهش تعداد میانگرمه را نشان می دهد (شکل ۳). سطح اول تا چهارم آبیاری بر زیست توده تر روندی صعودی داشته و بیشترین مقدار با میانگرم ۱۲۲/۵ در سطح ۱۱۵ درصد ظرفیت زراعی و کمترین با میانگرم مقدار ۸۴/۲۵ در سطح ۷۰ درصد ظرفیت زراعی تیمار رژیم آبیاری به دست آمد (شکل ۳).

بر اساس نتایج تجزیه واریانس، سطوح مختلف آبیاری و اسیدهیومیک و برهم کنش رژیم های آبیاری و محلول پاشی اسیدهیومیک بر طول و قطر ریشه، وزن تر و خشک ریشه، تعداد گل و برگ، سطح برگ، نشب یونی ریشه و محتوای نسبی آب برگ تأثیر معنی داری نداشت (جدولهای ۲ و ۳). همچنین Sabouri و همکاران (۲۰۱۸) نیز عدم معنی دار بودن برهم کنش رژیم های آبیاری و محلول پاشی اسیدهیومیک را بر تعداد برگ گیاه دارویی مرزه (*Satureia hortensis*) گزارش کردند. در تحقیقی که Alizade ahmad abadi و همکاران (۲۰۱۷) به منظور بررسی اثر تنش کم آبیاری و اسیدهیومیک بر ویژگی های مورفولوژیکی و فیتوشیمیایی ریشه سرخارگل انجام دادند، نشان دادند که تنش کم آبیاری بر طول ریشه تأثیر معنی داری نداشته که با نتایج این تحقیق مشابه است.

تعداد شاخه جانبی، میانگرمه و زیست توده تر
با توجه به نتایج تجزیه واریانس داده ها، اثر سطوح مختلف



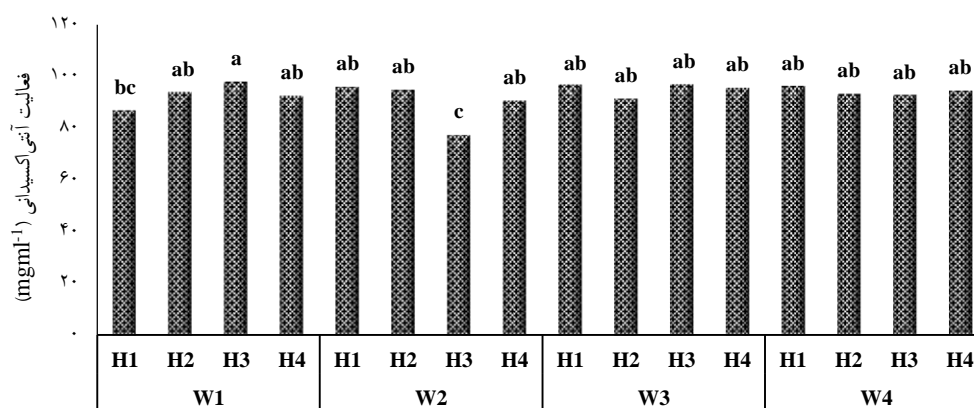
شکل ۳- تأثیر سطوح مختلف آبیاری بر تعداد میانگرمه و شاخه جانبی

تیمار آبیاری (W1: ۷۰ درصد ظرفیت زراعی، W2: ۸۵ درصد ظرفیت زراعی، W3: ۱۰۰ درصد ظرفیت زراعی (شاهد)، W4: ۱۱۵ درصد ظرفیت زراعی)، تیمار اسیدهیومیک (H1: صفر میلی گرم در لیتر (شاهد)، H2: ۲۵۰ میلی گرم در لیتر، H3: ۵۰۰ میلی گرم در لیتر و H4: ۷۵۰ میلی گرم در لیتر). در هر ستون برای هر تیمار حروف متفاوت نمایانگر اختلاف معنی دار در سطح $p \leq 0.05$ تحت آزمون LSD می باشد.

ریشه با میانگرم $97/81 \text{ mgml}^{-1}$ مربوط به سطح شاهد تیمار رژیم آبیاری و سطح ۵۰۰ میلی گرم در لیتر تیمار اسیدهیومیک می باشد و کمترین مقدار با میانگرم ۷۷/۳۲ در سطح ۸۵ درصد ظرفیت زراعی و سطح ۵۰۰ میلی گرم در لیتر اسیدهیومیک می باشد (شکل ۴).

فعالیت آنتی اکسیدانی ریشه

بر اساس نتایج تجزیه واریانس، اثر متقابل سطوح مختلف آبیاری و اسیدهیومیک بر فعالیت آنتی اکسیدانی ریشه در سطح احتمال پنج درصد دارای اختلاف معنی دار آماری بوده است (جدول ۳). بیشترین مقدار فعالیت آنتی اکسیدانی



شکل ۴- تأثیر متقابل تنش خشکی و اسیدهیومیک بر فعالیت آنتی‌اکسیدانی ریشه

تیمار آبیاری (W1): ۷۰ درصد ظرفیت زراعی، W2: ۸۵ درصد ظرفیت زراعی، W3: ۱۰۰ درصد ظرفیت زراعی (شاهد)، W4: ۱۱۵ درصد ظرفیت زراعی، تیمار اسیدهیومیک (H1): صفر میلی‌گرم در لیتر (شاهد)، H2: ۲۵۰ میلی‌گرم در لیتر، H3: ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر و H4: ۷۵۰ میلی‌گرم در لیتر. در هر ستون برای هر تیمار حروف متفاوت نمایانگر اختلاف معنی‌دار در سطح $p \leq 0.05$ تحت آزمون LSD می‌باشد.

گردید (Gorgini shabankareh *et al.*, 2018). بیشترین مقدار فلاونوئید کل ریشه با میانگین مقدار 0.70 mgQUEg^{-1} در سطح شاهد و کمترین مقدار فلاونوئیدکل ریشه با میانگین مقدار 0.49 mgQUEg^{-1} در سطح ۲۵۰ و ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر به‌دست آمد. در پژوهشی که به‌منظور بررسی اثر رژیم‌های آبیاری و کاربرد اسیدهیومیک بر برخی ویژگی‌های فیزیولوژیکی و فیتوشیمیایی ریشه سرخارگل انجام شد، به این نتیجه دست یافتند که اسیدهیومیک بر میزان فلاونوئیدکل ریشه معنی‌دار بوده، به گونه‌ای که بیشترین مقدار فلاونوئید در سطح ۱۰۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم اسیدهیومیک و کمترین در سطح شاهد به‌دست آمد (Alizade ahmad abadi *et al.*, 2017).

پرولین ریشه

نتایج تجزیه واریانس نشان می‌دهد که اثر ساده سطوح مختلف اسیدهیومیک و متقابل تنش خشکی و اسیدهیومیک بر پرولین ریشه در سطح احتمال یک درصد معنی‌داری می‌باشد (جدول ۳). در سطوح اول تا چهارم تیمار اسیدهیومیک به‌ترتیب مقادیر پرولین ریشه برابر با $71/91$ ، $55/95$ ، $32/60$ و $54/46$ می‌باشد که نشان‌دهنده کاهش و بعد افزایش میزان پرولین با افزایش میزان اسیدهیومیک است (شکل ۶). با توجه به اثر متقابل تنش خشکی و اسیدهیومیک بر پرولین ریشه، بیشترین مقدار پرولین ریشه مربوط به سطح ۱۱۵ درصد

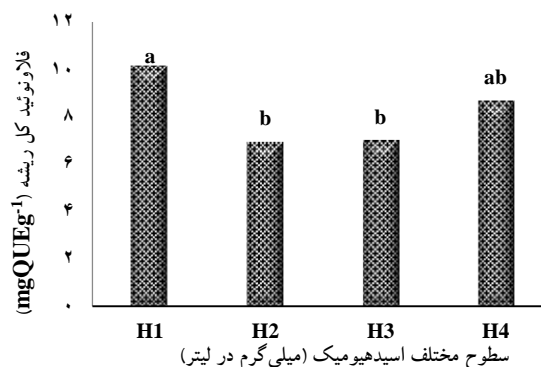
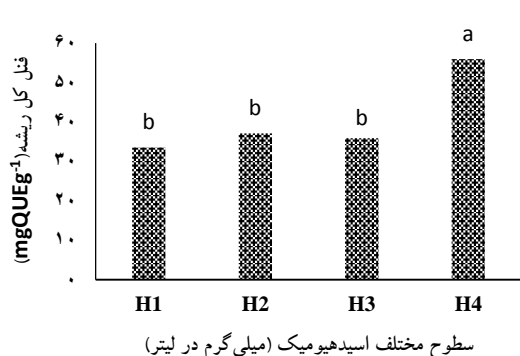
فنل کل و فلاونوئیدکل ریشه

با توجه به نتایج تجزیه واریانس، اثر سطوح مختلف اسیدهیومیک بر فنل کل و فلاونوئیدکل ریشه به‌ترتیب در سطح احتمال پنج و یک درصد دارای اختلاف معنی‌دار آماری است. به‌طوری‌که اثر ساده سطوح مختلف آبیاری و اثر متقابل سطوح مختلف آبیاری و اسیدهیومیک بر فنل کل و فلاونوئیدکل ریشه اختلاف معنی‌داری نداشت (جدول ۳). بیشترین میزان فنل کل ریشه با میانگین $55/95 \text{ mgQUEg}^{-1}$ مربوط به سطح ۷۵۰ میلی‌گرم در لیتر تیمار اسیدهیومیک و کمترین مقدار آن با میانگین $32/52 \text{ mgQUEg}^{-1}$ مربوط به سطح شاهد تیمار اسیدهیومیک بود که اختلاف معنی‌داری با سطوح ۲۵۰ و ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر (H2 و H3) نداشت و هر سه سطح در یک گروه قرار گرفتند (شکل ۵).

با توجه به نتایج، افزایش اسیدهیومیک موجب افزایش فنل کل ریشه می‌شود. همچنین Mozaffari و همکاران (۲۰۱۷) نیز افزایش معنی‌دار فنل کل ریشه گیاه دارویی خرفه (*Portulaca oleracea* L.) در سطح ۶۰۰ میلی‌گرم در لیتر را نسبت به شاهد گزارش کردند. در تحقیقی که به‌منظور بررسی تأثیر دور آبیاری و اسیدهیومیک بر خصوصیات مورفولوژیکی و بیوشیمیایی گیاه دارویی آویشن (*Thymus vulgaris* L.) انجام شد، گزارش کردند که کاربرد ۳۰۰ میلی‌گرم در لیتر اسیدهیومیک موجب افزایش معنی‌دار این صفت نسبت به شاهد

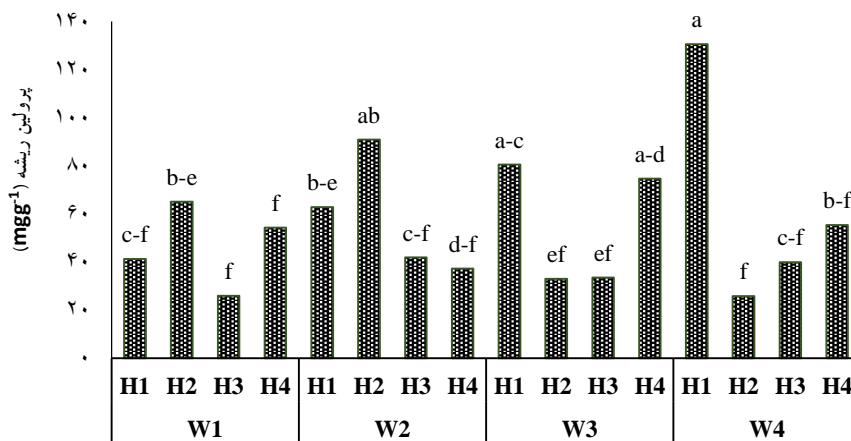
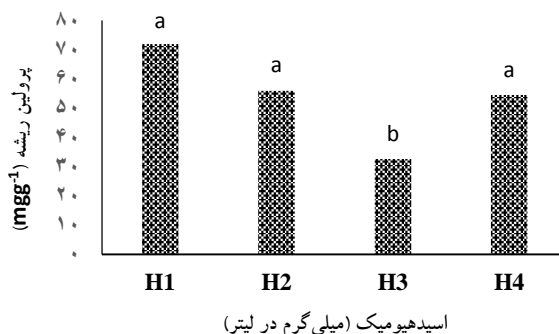
درصد ظرفیت زراعی تیمار رژیم آبیاری و سطح ۵۰۰ میلی گرم در لیتر تیمار اسیدهیومیک است.

ظرفیت زراعی تیمار رژیم آبیاری و عدم کاربرد اسیدهیومیک می باشد و کمترین مقدار پرولین ریشه مربوط به سطح ۷۰



شکل ۵- تأثیر سطوح مختلف اسیدهیومیک بر فنل کل و فلاونوئید کل ریشه

تیمار اسیدهیومیک (H1: صفر میلی گرم در لیتر (شاهد)، H2: ۲۵۰ میلی گرم در لیتر، H3: ۵۰۰ میلی گرم در لیتر و H4: ۷۵۰ میلی گرم در لیتر). در هر ستون برای هر تیمار حروف متفاوت نمایانگر اختلاف معنی دار در سطح $p \leq 0.05$ تحت آزمون LSD می باشد.



شکل ۶- تأثیر سطوح مختلف اسیدهیومیک و اثر متقابل سطوح آبیاری و اسیدهیومیک بر پرولین ریشه

تیمار اسیدهیومیک (H1: صفر میلی گرم در لیتر (شاهد)، H2: ۲۵۰ میلی گرم در لیتر، H3: ۵۰۰ میلی گرم در لیتر و H4: ۷۵۰ میلی گرم در لیتر). تیمار آبیاری (W1: ۷۰ درصد ظرفیت زراعی، W2: ۸۵ درصد ظرفیت زراعی، W3: ۱۰۰ درصد ظرفیت زراعی (شاهد)، W4: ۱۱۵ درصد ظرفیت زراعی)، در هر ستون برای هر تیمار حروف متفاوت نمایانگر اختلاف معنی دار در سطح $p \leq 0.05$ تحت آزمون LSD می باشد.

- coneflower. *Journal of Crops Improvement*, 19(1), 1-14. (In Persian)
- Badalzadeh, A., Rafieiolhossaini, M., Danesh, S. A., & Ghobadina, M. 2016. The effect of water deficit and different levels of cattle manure, chemical fertilizers and their combination on yield and some agromorphological characteristics of Moldavian balm medicinal plant. *Journal of crops improvement*, 18(1), 141-156. (In Persian)
- Bahrami, S., Soleimani, A., & Habibi, F. 2015. Effect of foliar spraying by humic acid on mineral leaf composition, yield and fruit quality of apple cv. 'Granny Smith'. *Journal of Crops Improvement*, 17(2), 517-529. (In Persian)
- Bathes, L. S., Waldren, R. P., & Teare, I. D. 1973. Rapid determination of free proline for water stress studies. *Journal of Plant and Soil*, 39: 205-207. (In Persian)
- Čereković, N., Pagter, M., Kristensen, H. L., Pedersen, H. L., Brennan, R., & Petersen, K. K. 2013. Effects of drought stress during flowering of two pot-grown blackcurrant (*Ribes nigrum* L.) cultivars. *Scientia horticulturae*, 162, 365-373.
- Chaudhary, P., Godara, S., Cheeran, A. N., & Chaudhari, A. K. 2012. Fast and accurate method for leaf area measurement. *International Journal of Computer Applications*, 49(9), 22-25.
- Chang, C. C., Yang, M. H., Wen, H. M., & Chern, J. C. 2012. Estimation of total flavonoid content in Propolis by two complementary colorimetric methods. *Journal Food Drug Anal*, 10, 178-182.
- Das, K., Dang, R., Shivan, T. N., & Sekeroglu, N. 2007. Influence of bio-fertilizers on the biomass yield and nutrient content in *Stevia rebaudiana* Bert. grown in Indian subtropics. *Journal of Medicinal Plants Research*, 1(1), 005-008.
- Ebrahimzadeh, M. A., Pourmorad, F., & Bekhradnia, A. R. 2008. Iron chelating activity, phenol and flavonoid content of some medicinal plants from Iran. *African Journal of Biotechnology*, 7(18).
- Farahdost, R. and Jafari, A.A. 2020. Effect of Drought stress on seed germination characteristics in the populations of four native species of *Onobrychis* sp. In Iran. *Iranian Journal of Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetic Research*, 27(2): 309-318. (In Persian)
- Farhadi, H., Azizi, M., & Nemati, S. 2017. The effect of water deficit stress on morphological characteristics and yield components of landraces (*Trigonella foenum-graecum* L.) fenugreek eight. *Crop Science Research in Arid Regions*, 1(1), (In Persian)
- Ferrara, G., Pacifico, A., Simeone, P & Ferrara, E.

نتیجه گیری کلی

با توجه به نتایج آزمایش می توان بیان نمود که سطوح مختلف آبیاری و اسید هیومیک تأثیر معنی داری بر گیاه دارویی استویا دارد. طی بروز کم آبیاری شدید ارتفاع بوته، طول اندام هوایی، وزن تر و خشک اندام هوایی، زیست توده تر و زیست توده خشک به جز تعداد شاخه جانبی و تعداد میانگره کاهش می یابد. در حالی که اعمال تنش غرقابی باعث افزایش این صفات شده است. کمترین ارتفاع بوته با میانگین ۸۷/۳۳ سانتی متر در تیمار ۷۰ درصد ظرفیت زراعی رژیم آبیاری و بدون مصرف اسید هیومیک و بیشترین با میانگین مقدار ۱۴۸/۳۳ در سطح شاهد تیمار رژیم آبیاری و ۷۵۰ میلی گرم در لیتر اسید هیومیک است. بیشترین و کمترین وزن تر اندام هوایی به ترتیب با میانگین ۹۷/۵ و ۶۷/۵ گرم در بوته در سطح ۱۱۵ و ۷۰ درصد ظرفیت زراعی تیمار رژیم آبیاری می باشد. یعنی با کاهش نیاز آبی از ۱۱۵ درصد به ۷۰ درصد نیاز آبی گیاه، ۳۰ گرم از وزن تر اندام هوایی کاسته شده است. بیشترین مقدار فعالیت آنتی اکسیدانی ریشه از سطح ۷۰ درصد ظرفیت زراعی و ۵۰۰ میلی گرم در لیتر اسید هیومیک حاصل شد. بنابراین بر اساس یافته ها می توان نتیجه گرفت که استویا به تنش کم آبیاری و تنش غرقابی در صورت استفاده از اسید هیومیک متحمل است.

منابع مورد استفاده

- Abedi, T., & Pakniyat, H. 2010. Antioxidant enzyme changes in response to drought stress in ten cultivars of oilseed rape (*Brassica napus* L.). *Czech Journal of Genetics and Plant Breeding*, 46: 27-34.
- Aghaei Joubani, K., Barzoli, M., Jafarian, V., & Shekari, F. 2018. Some physiological and biochemical responses of *Artemisia dracuncululus* to water deficit stress. *Journal of Plant Process and Function*, 6(19), 15-24. (In Persian)
- Ali, A., Gull, I., Naz, S., & Afghan, S. 2010. Biochemical investigation during different stages of in vitro propagation of *Stevia rebaudiana*. *Pak. Journal. Bot*, 42(4), 2827-2837.
- Alizade ahmad abadi, A., Khorasaninejad, S., & Hemmati, K. 2017. The Effect of Limited irrigation Stress and Humic Acid on the Some Morphological and Root Phytochemical Characteristics of Purple

- Hemmati, K., & Khalighi, A. 2011. The effect of drought stress on growth parameters, essential oil yield and constituent of Peppermint (*Mentha piperita* L.). *Journal of Medicinal Plants Research*, 5(22), 5360-5365. (In Persian)
- Kumar, R., Sharma, S., & Sharma, M. 2014. Growth and yield of natural-sweetener plant stevia as affected by pinching. *Indian Journal of Plant Physiology*, 19(2), 119-126.
- Mohammadi, L., Rizi, S., Mohammadkhani, A., & Barzegar, R. 2016. Quality improvement of New Guinea Impatiens by slow release fertilizer and humic acid application in medium culture. *Journal of Crops Improvement*, 18(3), 713-726. (In Persian)
- Mozaffari, S., Khorasaninejad, S., & Gorgini Shabankareh, H. 2017. The effects of irrigation regimes and humic acid on some of physiological and biochemical traits of Common Purslane in greenhouse. *Journal of Crops Improvement*, 19(2), 401-416. (In Persian)
- Najafi, N., & Mardomi, S. 2012. The effects of waterlogging, sewage sludge and manure on the growth characteristics of sunflower in a Sandy Loam Soil. *Journal of Water and Soil*. (In Persian)
- Ordone, A. A. L., Gomez, J. D., & Vattuone, M. A. 2002. Antioxidant activities of *Sechium edule* swartz extracts. *Food Chemistry*, 22: 452-452.
- Ramak, P., Khavari-Nejad, R., Hidari Sharifabad, H., Rafiee, M., & Khademi, K. 2006. The effect of water stress on dry weight and photosynthetic pigments in two Sainfoin species. *Iranian Journal of Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetic Research*, 14(2): 80-9. (In Persian)
- Rassam, G. 2015. Evaluation of water deficit on morphological and physiological traits of hyssop (*Hyssopus officinalis* L.). *Journal of Agronomy Sciences*, 5(10), 1-12. (In Persian)
- Sabouri, F., Sirousmehr, A., & Gorgini Shabankareh, H. 2018. Effect of irrigation regimes and application of humic acid on some morphological and physiological characteristics of Savory (*Satureja hortensis* L.). *Iranian Journal of Plant Biology*. 9(4). (In Persian)
- Sabzevari, S., & Khazaei, H.R. 2009. The Effect of foliar application with humic acid on growth, yield and yield components of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Journal of Agroecology*, 1(2), 53-56. (In Persian)
- Singh, N., Verma, S., & Yadav, K. 2011. Optimization of the Protocols for Surface Sterilization, Regeneration and Acclimatization of *Stevia rebaudiana* Bertoni. *American-Eurasian Journal of agriculture and Environmental Sciences*, 11(2): 221-2008. Preliminary study on the effects of foliar applications of humic acids on 'Italia' Table grape. In: *Proceedings of XXXth O.I.V World Congress of Vine and Wine Budapest*, 10-16 June. Bari University, Budapest, Hungary, 79- 87.
- Forouzandeh, M., Fanoudi, M., Arazmjou, E., & Tabiei, H. 2012. Effect of drought stress and types of fertilizers on the quantity and quality of medicinal plant Basil (*Ocimum basilicum* L.). *Indian Journal of Innovations and Developments*, 1(10), 734-737.
- Ghasemi Siani, E., Fallah, S., & Tadayyon, A. 2011. Study on yield and seed quality of *Plantago ovata* Forsk., under different nitrogen treatments and deficit irrigation. *Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants*, 27(3), 517-528. (In Persian)
- Gorgini shabankareh, H., & Khorasaninejad, S. 2017. Effect of bio-fertilizers and salicylic acid on the yeild and qualitative characteristics in rosemary under water-deficit regimes. *Journal of Crops Improvement*, 19(2), 475-491. (In Persian)
- Gorgini shabankareh, H., Khorasaninejad, S., abbasi, M., & tabasi, A. 2018. The effects of irrigation period and humic acid on morpho-physiological and biochemical traits of thyme (*Thymus vulgaris*). *Journal of Iranian Plant Ecophysiological Research*, 13(51), 67-82. (In Persian)
- Goyal, S. K., Samsheer, G. R., & Goyal, R. K. 2010. *Stevia (Stevia rebaudiana)* a bio-sweetener: a review. *International Journal of Food Sciences Nutrition*, 61(1), 1-10.
- Jin, R., Shi, H., Han, C., Zhong, B., Wang, Q., & Chan, Z. 2015. Physiological changes of purslane (*Portulaca oleracea* L.) after progressive drought stress and rehydration. *Scientia Horticulturae*, 194, 215-221.
- Kameran, Y., Nabavi Kalat, S.M., & Sadrabadi Haghighi, R. 2019. Effect of irrigation deficit and superabsorbent polymer on morphological characteristics and yield of green (*Phaseolus vulgaris* L.). *Iranian Journal of irrigation and drainage*, 1(14), 241-250. (In Persian)
- Kouchaki, A., Nassiri-Mahallati, M., & Azizi, G., 2004. The effects of water stress and defoliation on some of quantitative traits of *Zataria multiflora*, *Ziziphora clinopodioides*, *Thymus vulgaris* and *Teucrium polium*. *Iranian Agricultural Research*, 2 (1), 89-105. (In Persian)
- Khorasaninejad, S., Alizadeh Ahmadabadi, A., & Hemmati, K. 2018. The effect of humic acid on leaf morphophysiological and phytochemical properties of *Echinacea purpurea* L. under water deficit stress. *Scientia Horticulturae*, 239, 314-323.
- Khorasaninejad, S., Mousavi, A., Soltanloo, H.,

2012. Effects of water deficit stress on physiological reaction in *Fortuynia bungei* Boiss. Iranian Journal of Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetic Research, 20(2): 273-283. (In Persian)
- Zollinger, N., Kjelgren, R., Cerny-Koenig, T., Kopp, K., & Koenig, R. 2006. Drought responses of six ornamental herbaceous perennials. *Scientia Horticulturae*, 109(3), 267-274 .
- 227.
- Sun, J., Gu, J., Zeng, J., Han, S., Song, A., Chen, F & Chen, S. 2013. Changes in leaf morphology, antioxidant activity and photosynthesis capacity in two different drought-tolerant cultivars of chrysanthemum during and after water stress. *Scientia Horticulturae*, 161, 249-258.
- Tajamoliyan, M., Irannezhad Parizi, M.H., Malekinezhad, H., Rad, M.H. & Sodaizadeh, h.,

The effect of foliar application of humic acid on increasing *Stevia rebaudiana* tolerance under different irrigation regimes

F. Zarei¹, A. Hezarjaribi^{2*}, S. Khorasaninejad³ and M. Zakerinia⁴

1-M.Sc. graduated, Department of Water engineering, University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, I.R. Iran.

2*-Corresponding author, Assoc. Prof., Department of Water engineering, University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, I.R. Iran. Email: hezarjaribi@gau.ac.ir

3-Assist. Prof. Department of Horticulture, University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, I.R. Iran.

4- Assoc. Prof., Department of Water engineering, University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, I.R. Iran.

Received: 13.08.2020

Accepted: 07.03.2021

Abstract

In order to study the effect of foliar application of humic acid on the yield, yield components, and some physiological and phytochemical properties of *Stevia rebaudiana* under different irrigation regimes, a factorial experiment was conducted based on a randomized complete block design with three replications in the research campus of University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran. The treatments included four levels of irrigation regimes (70, 85, 100 (control), and 115% of field capacity) and humic acid foliar application at four concentrations (zero, 250, 500, and 750 mg/L). Irrigation regimes and humic acid treatments started from the 10-leaf stage and continued until the flowering stage. At full flowering stage, data collected for shoot and root length, root diameter, shoot and biomass fresh and dry weights, number of sub branches, flowers number, internodes number, leaves number, leaf area, root antioxidant activities, total phenol, total flavonoid, proline, ion linkage, and leaf relative water content. According to the results, the effect of different irrigation regimes on shoot height, shoot and biomass fresh and dry weights, sub-branches number, internodes number, was significant ($p < 0.01$). By flooding, the plant height, shoot and biomass fresh and dry weights were increased. The interaction effect of drought stress by humic acid was significant for plant height, root antioxidant activity, and proline. Low irrigation stress had negative effect on the growth traits but humic acid foliar application had moderated the negative effects caused by low irrigation stress. Therefore, based on the findings, it was concluded that stevia is a resistant plant to both flooding and drought stress and its resistance mechanisms to drought stress for maintaining vegetative yield components, are to increase osmolytes and phenolic compounds.

Keywords: Proline, Antioxidant Activity, Total Flavonoid, Total Phenol, Dry Weight.