

Effect of different levels of humic acid and nano-zinc fertilizer on the antioxidant enzyme activities And essential oil of Savory (*Satureja hortensis* L.)

Zahra Najafi vafa^{1*}, Alireza Sirousmehr², Madine Bijhani³

1- Corresponding Author, PhD student, Department of Agronomy, College of Agriculture, University of Kurdistan, Sanandaj, Iran. zahranajafivafa.64@gmail.com

2- Assistant Professor of Agronomy, Department of Agronomy, College of Agriculture, University of Zabol, Zabol, Iran. a_sirousmehr@yahoo.com

3- PhD student, Department of Agroecology, College of Agriculture, University of Shahid Beheshti, Tehran, Iran. bijhani.m90@gmail.com

Received Date: 2019/10/30

Accepted Date: 2020/11/25

Abstract

Introduction: Fertilizer management is utmost important factor in success of pharmaceutical crops cultivation. Application of biological fertilizers is important in production of these plants . Therefore the use of this type of fertilizers in the production of medicinal plants is expanding and seems to be becoming a global approach.

Material and methods: The effect of humic acid and nano-chalate zinc fertilizer on activity of catalase, peroxidase, superoxide dismutase enzymes and essential oil of savory plant was investigated using a factorial experiment based on completely randomized design two factors and with four replications in a greenhouse at Zabol University in 2014. The factors were humic acid with four levels (zero, 5.0, 1 and 1.5 mg/L) and nano-chalate zinc fertilizer with four levels (0, 50, 100 and 200 g/L).

Results and discussion: The results of variance analysis showed that humic acid, nano zn chelated fertilizer and the interaction of factors had significant effects at 1 % probability level on leaf length, leaf area index, chlorophyll index, essential oil content and zinc conten, phosphorus, catalase enzyme, peroxidase enzyme and superoxidase dismutase enzyme but the interaction of nano zinc chelated and humic acid fertilizers was not significant on plant dry weight. The treatments showed significant effects on chlorophyll index, leaf length and area, enzyme activity of catalase, peroxidase, superoxide dismutase, zin contentc and percentage of essential oil. At all levels of humic acid, application of nano fertilizer increased the activity rate of catalase and peroxidase enzymes, zinc, phosphorus and essential oil percentage in the application of 1.5 mg/L humic acid and 200 g/L nano fertilizer increased 58, 34, 75, 26 and 77%, respectively. Application of 1.5 mg/L humic acid and 200 g/L of nano fertilizer had the greatest effect on leaf area index (4), plant dry weight (16.15 g), leaf length (3/20 cm), zinc conten (0/950 mg/kg) catalas enzyme ($1.88 \text{ Mg}^{-1} \text{ Protein.Min}^{-1}$) and peroxidase enzyme ($0.18 \text{ Mg}^{-1} \text{ Protein.Min}^{-1}$).

Conclusions: Based on the results, the combined application of nano-chelate fertilizer of zinc and humic acid (N4H4) showed a significant advantage over the separate application and non-use treatments of nano-chelate zinc and humic acid (N1H1).

Keywords: Organic acid, plant nutrition, nano fertilizers.

تأثیر سطوح مختلف اسید هیومیک و کود نانو روی بر فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدان و اسانس گیاه دارویی مرزه (*Satureja hortensis* L.)

زهرا نجفی وفا^{۱*}، علیرضا سیروس مهر^۲، مدینه بیژنی^۳

۱- نویسنده مسئول و دانشجوی دکتری زراعت و فیزیولوژی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه کردستان، سنندج، ایران

zahra_najafivafa@yahoo.com

۲- استادیار گروه زراعت، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زابل، زابل، ایران

a_sirousmehr@yahoo.com

۳- دانشجوی دکتری گروه کشاورزی اکولوژی، پژوهشکده علوم محیطی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران

bijani.m90@gmail.com

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۰۹/۰۵

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۰۸/۰۸

چکیده

به منظور بررسی پاسخ‌های مورفولوژیکی و فیزیولوژیکی گیاه دارویی مرزه (*Satureja hortensis* L.) با غلظت‌های مختلف اسید هیومیک و نانوکلات روی، آزمایشی گلخانه‌ای به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با چهار تکرار در دانشگاه زابل در سال ۱۳۹۵ اجرا شد. فاکتور اول شامل چهار غلظت اسید هیومیک (صفر، ۵۰، ۱۰۰ و ۱۵۰ میلی‌گرم در لیتر) و فاکتور دوم شامل نانوکلات روی با ۴ سطح (صفر، ۰/۵، ۱ و ۲ گرم در لیتر) بود. صفات اندازه‌گیری شده شامل وزن خشک بوته، طول برگ، شاخص کلروفیل، سطح برگ، فعالیت آنزیم کاتالاز، فعالیت آنزیم پراکسیداز، فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز، مقدار عنصر روی، عنصر فسفر و اسانس مرزه بودند. نتایج تجزیه واریانس نشان داد که اثر مقادیر مختلف مصرف کود نانو کلات روی و اسید هیومیک و اثر متقابل تیمارها بر طول برگ، سطح برگ، شاخص کلروفیل، مقدار اسانس، مقدار روی، فسفر، آنزیم کاتالاز، پرواکسیداز و سوپراکسیداز دیسموتاز در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار شد. اما برهمکنش اسید هیومیک و کود نانو کلات روی وزن خشک بوته معنی‌دار نشد. اسید هیومیک تا ۱۵۰ میلی‌گرم در لیتر همراه با ۲ گرم در لیتر نانوکلات روی به ترتیب منجر به افزایش ۶۴ و ۷۵ درصدی وزن خشک بوته و سطح برگ در مقایسه با تیمار شاهد گردید. بیشترین درصد اسانس (۲/۱۷) و شاخص کلروفیل (۱۲/۰۵) نیز در کاربرد محلول‌پاشی ۱۵۰ میلی‌گرم در لیتر اسید هیومیک به همراه ۲ گرم در لیتر نانوکلات روی به دست آمد. تیمار شاهد در محتوای عنصر روی و فسفر در مقایسه با بالاترین سطح استفاده از اسید هیومیک و نانوکلات روی به ترتیب ۷۷ و ۲۶ درصد کمتر بود. بیشترین فعالیت آنزیم پراکسیداز و فعالیت آنزیم کاتالاز نیز در شرایط محلول‌پاشی ۱۵۰ میلی‌گرم در لیتر اسید هیومیک و ۲ گرم در لیتر نانوکلات روی مشاهده شد. کاربرد بالاترین سطوح اسید هیومیک و نانوکلات روی باعث افزایش ۷۷ درصدی روی و ۲۶ درصدی فسفر در مقایسه با شاهد شد. بیشترین سطح برگ (۴ سانتی‌متر مربع)، وزن خشک بوته (۱۶/۱۵ گرم)، طول برگ (۳/۰۰۰۰۲ سانتی‌متر)، مقدار روی (۰/۹۵۰۰۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم)، آنزیم کاتالاز (۱/۸۸ میکرومول در دقیقه در میلی‌گرم پروتئین) و آنزیم پراکسیداز (۰/۱۸۰ میکرومول در دقیقه در میلی‌گرم پروتئین) در تیمار (۱۵۰ میلی‌گرم در لیتر اسید هیومیک و ۲ گرم در لیتر کود نانو کلات روی) به دست آمد.

کلمات کلیدی: آنزیم‌های آنتی اکسیدان، درصد اسانس، گیاه دارویی، نانو کود روی.

مقدمه

هیومیک سبب افزایش درصد اسانس، پرولین، فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و قندهای محلول در گیاه آویشن باغی گردیده است. تاثیر مثبت اسید هیومیک بر صفات رویشی، رنگیزه‌های فتوسنتزی و کربوهیدرات گیاه دارویی مرزه پیش از این نیز گزارش گردیده بود (Hosseini et al., 2019). (al., 2017). Sabouri et al. نشان دادند که سطوح مختلف اسید هیومیک تفاوت معنی‌داری بر شاخص‌های مورفولوژیکی، رنگیزه‌های فتوسنتزی و کربوهیدرات در گیاه مرزه داشته است. بهبود شاخص‌های رشدی گیاه دارویی نعناع گربه‌ای (*Nepeta cataria*) با کاربرد اسید هیومیک در گزارش Boyeri Deh Sheikh et al. (2015) نیز مشاهده گردید. همچنین در بررسی نعناع سبز مشخص گردید که غلظت ۱۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر اسید هیومیک سبب افزایش معنی‌دار رنگیزه‌های فتوسنتزی محتوای فنل کل و فعالیت آنتی‌اکسیدانی گیاه گردید (Rostami et al., 2018). Alizadeh et al. (2018) بهبود عملکرد اندام هوایی، درصد و عملکرد اسانس گیاه مرزه خوزستانی را حاصل افزایش فراهمی جذب بیشتر عناصر غذایی و افزایش فتوسنتز گیاه در کاربرد اسید هیومیک عنوان کردند. اثر مثبت اسید هیومیک بر گیاه دارویی مرزه پیش از این نیز گزارش گردیده بود (Sabouri et al., 2017). روی یکی از عناصر کم‌مصرف ضروری است که در ساختمان چندین آنزیم وجود دارد (Auld, 2001). نقش این عنصر در افزایش هدایت روزنه‌ای و فتوسنتز، (Cakmak and Engels, 1999)، تنظیم بیان ژن (Cakmak, 2000)، متابولیسم پروتئین، متابولیسم اکسین و حفظ یکپارچگی غشاهای سلولی (Alloway, 2008) به خوبی مورد بررسی قرار گرفته است. هر چند وجود این فلز در خاک برای رشد طبیعی گیاهان ضروری است، غلظت‌های بالای این عنصر می‌تواند از طریق افزایش رادیکال‌های آزاد سمی و القاء تنش اکسیداتیو عاملی برای بازدارندگی رشد و ایجاد علائم سمیت محسوب گردد (Luo et al., 2010). بنابراین تعیین میزان مطلوب آن از اهمیت بسزایی برخوردار است.

مرزه (*Satureja hortensis* L.) گیاهی یک ساله از تیره نعناعیان است که دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانی، ضد سرطان، اشتهاآور، مدر، تصفیه‌کننده خون، ضد انگل، ضد نفخ، ضد اسهال، ضد سرفه و خلط‌آور می‌باشد. از اسانس و ترکیبات متعدد استحصالی از این گیاه در صنایع غذایی، عطرسازی و دارویی استفاده می‌شود (Zarezadeh et al., 2015). اغلب اراضی کشور در زمره خاک‌های خشک و نیمه خشک قرار دارند که داری pH قلیایی و مقدار مواد آلی اندکی هستند. قلیایی بودن این خاک‌ها و کمبود مواد آلی، باعث کاهش حلالیت و تحرک عناصر پرمصرف و کم مصرف مورد نیاز گیاه می‌گردد. جهت رفع این مشکل، استفاده از کودهای شیمیایی طی سال‌های اخیر افزایش یافته است ولی مصرف بی‌رویه این کودها در درازمدت موجب مشکلات فراوانی از جمله تخریب جمعیت میکروبی خاک، آلودگی‌های زیست محیطی گردیده و سلامت بشر را مورد تهدید قرار داده است (Melero et al., 2008). کاهش مخاطرات زیست محیطی همگام با افزایش عملکرد گیاه، نیازمند به کار بردن تکنیک‌های سازگار با طبیعت می‌باشد. بنابراین در نظام‌های کشاورزی پایدار، کاربرد اسیدهای آلی می‌تواند از اهمیت ویژه‌ای در افزایش تولید محصول و حفظ حاصلخیزی پایدار خاک برخوردار باشد. مقادیر بسیار کم از اسیدهای آلی به دلیل وجود ترکیبات هورمونی، اثرات قابل ملاحظه‌ای در بهبود خصوصیات فیزیکی، شیمیایی و بیولوژیکی خاک و افزایش تولید و بهبود کیفیت محصولات کشاورزی دارند (Rostami et al., 2018; Hosseini et al., 2019). بنابراین در این شرایط استفاده از کودهای طبیعی از جمله اسید هیومیک بدون اثر مخرب زیست محیطی جهت بالا بردن عملکرد می‌تواند مثر ثمر واقع شود. از اسید هیومیک به عنوان کود آلی دوستدار طبیعت نیز نام برده می‌شود (Samavat and Malakouti, 2004). Gorgini (2018) Shabankareh et al. گزارش کردند که اسید

(Yadegari et al., 2014). بنابراین هدف از این تحقیق، بررسی اثر سطوح مختلف اسید هیومیک و کود نانو کلات روی بر صفات مورفولوژیکی و فیزیولوژیکی گیاه مرزه بوده است.

مواد روش‌ها

به منظور بررسی اثر محلول پاشی اسید هیومیک و نانوکلات روی بر گیاه دارویی مرزه آزمایشی به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با چهار تکرار در گلخانه تحقیقاتی دانشگاه زابل در سال ۱۳۹۵ اجرا شد. فاکتور اول شامل اسید هیومیک در چهار سطح صفر، ۱۰۰ و ۱۵۰ میلی گرم در لیتر و فاکتور دوم شامل نانوکلات روی در چهار سطح شامل صفر، ۰/۰۵، ۱ و ۲ گرم در لیتر بود. اسید هیومیک با نام تجاری هیومکسن که ساخت شرکت کشاورزی هامون که محتوای ۳۰-۱۰٪ اسید هیومیک، ۲۴-۲۰٪ اکسید منیزیم، ۱۰-۸٪ پتاسیم، ۳-۲٪ فسفر، ۵/۲-۲٪ روی، ۱/۰٪ مس، ۱/۰٪ منگنز، ۳-۲٪ نیتروژن، ۵/۲-۲٪ آهن و ۵-۴٪ اسید فولیک بود استفاده گردید. نانوکلات روی (حاوی ۱۲ درصد روی) از شرکت صدور احرار سبز خریداری شد. قبل از شروع، نمونه خاک به منظور تعیین میزان عناصر موجود در آن به طور تصادفی تهیه و برخی ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی آن اندازه‌گیری شد. تعیین بافت خاک به روش هیدرومتری در نمونه‌های خاک (Boyukus, 1962) و اندازه‌گیری ویژگی‌های شیمیایی خاک مانند اسیدیته و شوری به روش گل اشباع (Page et al., 1982)، مواد آلی به روش والکلی و بلاک (Walkley and Black, 1934)، نیتروژن کل خاک به روش

استفاده از ترکیبات نانو با خصوصیات مطلوب مانند رهایش کنترل شده، غلظت موثر، قابلیت حل‌پذیری مناسب، ثبات و تاثیرگذاری بالا سبب بهبود تغذیه گیاهی می‌گردد (Naderi et al., 2013). با به کارگیری ترکیبات نانو به عنوان جایگزین کودهای مرسوم، عناصر غذایی به تدریج و به صورت کنترل شده در خاک آزاد می‌شوند که سبب کاهش سمیت خاک، به حداقل رسیدن اثرات منفی ناشی از مصرف بیش از حد کود و کاهش تعداد دفعات کاربرد کود می‌گردد (Liu and Lal, 2015). مطالعات انجام شده در مورد تاثیر کاربرد ترکیبات نانو بر خصوصیات کمی و کیفی گیاه دارویی مرزه بسیار اندک می‌باشد. Mafakheri et al. (2018) با بررسی تاثیر نانوکلات روی بر صفات مورفولوژیکی و فیتوشیمیایی گیاه دارویی بادرنجوبه دنايي نشان دادند که محلول پاشی نانوکلات روی در مقایسه با عدم محلول پاشی به طور معنی داری صفات رویشی گیاه، میزان کلروفیل a، کلروفیل b و درصد اسانس را افزایش داد. آن‌ها بیان داشتند که حضور روی با تاثیر بر بیوسنتز هورمون‌ها و دخالت در غلظت عناصر غذایی درگیر در تشکیل کلروفیل (مانند آهن و پتاسیم) سبب بهبود صفات کمی و کیفی در گیاه می‌گردد. Fallahi et al. (2016) در بررسی اثر محلول پاشی منابع مختلف روی بر عملکرد و ویژگی‌های فیتوشیمیایی گیاه ریحان به این نتیجه رسیدند که تاثیر کاربرد نانوکلات روی (به ویژه در مقدار ۳ گرم در لیتر) در افزایش عملکرد و مواد موثره گیاه ریحان، موثرتر از کودهای سولفات روی بود. برتری کلات روی به شکل نانو پیش از این با بررسی قندهای محلول گیاه نخود در تنش شوری به اثبات رسیده بود

جدول ۱. خصوصیات فیزیکی و شیمیایی خاک مزرعه

Table 1. Physical and chemical properties of soil

soil texture	Cu Available (mg/kg)	Zn Available (mg/kg)	Fe Available (mg/kg)	K Available (mg/kg)	P Available	OC %	N total	pH	EC dSm ⁻¹
Loam clay	1.36	0.78	1.8	250	12	0.288	0.03	7.20	3.4

حاوی ۱۰ بوته) انجام شد. محلول‌پاشی اسید هیومیک در دو مرحله ۴ برگگی و قبل از گلدهی (دو هفته پس از محلول‌پاشی اول) (Hosseinian et al., 2019). محلول‌پاشی نانوکود روی نیز در دو مرحله شامل ۶ برگگی و ۱۵ روز پس از آن (Moghimipour et al., 2014) و به همان میزان از منبع نانو کلات روی ۱۲ درصد انجام شد. روش محلول‌پاشی بدین جهت انتخاب گردید. بر طبق پژوهش‌های انجام شده جذب و انتقال عناصر از برگ به سهولت بیشتری انجام می‌گیرد (Moghimipour et al., 2014؛ Fallahi et al., 2016). با این حال به دلیل کاهش تبخیر و سطح تماس حداکثری برگ و نفوذ بهتر محلول به سلول‌های اپیدرمی، محلول‌پاشی در هنگام عصر انجام شد.

برداشت در تاریخ ۱۵ اریبشت صورت گرفت و ارزیابی صفات مورفولوژیک و فیزیولوژیک شامل طول برگ، سطح برگ، وزن خشک بوته، شاخص کلروفیل، فعالیت آنزیم کاتالاز، فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز، فعالیت آنزیم پراکسیداز، غلظت عناصر روی و فسفر و درصد اسانس انجام شد.

استخراج عصاره پروتئینی

به منظور استخراج و اندازه‌گیری آنزیم‌ها برگ‌های فریز شده را در هاون چینی ریخته و نیتروژن مایع به آن اضافه شد. سپس برگ‌ها به خوبی کوبیده شده تا کاملاً خرد شوند. ۰/۵ گرم از پودر برگ آسیاب شده به میکروتیوب‌های ۲ میلی‌لیتری منتقل شد و با افزودن یک میلی‌لیتر از بافر استخراج، نخست ورتکس شده و سپس طی ۱۵ دقیقه با دور ۱۴۰۰۰ rpm در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد، سانتریفیوژ (مدل Unico UV- 2100 ساخت آمریکا) شدند. پس از اتمام سانتریفیوژ، عصاره رویی با استفاده از سمپلر برداشته و به میکروتیوب‌های ۲ میلی‌لیتری منتقل شدند و دوباره به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۱۴۰۰۰ rpm در دمای ۴ درجه سانتی‌فیوژ شدند. پس از اتمام سانتریفیوژ، عصاره رویی با استفاده از سمپلر به میکروتیوب‌های با همان حجم منتقل

کجدال، فسفر قابل جذب خاک به روش اولسن و همکاران (Olsen et al., 1954)، پتاسیم قابل جذب به روش فلیم فتومتر (پس از عصاره‌گیری با استات آمونیوم ۱ نرمال) و عناصر ریزمغذی آهن، مس و روی قابل جذب با عصاره‌گیر DTPA (Lindsay and Norvell, 1978.) انجام شد (جدول ۱).

بذور گیاه مرزه از مرکز تحقیقات کشاورزی زابل تهیه و در ۲۰ بهمن ماه در گلدان‌های پلاستیکی با قطر دهانه ۲۰ سانتی‌متر و ارتفاع ۱۸ سانتی‌متر با ۵ کیلوگرم خاک (حاوی خاک و ماسه) کشت گردید. گیاهان در شرایط گلخانه‌ای ۲۰ الی ۳۰ درجه سانتی‌گراد به ترتیب دمای شبانه و روزانه و ۴۰ الی ۶۰ درصد رطوبت نسبی نگهداری می‌شدند. در طول دوره رشد، آبیاری گلدان‌ها، به صورت وزنی بر اساس ظرفیت مزرعه انجام شد. به این ترتیب که ابتدا یکی از گلدان‌های آزمایش با خاک پر شده و توزین گردید. سپس گلدان، چندین مرتبه به فاصله‌ی یک ساعت به یک ساعت از آب اشباع شد، برای جلوگیری از تبخیر، سطح گلدان توسط یک فویل پوشیده شد. با خروج آب ثقلی، وزن گلدان به طور مرتب یادداشت می‌شد و به‌طور مرتب کم می‌شد تا زمانی که وزن ثابت ماند (نشان‌دهنده رطوبت خاک در حد ظرفیت مزرعه). با تفاضل وزن اخیر و وزن خاک خشک، مقدار آب لازم برای رسیدن خاک گلدان‌ها به حد ظرفیت مزرعه مشخص گردید (Hajebi and Heidari Sharifabadi, 2005). علاوه بر آن در طول فصل رشد مراقبت‌های زراعی لازم از جمله مبارزه با علف‌های هرز و بیماری‌ها به صورت منظم انجام گرفت. طی دو بار محلول‌پاشی اسید هیومیک یک بار در مرحله‌ی ۴ برگگی و بار دیگر قبل از گلدهی (دو هفته پس از محلول‌پاشی اول) انجام شد (Hosseinian et al., 2019). اسید هیومیک تجاری دارای مواد آلی ۱۹/۵ درصد اسید هیومیک ۱۳/۲ درصد و فالویک اسید ۱/۱ درصد نیز جهت اعمال تیمارها استفاده شد. در غلظت‌های تعیین شده (حجم توصیه شده‌ی شرکت سازنده معادل با ۱۰۰ میلی‌لیتر برای هر گلدان

شدند. میکروتیوب‌های حاوی عصاره در زمان سایش برگ‌ها و سانتیفریوژ نمونه‌های دیگر در داخل ظرف یخ نگهداری شده و در صورت عدم استفاده، به فریزر ۸۰- درجه سانتی‌گراد انتقال داده شد و از این عصاره برای سنجش فعالیت آنزیم‌های کاتالاز و سوپراکسید دیسموتاز استفاده گردید و جذب کلیه واکنش‌ها با استفاده از دستگاه اسپکتوفتومتری (مدل Unico UV- 2100 ساخت آمریکا) اندازه‌گیری شد (Beauchamp and Fridovich, 1971).

اندازه‌گیری فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز

سنجش فعالیت آنزیم SOD با استفاده از روش Ries, (Giannopolitis and 1977) اندازه‌گیری شد. مخلوط واکنش آنزیمی شامل ۹۳۵ میکرولیتر بافر فسفات ۵۰ میلی مولار حاوی EDTA ۰/۱ میلی مولار، متیونین ۱۳ میلی مولار و نیتروبلو-تترازولیوم (Nitroblue-tetrazolium) (NBT)

۷۵ میکرو مولار و ۱۵ میکرولیتر ریبوفلاوین ۰/۱۲ میلی مولار و ۵۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی استخراج شده بود. پس از آماده سازی نمونه‌های کنترل (شاهد) و بلانک، به منظور اندازه‌گیری فعالیت آنزیمی، نمونه بلانک به مدت ۱۵ دقیقه در تاریکی قرار داده شد و نمونه‌های شاهد و عصاره آنزیمی، به مدت ۱۵ دقیقه در شیکر با دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و دارای دو عدد لامپ فلورسنت ۲۰ وات با ۱۰۰ دور در دقیقه شیک شدند. سپس مقدار جذب در طول موج ۵۶۰ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر خوانده شد. یک واحد SOD به مقدار آنزیمی گفته می‌شود که سبب مهار ۵۰ درصد NBT فورمازان (Formazan) شود در نهایت، فعالیت آنزیمی SOD با استفاده از فرمول (۱) محاسبه و بر حسب میکرومول در دقیقه در میلی‌گرم پروتئین بیان شد.

$$\text{فرمول (۱)} \quad \text{od فعالیت sod} = 100 - \frac{(\text{OD control} - \text{OD sampel})}{\frac{\text{OD control}}{50}} * 100$$

اندازه‌گیری فعالیت کاتالاز

سنجش فعالیت آنزیم کاتالاز با استفاده از محاسبه کاهش جذب H_2O_2 (کاهش جذب H_2O_2) در ۲۴۰ نانومتر و به روش (Dhindasa et al., 1981) انجام شد مخلوط واکنش شامل ۲/۸۷ میلی‌لیتر بافر پتاسیم فسفات ۵۰ میلی مولار با (pH=۷/۸) ۳۰ میکرولیتر آب اکسیژنه ۱۵ میلی مولار می‌باشد. سپس ۱۰۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی را اضافه کرده و واکنش شروع می‌شود. میزان H_2O_2 موجود در مخلوط واکنش پس از یک دقیقه با استفاده از ضریب خاموشی ($\epsilon=0/28 \text{ CM}^{-1} \text{ Mmol}^{-1}$) و فرمول (۲) $A = \epsilon bc$ محاسبه شد که نشان دهنده میزان فعالیت آنزیم است. A معادل جذب خوانده شده، E ضریب خاموشی، c غلظت H_2O_2 و b طول کوط (۱ سانتی متر) می‌باشد. فعالیت آنزیم به صورت واحد آنزیمی بر حسب مقدار پروتئین کل (میلی‌گرم) موجود در ۱۰۰ میکرولیتر عصاره (بدست آمده از روش برادفورد) در یک دقیقه محاسبه گردید.

اندازه‌گیری فعالیت پراکسیداز

اندازه‌گیری آنزیم پراکسیداز بر اساس میزان اکسید شدن گایاکول توسط این آنزیم انجام گردید. در این روش نیم گرم نمونه برگگی در ازت مایع کاملاً خرد و با دو میلی-لیتر بافر استخراج مخلوط شد و مخلوط حاصل به مدت ۱۵ دقیقه با دور ۱۳۰۰۰ سانتیفریوژ (مدل ۵۸۱۰ eppendorf ساخت آلمان) گردید. سپس فاز بالایی آن جدا شد. ۳۳ میکرولیتر از عصاره استخراج شده را با یک میلی-لیتر از محلول پراکسیداز مخلوط و به مدت یک دقیقه به فواصل ۱۰ ثانیه در طول موج ۴۷۰ نانومتر با اسپکتوفتومتر میزان جذب آن خوانده شد (Chance and Maehly, 1995).

تعیین عناصر فسفر و روی

نمونه‌های برگگی فراهم شده (در مرحله پس از گلدهی) پس از خشک شدن در آون در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد

تجزیه آماری

تجزیه واریانس داده‌های به دست آمده با استفاده از نرم افزار آماری SAS ورژن ۹/۱ انجام شد. مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون دانکن در سطح احتمال پنج درصد صورت گرفت. رسم نمودارها با کمک نرم افزار Excel انجام شد.

نتایج و بحث

فعالیت آنزیم‌های سوپراکسیداز دیسموتاز، کاتالاز و پراکسیداز

نتایج تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که اثر ساده و متقابل اسید هیومیک و نانو کلات روی بر فعالیت آنزیم سوپراکسیداز دیسموتاز، آنزیم‌های کاتالاز و پراکسیداز در گیاه مرزه معنی دار بود (جدول ۲). مقایسه میانگین‌ها برای اثر متقابل اسید هیومیک و کود نانو کلات روی مشخص کرد محلول پاشی تیمارهای مورد بررسی سبب افزایش معنی دار فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانسی در گیاه مرزه گردیده است. در مقایسه میانگین‌ها برای اثر متقابل کود نانو کلات روی و اسید هیومیک برای آنزیم سوپراکسیداز دیسموتاز مشخص شد که تیمار ۱ گرم در لیتر کود نانو کلات روی به همراه مصرف ۱۵۰ میلی گرم در لیتر اسید هیومیک (N_3H_4) با میانگین ۱/۰۲۸ بیشترین فعالیت سوپراکسیداز دیسموتاز مشاهده گردید. اما در مقایسه‌ی سطوح محلول پاشی مشخص گردید که کاربرد ۱۵۰ میلی گرم در لیتر اسید هیومیک به همراه ۲ گرم در لیتر نانو کلات روی به ترتیب با میانگین ۱/۸۸ و ۰/۱۸۰ بیشترین فعالیت آنزیم‌های کاتالاز و پراکسیداز و تیمار شاهد به ترتیب با میانگین ۰/۴۶۳، ۰/۷۵ و ۰/۱۱۸ کمترین میزان فعالیت آنزیم‌های آنزیم سوپراکسیداز دیسموتاز، کاتالاز و پراکسیداز و را به خود اختصاص دادند (جدول ۳). افزایش آنتی اکسیدان تحت تاثیر اسید هیومیک گویای این حقیقت است که اسید هیومیک موجب تولید سریع‌تر سوپراکسید دیسموتاز و کاتالاز از پیش ماده خود (سوپر

به مدت ۴۸ ساعت، به وسیله آسیاب در تاریکی پودر گردید. در نهایت بر روی نمونه‌های پودر شده تجزیه‌های فیزیکوشیمیایی لازم شامل تعیین مقدار فسفر و روی انجام گردید. جهت تعیین درصد فسفر در نمونه‌های گیاهی از روش هضم در بالن ژوژه با اسید سولفوریک، اسید سالیسیلیک و آب اکسیژنه استفاده گردید. پس از تهیه عصاره، با روش نورسنجی (رنگ زرد وانادات مولیبدات) و با استفاده از دستگاه اسپکتوفتومتر مدل (Jenway) میزان فسفر گیاه اندازه‌گیری شد. به منظور تعیین عنصر روی در نمونه‌های گیاهی از روش هضم از طریق سوزاندن خشک و ترکیب استفاده گردید. پس از تهیه عصاره، عناصر روی با روش جذب اتمی شعله‌ای و با استفاده از دستگاه جذب اتمی مدل (G BCAventa, ver.1.31) اندازه‌گیری گردید (Emami, 1996).

درصد اسانس

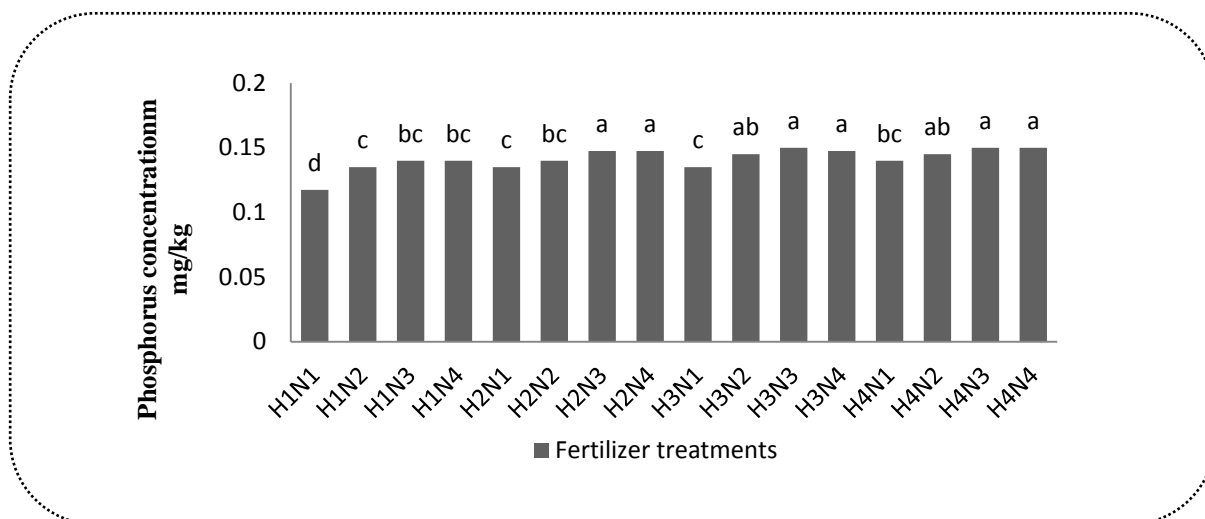
برای تعیین میزان اسانس، ۱۰ گرم از بخش هوایی خشک شده گیاه کاملاً خرد شده و در بالن ۲۵۰ cc ریخته و به آن به میزان ۱۵۰ cc آب مقطر اضافه گردید. پس از سه ساعت میزان اسانس نمونه‌ها از روی لوله مدرج دستگاه تعیین شد (Omid Beigi, 2011).

سایر صفات اندازه‌گیری شده

جهت اندازه‌گیری وزن خشک بوته نیز گیاهان به مدت ۷۲ ساعت در آون با دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. سپس وزن خشک بوته با ترازوی دیجیتال (با دقت ۰/۰۰۰۱) اندازه‌گیری شد. سنجش طول برگ با استفاده از خط‌کش انجام گرفت. شاخص کلروفیل با دستگاه کلروفیل متر (Hansatech) مدل CL-01 در برگ‌های توسعه یافته و حداقل یک ماه بعد از اعمال تیمارها اندازه‌گیری شد. در زمان برداشت، تعداد برگ‌های هر گیاه شمرده شد و پس از اندازه‌گیری سطح برگ توسط دستگاه سطح برگ سنج (Li-Cor, Model Li-1300, USA) میانگین سطح برگ منفرد با توجه به تعداد برگ گیاه محاسبه گردید.

بر روی نخود مشخص گردید که در گیاهان تحت تیمارهای مختلف نانو اکسید روی، میزان فعالیت آنزیم کاتالاز تا غلظت‌های بالای ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر افزایش می‌یابد (Pandey et al., 2012).

اکسید و یک پپتید بنام دیسموتاز و پورفیرین در مورد کاتالاز) می‌نماید (Dadnia, 2017). دلیل دیگر این امر می‌تواند با نقش ساختاری روی در آنزیم‌ها و نقش مستقیم آن در بیان ژن و ساخت پروتئین‌ها مرتبط باشد (Hacisalihoglu et al., 2003). در بررسی‌های انجام شده



شکل ۱- اثر متقابل اسید هیومیک و نانوکلات روی بر میزان فسفر برگ مرزه

Figure 1. Interaction of humic acid and zinc nano-clates on Phosphorus of Savory plant (Duncan's Multiple Range Test) H₁, H₂, H₃, and H₄ were 0, 0.5, 1 and 1.5 mg.L of humic acid, respectively, and N₁, N₂, N₃ and N₄ were 0, 50, 100 and 200 g.L nano-zinc, respectively

افزایش میزان فسفر در ارقام مختلف گونه‌های گیاهی ارائه شده است که با یافته‌های این تحقیق همخوانی دارد (Wang and Li, 2011; Dalvand et al., 2018). ممکن است که اثر مثبت اسید هیومیک در جذب مواد مغذی به علت تاثیرش بر زیست‌توده خشک در گیاه باشد (Kamari et al., 2010). (Shahmaleki et al., 2010). Jones et al. (2004) در آزمایشی، با بررسی اثر اسید هیومیک بر عملکرد گندم بهاره دریافتند که اسید هیومیک دسترسی به فسفر و سایر عناصر غذایی را افزایش می‌دهد و همچنین سبب افزایش عملکرد می‌شود. به نظر می‌رسد که عنصر روی نیز با بهبود رشد ریشه در افزایش جذب عناصر غذایی موثر است (Heidari and Bagheri, 2015). در آزمایش (Kavian et al., 2020) گزارش گردید که کاربرد عنصر روی سبب افزایش جذب عنصر فسفر در گیاه نسبت به سطح

عنصر فسفر

نتایج تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که اثر ساده و متقابل محلول‌پاشی اسید هیومیک و نانوکلات روی بر میزان عنصر فسفر در مرزه معنی‌دار بود (جدول ۳). مقایسه میانگین اثر متقابل تیمارها نشان داد که میزان فسفر گیاه در کاربرد تمام سطوح اسید هیومیک و نانوکلات روی نسبت به شاهد افزایش یافته است. بیشترین افزایش در گیاهان تیمار یافته با ۱۵۰ میلی‌گرم در لیتر اسید هیومیک به همراه ۲ گرم در لیتر نانو کلات روی مشاهده شد که این سطح توانسته است میزان فسفر در گیاه مرزه را نسبت به تیمار شاهد ۲۶ درصد افزایش دهد (شکل ۳). این افزایش ممکن است به علت اثر مثبت اسید هیومیک بر جذب عناصر فسفر، روی، مس و منگنز باشد (Hakan et al., 2011). چندین گزارش در مورد توانایی اسید هیومیک روی

شاهد گردیده است.

عنصر روی

نتایج تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که اثر ساده و متقابل اسید هیومیک و کود نانو کلات روی بر غلظت روی در سطح احتمال یک درصد معنی‌داری بود (جدول ۲). مقایسه میانگین اثر متقابل اسید هیومیک و نانو کود روی نشان داد با افزایش غلظت تیمارها بر تجمع عنصر روی در اندام هوایی گیاه افزوده شد. گیاهان تیمار یافته با ۱۵۰ میلی‌گرم در لیتر اسید هیومیک و ۲ گرم در لیتر نانو کلات روی بیشترین (۰/۹۵۰) و تیمار شاهد کمترین (۰/۲۱۵) میزان تجمع عنصر روی را به خود اختصاص دادند. تفاوت دو سطح یاد شده در حدود ۷۷ درصد است (جدول ۳). بر طبق پژوهش‌های انجام شده، اسید هیومیک مخلوط متراکم و کمپلکس اسیدهای آلی آروماتیک است که این ترکیب دارای گوگرد، ازت، فسفر و برخی از فلزات مانند مس، روی، کلسیم است (Babaian et al., 2012). Celik et al. (2010) به اثر مثبت و معنی‌دار افزایش جذب عناصر مس، روی، منگنز، فسفر و سدیم در کاربرد اسید هیومیک اشاره کرده‌اند. دلیل دیگر این امر می‌تواند با نقش عنصر روی در بهبود رشد رویشی (افزایش جذب در اثر بیشتر ریشه) و افزایش جذب روی (در اثر افزایش نفوذپذیری غشاء) مرتبط باشد. Babaian et al. (2012) گزارش کردند که غلظت روی در تیمار منفرد و ترکیبی روی با آهن و منگنز به طور معنی‌داری افزایش یافته است. در چای ترش، تیمار محلول‌پاشی اسید هیومیک، بهبود تحرک و کارایی عناصر غذایی، افزایش مقدار روی و آهن برگ و در نتیجه، افزایش فتوسنتز، تولید کربوهیدرات و پروتئین را سبب گردید (Minai and Heidari, 2013).

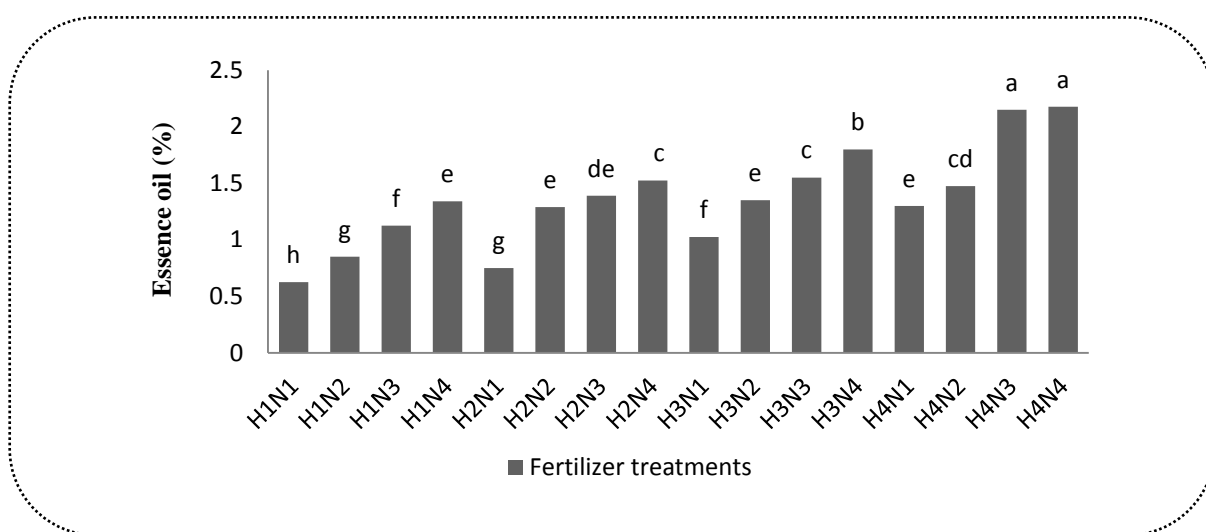
درصد اسانس

نتایج تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که اثر ساده و متقابل اسید هیومیک و کود نانو کلات روی بر درصد اسانس در سطح احتمال ۱ درصد معنی‌داری بود (جدول

۲). مقایسه میانگین اثر متقابل اسید هیومیک و نانوکلات روی نشان داد که غلظت‌های متفاوت مصرف اسید هیومیک و روی در سطوح آماری جداگانه‌ای قرار داشتند. به طوری که کاربرد ۱۵۰ میلی‌گرم در لیتر اسید هیومیک همراه با ۲ گرم در لیتر نانو کلات روی با میانگین ۲/۱۷ درصد بیشترین میزان اسانس را تولید نمود. این سطح با محلول‌پاشی ۱۵۰ میلی‌گرم در لیتر اسید هیومیک همراه با ۱ گرم در لیتر نانوکلات روی در گروه‌های آماری یکسانی قرار گرفتند. سطوح یاد شده با تفاوت ناچیز نسبت به یکدیگر به طور متوسط با سطح شاهد ۷۰ درصد اختلاف داشتند (شکل ۳). اگرچه مقدار متابولیت‌های ثانویه تحت کنترل ژن‌هاست، ولی غلظت و تجمع آن‌ها تا حد زیادی تحت تاثیر شرایط محیطی نیز قرار می‌گیرد Omidbeigi (2009) با نظر به افزایش میزان اسانس در اثر مصرف تیمارهای مختلف اسید هیومیک، می‌توان گفت از آنجا که اسانس‌ها، ترکیبات ترپنوئیدی بوده و بیوسنتز واحدهای سازنده آن‌ها (ایزوپروپنوئیدها) نیازمند ATP و NADPH هستند و با توجه به این مطلب که حضور عناصری نظیر فسفر نقش مهمی در ساختار واحدهای سازنده اسانس‌ها یعنی ایزوپنتینیل پیروفسفات (IPP) و دی‌متیل‌آلیل پیروفسفات (DMAPP) دارند و اسید هیومیک از طریق فراهم نمودن جذب بیشتر فسفر و نیتروژن که در اجزاء تشکیل‌دهنده اسانس حضور دارند، موجب افزایش میزان اسانس پیکر رویشی می‌گردد Gorgini Shabankareh et al. (2018). دلایل اثبات شده‌ای نیز مبنی بر نحوه بهبود سنتز متابولیت‌های ثانویه گیاهان دارویی در شرایط استفاده از نانوکلات روی وجود دارد که از مهم‌ترین آن‌ها می‌توان به جذب بهتر نانوذرات به دلیل اندازه کوچک و نفوذ بسیار بالای آن‌ها از طریق غشای سلولی اشاره کرد که مورد توجه قرار گرفته است (Fallahi et al., 2016). در واقع تثبیت دی‌اکسید کربن، محتوی متابولیت‌های اولیه و متابولیسم ساکارز ارتباط نزدیکی با تولید و انباشت اسانس دارند و از آنجا که عنصر روی در سنتز پروتئین‌ها، فتوسنتز

استفاده از اسید هیومیک در سطح ۲۰۰ میلی گرم در لیتر با افزایش ۵۱/۶۱ درصد نسبت به تیمار شاهد باعث افزایش قابل ملاحظه میزان اسانس گیاه دارویی بادرشبو در شرایط تنش شوری می‌شود. (Mahmoudi et al., 2018). نشان دادند که کاربرد نانوروی به میزان ۱۲/۸۶ باعث افزایش معنی داری نسبت به عدم مصرف کود نانو روی بر عملکرد اسانس گل گاو زبان گردید.

و متابولسیم ساکاریدها نقش دارد، از این رو نقش آن در تولید و تجمع اسانس بسیار مهم و اساسی است (Srivastava et al., 1997). ساعد آل و محمود (Said-Al and Mahmoud 2010) نیز گزارش کردند که بیوستنز اسانس در گیاه ریحان، به شدت به وسیله قابلیت دسترسی یا کمبود عنصر روی تحت تاثیر قرار می‌گیرد. Narimani et al. (2019) در بررسی روی تحقیقی گزارش کردند که



شکل ۲- اثر متقابل اسید هیومیک و نانوکلات روی بر درصد اسانس مرزه

Figure 2. Interaction of humic acid and zinc nano-chalate on essential oil percentage of Savory plant (Duncans

Multiple Range Test)

H₁, H₂, H₃, and H₄ were 0, 0.5, 1 and 1.5 mg.L of humic acid, respectively, and N₁, N₂, N₃ and N₄ were 0, 50, 100 and 200 g.L nano-zinc, respectively

فضای مناسب برای موجودات میکروسکوپی و ماکروسکوپی، نفوذ بیشتر هوا، آب و ریشه را فراهم می‌آورد (Sebastiano et al., 2005). علاوه بر آن نتایج پژوهش‌های مختلف از تاثیر مثبت کاربرد کود روی بر وزن خشک گیاهان دارویی حکایت می‌کند، به عنوان مثال بر اساس گزارش ناهد و بلبا (Nahed, and Balbaa, 2007) کاربرد کود روی وزن تر و خشک گیاهان جعفری و مریم گلی آبی را افزایش داده است. این عامل را می‌توان با دلایل مختلفی از جمله افزایش بیوستنز اکسین در حضور عنصر روی، افزایش آنزیم کربونیک انهیدراز (موثر در بیوستنز کلروفیل) و افزایش نیتروژن و فسفر مرتبط دانست

وزن خشک بوته

نتایج تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که اثر ساده اسید هیومیک و نانو کلات روی بر وزن خشک بوته مرزه در سطح احتمال یک درصد معنی دار بود. اثر متقابل تیمارهای مورد استفاده بر صفت مذکور معنی دار نگردید (جدول ۲). خاصیت شبه هورمونی بودن اسید هیومیک در گیاهان سبب افزایش درصد جوانه‌زنی، تسریع در رشد ریشه‌ها و شاخه‌ها می‌شود (Singer and Bissommais, 1998). اسید هیومیک علاوه بر آنکه با افزایش جذب عناصر سبب رشد اندام هوایی می‌گردد، توانایی بهم چسباندن ذرات معدنی خاک را داشته و ضمن ایجاد گرانول‌های درشت‌تر،

اسید هیومیک تأثیر مثبت و معنی داری بر ارتفاع بوته، تعداد شاخه فرعی، تعداد برگ، طول برگ، وزن خشک بوته داشت. (Mahmoudi et al., 2018) کاربرد کودهای روی به صورت خاک مصرف موجب افزایش ۶۴ درصدی و محلول پاشی توام با خاک مصرف روی موجب افزایش ۴۳ درصدی، میزان سطح برگ گیاه گل گاو زبان نسبت به تیمار شاهد (عدم مصرف کود روی و نانوی روی) شده است. در گیاه مرزه بر هم کنش محلول پاشی اسید هیومیک و رژیم های آبیاری بر شاخص های وزن تر و وزن خشک بوته، ارتفاع بوته و طول برگ معنی دار بودند (Sabouri et al., 2017).

شاخص کلروفیل

نتایج تجزیه واریانس داده ها نشان داد که اثر ساده و متقابل اسید هیومیک و کود نانو کلات روی بر شاخص کلروفیل در سطح احتمال یک درصد معنی دار بود (جدول ۲). با ارزیابی محلول پاشی غلظت های مختلف اسید هیومیک و نانوکلات روی مشاهده گردید کاربرد اسید هیومیک در تمام سطوح نانوکلات روی سبب افزایش سنتز کلروفیل در گیاه گردیده است. اما گیاهان تیمار یافته با ۱۵۰ میلی گرم در لیتر اسید هیومیک و ۲ گرم در لیتر نانوکلات روی و ۱۰۰ میلی گرم در لیتر اسید هیومیک و ۲ گرم در لیتر نانوکلات روی نسبت به سایر تیمارها بیشترین افزایش را داشته اند. این دو سطح با اختلاف ناچیز از هم (۱۴ درصد) به طور میانگین از اختلاف ۹۰ درصدی نسبت به سطح شاهد برخوردار بودند (شکل ۳). مهم ترین آثار بیولوژیک اسید هیومیک بر گیاه شامل تحریک جوانه زنی بذر و رشد، تحریک تجمع زیست توده در گیاهان (Zachariakis et al., 2001)، تحریک تجمع نیتروژن و تحریک جذب عناصر غذایی معدنی (Hosseini et al., 2019) می باشد. در بین عناصر غذایی، نیتروژن سهم مهمی در افزایش سبزینه گیاه دارد. با فعال شدن فرآیندهای فیزیولوژیکی، کلروفیل سازی افزایش یافته و در پی آن بهبود فرایند فتوسنتز در مقایسه با شاهد اتفاق می افتد

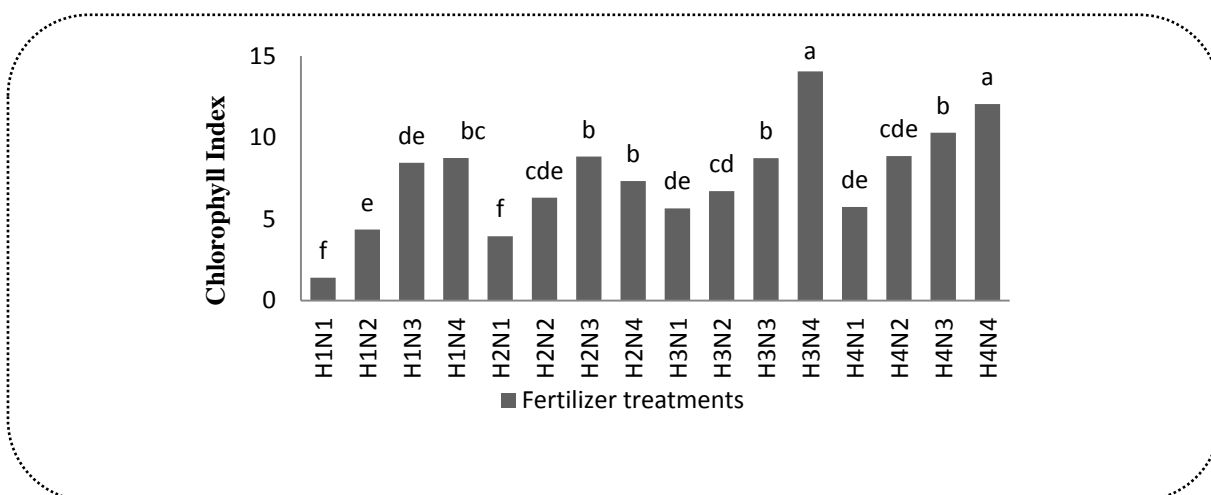
(Bayati, 2012). (Hassan et al., 2015) نیز نشان دادند که کودهای معمول شیمیایی و نانو توانستند به طور معنی داری وزن خشک برگ را در گیاه نعنای فلفلی افزایش دهند. (Mahmoudi et al., 2018) نتایج حاصل از مقایسه میانگین داده ها نشان داد که مصرف توام خاکی و محلول پاشی روی، محلول پاشی پتاسیم و نانوپتاسیم، مصرف خاکی آهن و اوره و روش های مختلف مصرف نانو آهن و نانو اوره باعث افزایش وزن خشک شاخه های گل گاو زبان نسبت به عدم مصرف کود گردید.

طول برگ و شاخص سطح برگ

نتایج تجزیه واریانس داده ها نشان داد که اثر ساده و متقابل اسید هیومیک و نانو کلات روی بر طول و سطح برگ گیاه دارویی مرزه در سطح احتمال یک درصد معنی دار بود (جدول ۲). در بررسی اثر متقابل اسید هیومیک و نانو کلات روی بر طول و سطح برگ مشخص شد، بیشترین میانگین داده ها در صفات مذکور از کاربرد همزمان ۱۵۰ میلی گرم در لیتر اسید هیومیک در ۲ گرم در لیتر نانوکلات روی به دست آمد و گیاهان تیمار یافته با بهبود ۶۴ و ۷۵ درصدی طول و سطح برگ نسبت به شاهد از برتری نسبت به سایر تیمارها برخوردار بودند. مکانیسم های مختلفی در ارتباط با تأثیر اسید هیومیک بر رشد رویشی گیاهان ارائه شده است. یکی از مهم ترین این مکانیسم ها، تأثیر اسید هیومیک بر جذب عناصر غذایی از طریق کلات کردن عناصر ضروری است (Yadollahi et al., 2015). همین امر سبب گردیده محلول پاشی اسید هیومیک در کنار کاربرد نانو کلات روی سبب بهبود صفات رویشی گیاه گردد. سایر محققین نیز به تأثیر مثبت نانوکلات روی بر بهبود رشد رویشی اشاره کرده اند (Saeedi, 2008; Yadegari et al., 2014). آن ها ادعا داشته اند کاربرد نانوکلات روی با افزایش جذب روی و نیتروژن و انتقال آن به بخش هوایی سبب افزایش رشد گردیده است (Saeedi, 2008; Yadegari et al., 2014). (Hosseini et al., 2019) گزارش کردند که در گیاه مرزه

می یابد و نهایتاً منجر به افزایش میزان کلروفیل در برگ می گردد (Asgari Lajair et al., 2004). یافته های حاصل از پژوهش هایی بر روی مرزه (Hosseini et al., 2019)، کرچک (Rahbari et al., 2018)، چای ترش Sanjari (Mejani et al., 2015) و گوجه فرنگی (Asgari et al., 2004) تاثیر مثبت اسید هیومیک و نانوکلات روی را بر افزایش تولید رنگیزه های فتوسنتزی را تایید می کند. نشان داده شده است که نانو ذرات روی به شکل معنی داری محتوای کلروفیلی را افزایش دادند (Tarafdar et al., 2014).

(Ebrahimi and Karbask, 2016). بنابراین افزایش قابل توجه جذب نیتروژن در حضور اسید هیومیک را می توان چنین استنباط کرد که اسید هیومیک مورد استفاده در این پژوهش، توانسته است باعث افزایش جذب عناصر مغذی به خصوص نیتروژن و به دنبال آن افزایش سبزینگی گیاه شود. علاوه بر آن شواهدی نیز دال بر تاثیر مثبت عنصر روی بر میزان رنگیزه های فتوسنتزی وجود دارد که افزایش روی سبب افزایش فعالیت های فتوسنتزی می گردد و با افزایش فعالیت های فتوسنتزی به نوعی تولید پیش ماده های مناسب جهت بیوسنتز کلروفیل در کلروپلاست افزایش



شکل ۳- اثر متقابل اسید هیومیک و نانوکلات روی بر شاخص کلروفیل مرزه

Figure 3. Interaction of humic acid and zinc nanoclates on chlorophyll index of Savory plant (Duncans Multiple Range Test)

H₁, H₂, H₃, and H₄ were 0, 0.5, 1 and 1.5 mg.L of humic acid, respectively, and N₁, N₂, N₃ and N₄ were 0, 50, 100 and 200 g.L nano-zinc, respectively

جدول ۲. میانگین مربعات اثر تیمارهای آزمایشی بر صفات کمی و کیفی مرزه

Table 2. Mean squares effect of experimental treatments on the quantitative and qualitative traits of savory

Mean Squares											
S.O.V	Df	Leaf length	Plant dry weight	Leaf surface	Chlorophyll Index	Catalase enzyme	Peroxidase Enzyme	Superoxidase dismutase enzyme	Zinc	Essence oil (%)	Phosphorus
humic acid	3	2.39**	39.32**	4.16**	45.56**	0.65**	0.00**	0.13**	0.18**	1.77**	0.00**
Nano zn chelated fertilizer	3	4.13**	177.91**	12.04**	12.59**	0.85**	0.00**	0.22**	0.95**	1.94**	0.00**
humic acid *	3	0.07**	4.49ns	0.21**	8.29**	0.04**	0.00**	0.05**	0.02**	0.06**	0.00**
nano zn chelated fertilizer	3	0.07**	4.49ns	0.21**	8.29**	0.04**	0.00**	0.05**	0.02**	0.06**	0.00**
Error	48	0.15	2.57	0.05	0.01	0.01	0.000	0.00	0.00	0.01	0.00
C.V (%)	-	5.61	14.36	7.93	1.39	5.57	3.23	2.80	1.92	6.28	2.88

ns, * and **: are non-significant and significant at 5 and 1 % probability levels, respectively

جدول ۳. مقایسه میانگین اثر نسبت های مختلف اسید هیومیک و نانو روی بر صفات کمی و کیفی مرزه

Table 3. Comparison of the mean effect of different ratios of humic acid and nano-chalate zinc on the quantitative and qualitative traits of savory

Treatment	Leaf length (Cm)	Leaf surface (Cm ²)	Catalas Enzyme (Mg ⁻¹ Protein. Min ⁻¹)	Peroxidase Enzyme (Mg ⁻¹ Protein. Min ⁻¹)	Superoxide dismutase Enzyme (Mg ⁻¹ Protein. Min ⁻¹)	Zinc (mg/kg)
H ₁ N ₁	1.150 ^j	1.000 ^e	0.750 ^f	0.118 ^g	0.463 ^h	0.215 ^m
H ₁ N ₂	1.550 ⁱ	2.000 ^d	1.300 ^d	0.133 ^e	0.830 ^e	0.580 ^h
H ₁ N ₃	1.825 ^{gh}	2.500 ^c	1.425 ^{cd}	0.135 ^e	0.503 ^f	0.690 ^f
H ₁ N ₄	2.075 ^{ef}	2.000 ^b	1.575 ^b	0.140 ^e	0.845 ^e	0.790 ^e
H ₂ N ₁	1.500 ⁱ	2.000 ^d	1.150 ^e	0.125 ^f	0.810 ^e	0.300 ⁱ
H ₂ N ₂	2.050 ^{ef}	3.000 ^b	1.525 ^{bc}	0.140 ^e	0.908 ^e	0.430 ^j
H ₂ N ₃	2.325 ^d	3.000 ^b	1.600 ^b	0.155 ^d	0.940 ^{bcd}	0.800 ^e
H ₂ N ₄	2.600 ^c	4.000 ^a	1.650 ^b	0.165 ^{bc}	0.955 ^{bc}	0.905 ^c
H ₃ N ₁	1.675 ^{hi}	2.000 ^d	1.375 ^d	0.135 ^e	0.648 ^g	0.330 ^k
H ₃ N ₂	2.050 ^{ef}	2.750 ^{bc}	1.625 ^b	0.155 ^d	0.973 ^b	0.630 ^g
H ₃ N ₃	2.700 ^c	3.750 ^a	1.775 ^a	0.163 ^c	1.023 ^a	0.800 ^e
H ₃ N ₄	2.900 ^b	4.000 ^a	1.800 ^a	0.170 ^b	1.028 ^a	0.940 ^{ab}
H ₄ N ₁	1.900 ^{fg}	2.000 ^d	1.550 ^{bc}	0.140 ^e	0.738 ^f	0.535 ⁱ
H ₄ N ₂	2.175 ^{de}	3.000 ^b	1.625 ^b	0.150 ^d	0.928 ^{cd}	0.830 ^d
H ₄ N ₃	2.950 ^b	4.000 ^a	1.825 ^a	0.168 ^{bc}	1.040 ^a	0.930 ^b
H ₄ N ₄	3.200 ^a	4.000 ^a	1.875 ^a	0.180 ^a	0.657 ^g	0.950 ^a

H₁, H₂, H₃, and H₄ were 0, 0.5, 1 and 1.5 mg.L of humic acid, respectively, and N₁, N₂, N₃ and N₄ were 0, 50, 100 and 200 g.L nano-zinc, respectively

نتیجه گیری

هیومیک (N₄H₄) به ترتیب بیشترین ۰/۱۸۰، ۰/۱۸۷۵، ۰/۹۵۰، ۱۶/۱۵۳، ۳/۲۰۰، ۴/۰۰۰ مقدار آنزیم پراکسیداز، کاتالاز، روی، وزن خشک بوته، طول برگ و سطح برگ و تیمارهای عدم مصرف کود نانو کلات روی و اسید هیومیک (N₁H₁) به ترتیب کمترین مقدار ۰/۱۱۸، ۰/۴۶۳، ۰/۷۵۰، ۰/۲۱۵، ۱/۱۵۰ و ۱/۰۰۰ سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز، پراکسیداز، روی، طول برگ و سطح برگ را به خود اختصاص داد.

نتایج این بررسی نشان داد که مصرف کود نانوی روی و اسیدهیومیک بر ویژگی های کمی و کیفی گیاه دارویی مرزه تاثیر معنی داری داشته است. براساس نتایج، کاربرد تلفیقی کود نانوی روی و اسیدهیومیک برتری قابل توجهی را نسبت به کاربرد جداگانه هر یک از آنها داشت. مقایسه میانگین ها برای اثر متقابل کود نانو کلات روی و اسیدهیومیک مشخص کرد که تیمار ۲ گرم در لیتر کود نانو کلات روی به همراه مصرف ۱۵۰ میلی گرم در لیتر اسید

منابع

Alizadeh, A., F. Najafi, J. Hadian, and P. Salehi. 2018. The effect of different amounts of humic acid and vermicompost extract on growth, morphological and phytochemical characteristics of Khuzestani savory (*Satureja khuzistanica Jamzad*). *Journal of Agricultural Ecology*, 10 (1): 69-80.

Alloway, B. J. 2008. Zinc in Soils and Crop Nutrition (Second Ed). IZA and IFA Publication. Brussels, Belgium and Paris, France and catalase. *Journal of Experimental Botany*, 126: 93-101.

- Asgari Lajair, H., J. Hadian, G. Sawaghebi Firoozabadi, and B. Motasharehzadeh. 2014. The effect of application of different levels of copper and zinc on some growth traits, copper and zinc concentration and yield and yield of basil essential oil (*Ocimum basilicum* L.). *Crop Production Technology (Agricultural Research)*, 14 (2): 33-47.
- Askari, M., F. Amini. and F. Jamali. 2014. Effects of growth on photosynthetic pigments, proline, protein and tomato carbohydrates under salinity stress. *Plant Process and Function*, 3 (9): 45-58.
- Auld, D. S. 2001. Zinc coordination sphere in biochemical zinc sites. *Biometals*, 14(3): 271-313.
- Babaian, M., M. Heidari, and A. Ghanbari. 2012. Effect of drought stress and foliar application of trace elements on physiological characteristics and nutrient uptake in sunflower (*Helianthus annus* L.). *Iranian Journal of Crop Sciences*, 3: 377-391.
- Bayati, Z. 2012. Evaluation of quantities and times of application of nano-iron fertilizer on yield and yield components of canola. Master Thesis, *Shahid Chamran University of Ahvaz*, 147 pages.
- Beauchamp, C., and I. Fridovich. 1971 Superoxide dismutase Improved assay and an assay applicable to acrylamide gels. *Anal Biochem*, 44: 276-282.
- Beers, R. F., and I. W. Sizer. 1952. A spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase. *Journal of Biological Chemistry*, 195: 133-140.
- Boyeri Deh Sheikh, P., M. Mahmoudi Sarvestani, M. Zolfaghari, and N. Enayati Zamir. 2015. The effect of biological, chemical and humic acid fertilizers on vegetative traits of *Nepeta cataria*, 9th Iranian Congress of Horticultural Sciences, Ahvaz, Iranian Horticultural Sciences Association and Shahid Chamran University of Ahvaz.
- Boyukus, G. J. 1962. Hydrometer method improved for making particle size analyses of soils. *Agronomy Journal*, 54 (5): 464-465.
- Cakmak, I. 2000. Possible roles of zinc in protecting plant cells from damage by reactive oxygen species. *New Phytologist*, 146: 185-205.
- Cakmak, I., and C. Engels. 1999. Role of mineral nutrients in photosynthesis and yield formation: 141-168. In: Rengel, Z., (Ed.). *Mineral Nutrition of Crops: Fundamental Mechanisms and Implication*. Haworth Press, *New York*, 418p.
- Celik, H., A.V. Katkat, B. B. Aşık, and M. A. Turan. 2010. Effect of foliar-applied humic acid to dry weight and mineral nutrient uptake of maize under calcareous soil conditions. *Communications in soil science and plant analysis*, 42(1): pp.29-38.
- Chance, B., and A. Maehly. 1955. Assay of catalase and peroxidase. *Methods Enzymology*. 2: 764-817.
- Dadnia, M. R. 2017. The effect of humic acid on the activity of antioxidant enzymes and yield of castor (*Ricinus communis* L.) in water deficit conditions. *Ecophysiology of Crops (Agricultural Sciences)*, 11 (1): 85-98.
- Dalvand, M., M. Solgi, and A. Khaleghi. 2018. The effect of humic acid foliar application and drought stress on the growth and physiological characteristics of parsley. *Journal of Greenhouse Crop Science and Technology*. 9 (2): 67- 79.
- Dhindsa, R. S., P. Plumb-Dhindsa, and T. A. Thorpe, 1981. Leaf senescence: correlated with increased levels of membrane permeability and lipid peroxidation, and decreased levels of superoxide dismutase and catalase. *Journal of Experimental botany*, 32(1), 93-101.
- Ebrahimi, M., and A. Miri KARBASK. 2016. Investigation of the effect of humic acid on germination, seedling growth and photosynthetic pigments of Asparagus (*Plantago ovata* Forssk). *Iranian Seed Science and Research*, 3 (3): 35- 46.

Emami AS, 1996. Plant Decomposition Methods. Soil and Water Research Institute, Agricultural Research and Training Organization (Vol. I). Journal Number 982, Ministry of Agriculture, Tehran.

Fallahi, A., A. Hassani, and F. Sefidkan. 2016. The effect of foliar application of different sources of zinc on the yield and phytochemical properties of basil (*Ocimum basilicum* L.). *Research in Iranian Medicinal and Aromatic Plants*, 32 (5): 743- 757.

Giannopolitis, C. N., and S. K. Ries. 1977. Superoxide dismutases: I. Occurrence in higher plants. *Plant physiology*, 59(2): pp.309-314.

Gong, Y., P. M. Toivonen, O. L. Lau and A. P. Wiersma. 2001. Antioxidant system level in "Braeburn" apple is related in its browning disorder. *Journal Botanical Bulletin of Academia Sinica*; 42: 259 - 64.

Gorgini Shabankareh, H., M. R. Abbasi, and A. Tabasi. 2018. The effect of irrigation cycle and humic acid on morphophysiological and biochemical properties of thyme. *Journal of Plant Environmental Physiology*, 13: 67-82.

Hacisalihoglu, G., J. J. Hart, Y. H. Wang, I. Cakmak, and L.V. Kochian. 2003. Zinc efficiency is correlated with enhanced expression and activity of zinc-requiring enzymes in wheat. *Plant physiology*, 131(2): 595-602.

Hajebi, A. H., and H. Heidari Sharifabadi. 2005. Investigation of the effect of drought on the knot growth of three species of clover research and construction. *Agriculture and Horticulture*, 18 (66): 13-22.

Hakan, C., A. V. Katkat, B. B. Asık, and M. A. Turan. 2011. Effect of Foliar-Applied Humic Acid to Dry Weight and Mineral Nutrient Uptake of Maize under Calcareous Soil Conditions. *Communications Soil Science and Plant Analysis*. 42(1): 29-38.

Hassani, A., A. K. Tajali, and S. M. Hosseini Mazinani. 2015. Studying the Conventional Chemical Fertilizers and nono-fertilizer of iron, zinc and potassium on quantative yield of the Medicinal Plant of Peppermint (*Mentha Piperita* L.) in Khuzestan. *International Journal of Agriculture Innovations and Research*. 3:1078-1082.

Heidari, M., and A. Bagheri. 2015. The effect of different levels of nitrogen and zinc fertilizers on the quantitative and qualitative characteristics of sunflower seeds, *Journal of Production and Processing of Crop and Horticultural Products*. 18: 269-276.

Hosseinian, S. H., n. A. Ebrahimi Pak, and A. Yousefi Aslan Gedarnejad. 2019. The effect of moisture stress and humic acid foliar application on morphophysiological characteristics of safflower. *Journal of Soil and Water Conservation Research*, 26 (1): 219-232.

Imami, A. 1996. Plant decomposition methods. Tehran Soil and Water Research Institute, 1: 53-147.

Individuals, R. 2017. Effect of Zinc and Phosphorus on Yield, Nutrient Absorption and Crop Yield of Zinc in Potatoes. *Journal of Water and Soil (Agricultural Sciences and Industries)*. 31 (3): 886-889.

Jones, C.A., J. S. Jacobsen and A. Mugaas. 2004. Effect of humic acid on phosphorus availability and spring wheat yield. *Fertilizer Facts*, No. 32, Montana State University.

Kamari Shahmaleki, S., Q. Peyvast and J. Olfati. 2010. Effects of humic acid on growth characteristics and absorption of nutrient elements of lettuce in thin layer of solution. *Journal of Horticultural Science*, 24(2): 149-153.

Kavian Athar, N., and M. A. Aboutalebian. 2020. Quantitative and qualitative reaction of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) to phosphorous and zinc sulfate application method under different rates of nitrogen starter fertilizer, *Iranian Journal of Field Crop Science*. 51 (3), (17-32).

Lindsay, W. L., and W. Norvell. 1978. Development of a DTPA soil test for zinc, iron, manganese, and copper 1. *Soil science society of America journal*, 42(3): pp.421-428.

- Liu, R., and R. Lal. 2015. Potentials of engineered nanoparticles as fertilizers for increasing agronomic productions. *Science of the total environment*, 514: pp.131-139.
- Luo, Z. B., X. J. He, L. Chen, L. Tang, S. Gao, and F. Chen. 2010. Effects of zinc on growth and antioxidant responses in *Jatropha curcas* seedlings. *International Journal of Agricultural Biology*, 12: pp.119-124.
- Mafakheri, S., B. Asghari, and M. J. Nikjouyan. 2018. The effect of zinc nanoclates on morphophysiological and phytochemical traits of Zarrin or Lemongrass in drought stress conditions. *Iranian Journal of Horticultural Sciences*, 49 (3): 755- 767.
- Mahmoudi, P., Y. Rashidi, R. Amirnia, A. Tari Nejad. 2018. The effect of type and method of application of nano and chemical fertilizers on grain yield and essential oil of European bovine flower (*Borago officinalis* L.). *Plant environmental physiology*. 13 (51): 95-107.
- Malakouti, M. J., P. Keshavarz, and A. Karimian. 2004. Comprehensive method of diagnosis and optimal fertilizer recommendation for sustainable agriculture. Seventh edition, Tarbiat Modares University Press.
- Melero, S., K. Vanderlinden, J.C. Ruiz, and E. Madejon. 2008. Long-term effect on soil biochemical status of a Vertisol under conservation tillage system in semi-arid Mediterranean conditions. *European journal of soil biology*, 44(4): pp.437-442.
- Minai, A., and M. heidari. 2013. The impact of drought and humic acid on performance and concentration of macro elements in the herb boage flowers (*Borago officinalis* L.). *Journal of Plant Production*, 21(1): pp.167-182.
- Moghimpour, Z., M. Mahmoudi Sarvestani, N. Alimzadeh Naseri, and Z. Ramezani. 2014. The effect of foliar application of zinc nanoclates and zinc sulfate on morphological traits on holy basil (*Ocimum sanctum*). *Journal of Plant Production*, 38 (3): 41-53.
- Naderi, M., A. Danesh-Shahraki, and R. Naderi. 2013. The role of nanotechnology in improving the use efficiency of nutrients and chemical fertilizers. *Mon Nanotechnol*, 11(12): pp.16-32.
- Nahed, G. A., and L. K. Balbaa. 2007. Influence of tyrosine and zinc on growth, flowering and chemical constituents of *Salvia farinacea* plants. *Journal Application Science*, 3(11): 1479-1489.
- Narimani, R., M. Moghadam, and A. Pir Balouti. 2019. The effect of moisture stress and humic acid foliar application on morphophysiological characteristics of safflower, *Journal of Soil and Water Conservation Research*. 26 (1): 219-232.
- Olsen, S. R., C. V. Cole, F. S. Watanabe, and L. A. Dean. 1954. Estimation of available phosphorous in soils by extraction with sodium bicarbonate. United States Development of Agriculture, Washington, D.C.
- Omid Beigi, R. 2011. Processing of medicinal plants. *Quds Razavi Province Publications*. 437 pages.
- Omidbeigi, R. 2009. Approach to the production and processing of medicinal plants. *Fekr Rooz Publications*, 283 pages.
- Page, A. L., R. H. Miller, and D. R. Keeney. 1982. Methods of soil analysis. Part 2. Chemical and microbiological properties. ASA-CSSA-SSSA Publisher, *Madison, Wisconsin, USA* Lindsay.
- Pandey, N., B. Gupta, and G. C. Pathak. 2012. Antioxidant responses of pea genotypes to zinc deficiency. *Russian Journal of Plant Physiology*, 59(2): pp.198-205.
- Rahbari, A., S. J. Masoudi, A. Damavandi. and S. Rezvani. 2018. Reflection of castor (*Ricinus communis* L.) to foliar application of zinc nanocult and humic acid under conditions of limited irrigation. *Journal of Agricultural Knowledge and Sustainable Production*, 29 (2): 153-171.

- Rostami, Q., M. Moghadam, A. Saeedipouya, L. Azhdanian. 2018. The effect of humic acid foliar application on some morphophysiological and biochemical properties of green mint (*Mentha spicata*) under drought stress. *Environmental stresses in agricultural sciences*, 12 (1): 95-110.
- Sabouri, F., A. Sirous Mehr, and H. Gorgini Shabankareh. 2017. The effect of irrigation regimes and humic acid foliar application on some morphological and physiological characteristics of the medicinal plant *Satureia hortensis*, *Plant biology*, 9 (4): 13-24.
- Saeedi, G. H. 2008 The effect of some macro and microelements on grain yield and other agronomic characters on (*Sesamum indicum* L.) in Isfahan *Science and Technology of Agriculture and Natural Resources* 45 :379-402.
- Said-Al Ahl, H. A. H., and A. A. Mahmoud. 2010. Effect of zinc and/or iron foliar application on growth and essential oil of sweet basil (*Ocimum basilicum* L.) under salt stress. *Ozean Journal of Applied Sciences*, 3(1); pp.97-111.
- Samavat S., and M. Malakouti. 2004. The need to use organic acid (*humic and folic*) to increase the quality and quantity of agricultural products. *Tehran Technical Publications*, 463 pages.
- Sanjari Mejani, M., A. Sirous Mehr, and B. Fakheri. 2015. The effect of drought stress and humic acid on some physiological properties of sour tea (*Hibiscus sabdarifa* L.) to agriculture 8 (3): 346- 356.
- Sebastiano, D., T. Roberto, D. Ersilio, and A. Arturo. 2005. Effect of foliar application of N and humic acids on growth and yield of durum wheat. *Journal of Agriculture Research*, 25:183 191.
- Singer, M.J., and Y. Le Bissonnais. 1998. Importance of surface sealing in the erosion of some soils from a Mediterranean climate. *Geomorphology*, 24(1): pp.79-85.
- Srivastava, N. K., A. Misra, and S. Sharma. 1997. Effect of Zn deficiency on net photosynthetic rate, 14C partitioning, and oil accumulation in leaves of peppermint. *Photosynthetica*, 33(1): pp.71-79.
- Tarafdar, J. C., R. Raliya, H. Mahawar, and I. Rathore. 2014. Development of zinc nanofertilizer to enhance crop production in pearl millet (*Pennisetum americanum*). *Agriculture Research*, 3(3): 257–262.
- Walkley, A., and I. A. Black. 1934. An examination of the Degtjareff method for determining soil organic matter, and a proposed modification of the chromic acid titration method. *Soil science*, 37(1): 29-38.
- Wang, X. J., and G. S. Li. 2011. The effect of humic acid on availability of phosphorus fertilizers in alkaline soil. *Soil Use Manage*, 11: 57-63.
- Yadegari, R., M. Nikan, and A. Samavat. 2014. Comparison of the effect of zinc fertilizer (nano and non-nano) on growth indices of chickpea (*Cicer arietinum* L.) at different salinity levels. *First National Conference on Medicinal Plants and Sustainable Agriculture*, 9: 137-150.
- Yadollahi, P., M. Asgharipoor, and F. Golshani. 2015. The effect of humic acid foliar application on yellow aloe in cadmium-contaminated soils. *Plant process and function*. 14: 59-51.
- Zachariakis M., E. Tzorakakis, I. Kritsotakis, C. I. Siminis, and V. Manios. 2001. Humic substances stimulate plant growth and nutrient accumulation in grapevine rootstocks. *Acta Horticulturae*, 549: 131-13.
- Zarezadeh, A., S. Tabaei Aghdai, A. Mir Hosseini, M. R. Arabzadeh, and L. Mirjani. 2015. Study of diversity in yield and yield components and adaptation of different species of savory (*Satureja* spp) in Yazd province. *Iranian Medicinal and Aromatic Plants Research*, 31 (6): 931-944.