

Evaluation of the Effects of Copper Oxide Nanoparticles on Oxidative Stress Induction and Stimulation of Secondary Metabolite Biosynthesis in *Artemisia annua* L. Cell Suspension Cultures

Pages
05-23

I. Khaldari^{1*}, E. Afshoon² and S. Hoseini Nik³

- 1) Department of Agronomy and Plant Breeding, Agricultural and Natural Resources College, University of Tehran, Karaj, Iran.
- 2) Crop and Horticultural Science Research Department, South Khorasan Agricultural and Natural Resources Research and Education Center, AREEO, Birjand, Iran.
- 3) Agricultural Sciences and Natural Resources University of Khuzestan, Mollasani, Iran.

Corresponding author: Khaldari.i@ut.ac.ir

Received date: 2025.11.01

Accepted date: 2026.02.01

Abstract

Plant secondary metabolites are recognized as bioactive and valuable compounds in the pharmaceutical, food, and cosmetic industries. Limitations in the natural production of these metabolites, along with ecological risks associated with the overharvesting of medicinal plants, have made the application of biotechnological approaches, such as plant tissue and cell culture and elicitation of biosynthetic pathways, a research and industrial necessity. This study aimed to investigate the effects of concentration and incubation time of green-synthesized copper oxide nanoparticles on oxidative responses and the accumulation of phenolic and flavonoid compounds in *Artemisia annua* L. cell suspension cultures. Cells were treated with three nanoparticle concentrations (0, 20, and 40 $\mu\text{g ml}^{-1}$) for three incubation periods (24, 48, and 72 h), and H_2O_2 content, activities of catalase, ascorbate peroxidase, and guaiacol peroxidase, as well as total phenolic and flavonoid contents, were quantified. Results demonstrated that 20 $\mu\text{g ml}^{-1}$ induced a controlled increase in H_2O_2 , enhanced catalase and ascorbate peroxidase activities, and led to the highest accumulation of phenolics and flavonoids at 72 h. Treatment with 40 $\mu\text{g ml}^{-1}$ had a stimulatory effect at 24 h; however, prolonged exposure intensified oxidative stress, resulting in marked reductions in phenolic and flavonoid contents. The observed patterns suggest that oxidative stress and H_2O_2 accumulation may contribute to defense responses and regulation of biosynthetic pathways. These findings highlight the importance of precisely controlling nanoparticle concentration and treatment duration to harness stimulatory effects while avoiding oxidative damage, and underscore the potential of plant cell culture systems for secondary metabolite production.

Keywords: Oxidative, Elicitor, Flavonoid, Phenol and Tissue culture.

بررسی اثرات نانوذرات اکسید مس بر القای تنش اکسیداتیو و تحریک بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه در کشت سوسپانسیون سلولی *Artemisia annua* L.

شماره صفحات

۰۵-۲۳

ایمان خالداري^{۱*}، اسماعیل افشون^۲ و سید سجاد حسینی نیک^۳

(۱) گروه زراعت و اصلاح نباتات، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج، ایران.

(۲) مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی خراسان جنوبی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، بیرجند، ایران.

(۳) دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، ملایان، ایران.

*Khaldari.i@ut.ac.ir نویسنده مسئول

تاریخ دریافت: ۱۴۰۴/۰۸/۱۰

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۱۱/۱۲

چکیده

متابولیت‌های ثانویه گیاهی به‌عنوان ترکیبات زیست‌فعال و ارزشمند در صنایع دارویی، غذایی و آرایشی شناخته می‌شوند. محدودیت‌های موجود در تولید طبیعی این متابولیت‌ها، همراه با خطرات اکولوژیکی ناشی از برداشت بیش‌ازحد گیاهان دارویی، به‌کارگیری رویکردهای زیست‌فناورانه مانند کشت بافت و سلول گیاهی و تحریک مسیرهای بیوسنتزی را به یک ضرورت پژوهشی و صنعتی تبدیل کرده است. این مطالعه با هدف بررسی اثرات غلظت و زمان انکوباسیون نانوذرات اکسید مس سنتز شده به‌روش سبز بر پاسخ‌های اکسیداتیو و تجمع ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی در کشت سوسپانسیون سلولی *Artemisia annua* L. انجام شد. سلول‌ها با سه غلظت نانوذره (۰، ۲۰ و ۴۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) در سه دوره انکوباسیون (۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت) تیمار شدند و میزان H_2O_2 ، فعالیت‌های کاتالاز، آسکوربات پراکسیداز و گایاکول پراکسیداز و همچنین محتوای کل فنول و فلاونوئید اندازه‌گیری شد. نتایج نشان داد که غلظت ۲۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر موجب افزایش کنترل شده H_2O_2 ، افزایش فعالیت کاتالاز و آسکوربات پراکسیداز و بیشترین تجمع فنول‌ها و فلاونوئیدها در ۷۲ ساعت شد. تیمار با ۴۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر نانوذرات در ۲۴ ساعت اثر تحریک‌کنندگی داشت؛ اما تیمار طولانی‌مدت در این غلظت باعث تشدید تنش اکسیداتیو و کاهش قابل توجه محتوای فنول‌ها و فلاونوئیدها گردید. الگوهای مشاهده شده نشان می‌دهد که تنش اکسیداتیو و تجمع H_2O_2 می‌تواند در پاسخ‌های دفاعی و تنظیم مسیرهای بیوسنتزی نقش داشته باشد. این یافته‌ها اهمیت کنترل دقیق غلظت نانوذرات و مدت تیمار را برای بهره‌گیری از اثرات محرک و جلوگیری از آسیب اکسیداتیو برجسته می‌کند و ظرفیت سیستم‌های کشت سلولی گیاهی را برای تولید متابولیت‌های ثانویه نشان می‌دهد.

واژه‌های کلیدی: اکسیداتیو، الیسی‌تور، فلاونوئید، فنل و کشت بافت.

مقدمه

گیاهان دارویی از دیرباز بخش جدایی ناپذیر نظام‌های مراقبت سلامت در سراسر جهان بوده‌اند، زیرا توانایی تولید مجموعه‌ای متنوع از ترکیبات آلی اختصاصی موسوم به متابولیت‌های ثانویه را دارند (Kelly, 2009). این ترکیبات، نه تنها پایه و اساس نظام‌های طب سنتی را شکل می‌دهند، بلکه در زمینه‌های مدرن، نقش مهمی در صنایع داروسازی، غذایی و آرایشی و بهداشتی ایفا می‌کنند (Kinghorn, 2010). از منظر زیست‌شناسی گیاهی، متابولیت‌های ثانویه نقش حیاتی در دفاع گیاهان در برابر تنش‌های زیستی و غیرزیستی از جمله عوامل بیماری‌زا، گیاه‌خواران، پرتو فرابنفش و تنش‌های اکسیداتیو^۱ دارند (Xu and Deng, 2017). پژوهش‌ها نشان داده‌اند که ترکیباتی مانند فلاونوئیدها، آلکالوئیدها و ترپنوئیدها به‌طور موثری در سازگاری و بقای گیاه موثرند و این ترکیبات تا حد زیادی مسئول خواص درمانی گیاهان دارویی نیز به‌شمار می‌روند (Samuelsson, 2004). گونه دارویی درمنه (*Artemisia annua* L.) از خانواده Asteraceae، گیاهی یک‌ساله و بومی آسیا است که قرن‌ها در طب سنتی شرق آسیا برای درمان و پیشگیری بیماری‌هایی با علائم تب و لرز مورد استفاده قرار گرفته است (Hien and White, 1993). از این گیاه مجموعه‌ای گسترده از ترکیبات شامل سزکوئی‌ترپنوئیدها، فلاونوئیدها، کومارین‌ها، لیپیدها، ترکیبات فنولی، پورین‌ها، استروئیدها، تری‌ترپنوئیدها و آرتیمیسینین استخراج شده است (Bhakuni et al., 2001). ترکیب اصلی *A. annua* یعنی آرتیمیسینین، طی دو دهه‌ی اخیر به عنوان مؤثرترین ماده‌ی فعال برای درمان بیماری مالاریا به‌طور گسترده در سطح جهانی به کار گرفته شده و منبع اصلی داروی ضد مالاریا محسوب می‌شود (de Veris and Dien, 1996). تولید طبیعی متابولیت‌های ثانویه معمولاً با بازده پایین، تغییرپذیری مکانی و زمانی در فرآیندهای بیوسنتزی و حساسیت شدید به تغییرات محیطی محدود می‌شود؛ که این موارد از جمله موانع تولید یکنواخت و در مقیاس صنعتی این ترکیبات به شمار می‌آیند. همچنین، برداشت بی‌رویه گیاهان دارویی خطرات جدی زیست محیطی ایجاد کرده و نیاز به رویکردهای زیست فناوریانه جایگزین، نظیر فناوری‌های کشت سلول و بافت گیاهی و مهندسی متابولیک را برجسته می‌سازد (Ramachandra Rao and Ravishankar, 2002; Robert Verpoorte and Alfermann, 2000). در این راستا و عموماً در شرایط کشت بافت، روش‌های مبتنی بر تحریک‌سازی^۲ به‌عنوان راهبردی مؤثر برای تقویت بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه مطرح شده است؛ که طی آن عوامل زیستی یا غیرزیستی با سلول‌های گیاهی تعامل کرده و مسیرهای بیوسنتزی مرتبط با تولید متابولیت‌های ثانویه را فعال می‌سازند (Narayani and Srivastava, 2017). در دهه‌های اخیر، به‌کارگیری روش‌های کشت بافت گیاهی و استفاده از محرک‌ها^۳ با اهداف تولید تجاری متابولیت‌های ثانویه و بررسی سازوکارهای سلولی و مولکولی مرتبط با سنتز این

1. Oxidative
2. Elicitation
1. Elicitor

ترکیبات، مورد توجه گسترده پژوهشگران قرار گرفته است. در این میان، نانوذرات^۴ به‌عنوان نسل جدیدی از محرک‌های مؤثر شناخته می‌شوند که می‌توانند از طریق القای تنش، مسیرهای دفاعی سلول گیاهی را فعال کنند. این تحریک منجر به افزایش فعالیت سامانه‌های آنتی‌اکسیدان آنزیمی و غیرآنزیمی و بازآرایی تنظیمی در شبکه‌های زیستی سلول می‌شود. در نتیجه، برانگیختگی این مسیرهای دفاعی با افزایش بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه همراه است که یکی از جلوه‌های کلیدی پاسخ سازگاران گیاه به تغییرات محیطی محسوب می‌شود (Lala, 2021). تاثیر نانوذرات بر فرآیندهای بیوشیمیایی و القای بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه در سلول‌های گیاهی در مطالعات متعددی به‌طور تجربی اثبات شده است. برای نمونه، تیمار کالوس‌های مرزه خوزستانی (*Satureja khuzestanica*) با نانولوله‌های کربنی چنددیواره موجب افزایش چشمگیر تولید ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی گردید (Ghorbanpour and Hadian, 2015). در کالوس‌های استویا (*Stevia rebaudiana* L.) کاربرد نانوذرات مس (Cu NPs) سبب افزایش سنتز استویوزید شد (Hendawey et al., 2015) و در سلول‌های *Caralluma tuberculata* نانوذرات نقره (Ag NPs) تولید ترکیبات فنلی و فلاونوئیدها را تحریک کرد (Ali et al., 2019). نتایجی از این دست نشان می‌دهد که نانوذرات می‌توانند به‌عنوان محرک‌هایی مؤثر عمل کرده و با تنظیم مسیرهای بیوشیمیایی و متابولیکی، ظرفیت سلول‌های گیاهی را برای تولید متابولیت‌های ثانویه افزایش دهند؛ پدیده‌ای که بیانگر نقش چندوجهی نانوذرات در بازآرایی شبکه‌های دفاعی و متابولیکی گیاه است. هدف این پژوهش، بررسی سازوکارهای بیوشیمیایی و متابولیکی القاشده توسط نانوذرات سبز اکسید مس (Green CuO NPs) در برانگیختگی پاسخ‌های دفاع اکسیداتیو و تحریک بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه در کشت سوسپانسیون سلولی *A. annua* است. در این مطالعه، تلاش شده است تا نقش نانوذرات اکسید مس به‌عنوان الیسیتورهای نانومقیاس در تنظیم شبکه‌های دفاعی سلول از طریق القای تولید گونه‌های فعال اکسیژن^۵ و به‌ویژه هیدروژن پراکسید (H_2O_2) تبیین گردد. بررسی تغییرات در فعالیت آنزیم‌های کلیدی آنتی‌اکسیدان شامل کاتالاز (CAT) آسکوربات پراکسیداز (APX) و گایاکول پراکسیداز (GPX) به‌عنوان شاخصی از شدت پاسخ اکسیداتیو و ارزیابی محتوای فنل و فلاونوئید کل به‌عنوان نمادی از تحریک مسیرهای بیوسنتزی ترکیبات ثانویه، از محورهای اصلی این پژوهش به‌شمار می‌رود. این تحقیق در پی آن است تا با تحلیل همبستگی میان فعال‌سازی دفاع اکسیداتیو و تغییرات متابولیکی، ظرفیت نانوذرات سبز اکسید مس را برای بهینه‌سازی تولید ترکیبات دارویی و ارزیابی سازوکارهای تنظیمی سلول‌های گیاهی در سطح متابولیکی آشکار سازد.

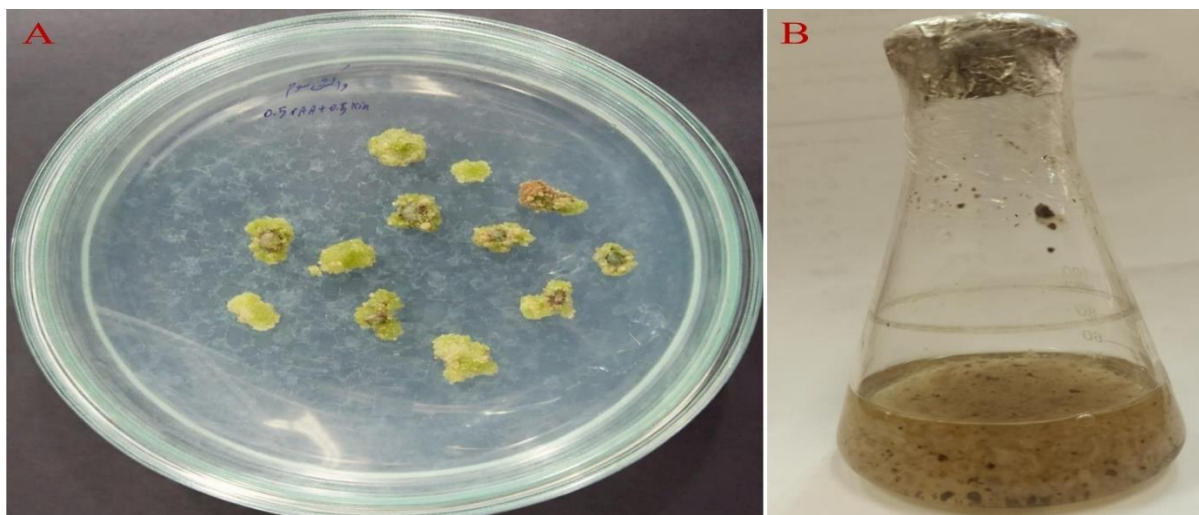
مواد و روش‌ها

بذرهای *A. annua* پس از ضدعفونی با اتانول ۷۰٪ به مدت ۳۰ ثانیه و هیپوکلریت سدیم ۱٪ به مدت پنج دقیقه و سه

2. Nanoparticles (NPs)

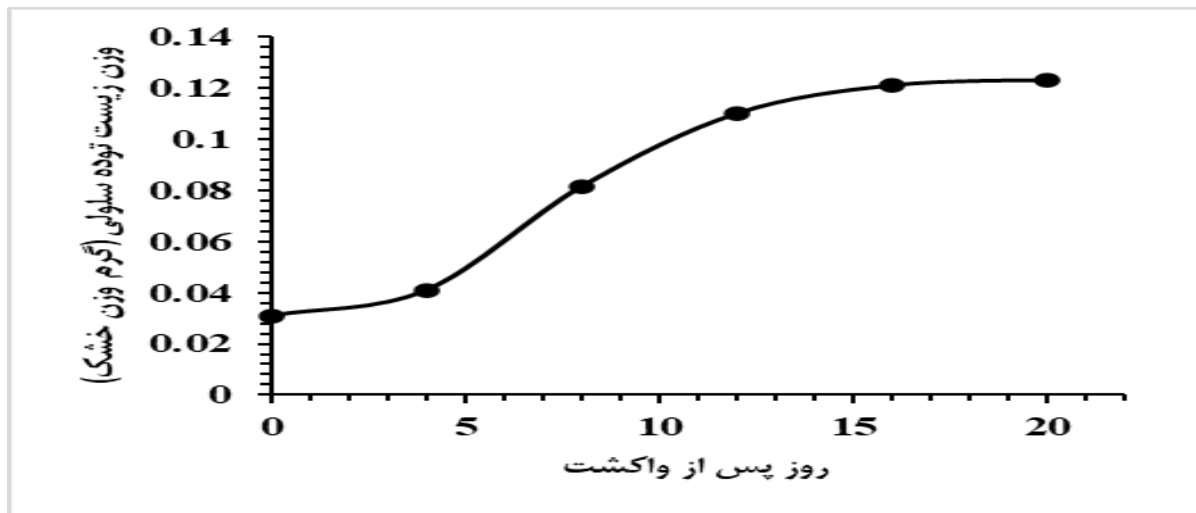
3. Reactive oxygen species (ROS)

مرتب به شستشو با آب مقطر اتوکلاو شده، در محیط کشت پایه موراشیگ و اسکوگ (MS) حاوی ۳٪ ساکاروز و ۰/۷٪ آگار کشت شدند و به اتاقک کشت با شرایط دمای ۲۳ درجه سانتی‌گراد، ۱۶ ساعت روشنایی و شدت نور ۱۵۰۰ لوکس منتقل شدند. پس از گذشت ۲۵ روز از کشت بذور، قطعات برگ برای کالوس‌زایی انتخاب و القای کالوس بر روی محیط پایه MS با میزان ساکارز و آگار مشابه محیط جوانه‌زنی و حاوی تنظیم‌کننده‌های رشد نفتالین استیک اسید (NAA) و کینتین (Kin) هر یک با غلظت ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر انجام گرفت. در ادامه، ریزنمونه‌های منتقل شده به محیط کالوس‌زایی در دمای ۲۳ درجه سانتی‌گراد و تاریکی کامل نگهداری شدند. واکشت کالوس‌های تشکیل شده در بازه‌های زمانی ۲۱ روز انجام گرفت. به منظور تهیه کشت سوسپانسیون سلولی، مقدار ۰/۵ گرم از کالوس‌های با ساختار خشک و شکننده به ارلن‌های ۲۵۰ میلی‌لیتری حاوی ۵۰ میلی‌لیتر محیط پایه MS حاوی ۳۰ گرم در لیتر ساکارز و ترکیب ۰/۲ میلی‌گرم در لیتر از هر یک از تنظیم‌کننده‌های رشد NAA و Kin منتقل و سپس محیط کشت در شرایط تاریک، در دمای ۲۳ درجه سانتی‌گراد و روی شیکر دورانی با سرعت ۱۲۰ دور در دقیقه نگهداری شد. واکشت سوسپانسیون سلولی هر ۲۱ روز از طریق جایگزینی محیط کشت انجام گرفت (شکل ۱). در واکشت سوم و پس از دستیابی به محیط کشت سلولی همگن و پایدار، به منظور تعیین سرعت رشد سلول‌ها و تعیین فازهای رشدی، منحنی رشد سوسپانسیون سلولی از طریق اندازه‌گیری وزن خشک سلول‌ها در بازه‌های چهار روزه ترسیم شد. برای تعیین وزن خشک زیست توده، سلول‌ها با استفاده از کاغذ صافی از محیط کشت جدا و در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد خشک شدند. بر اساس منحنی رشد ترسیم‌شده (شکل ۲)، پیش از رسیدن سلول‌ها به مرحله ایستایی^۶ رشد، تیمار با نانوذرات اکسید مس در روز دهم پس از آخرین واکشت اعمال گردید (Mohammadi *et al.*, 2021).



شکل ۱- کشت کالوس (A) و سوسپانسیون سلولی (B) گیاه درمنه (*Artemisia annua* L.)

Figure 1- Callus and Cell Suspension Cultures in *Artemisia annua* L.



شکل ۲- نمودار رشدی زیست توده سلولی گیاه درمنه در بازه زمانی ۲۰ روز

Figure 2- Growth pattern of *Artemisia annua* cell biomass over a 20-day culture period

نانوذرات مورد استفاده در این مطالعه، پیش‌تر در پژوهش‌های قبلی نویسندگان سنتز و کیفیت ساخت، سطح سمیت آن‌ها بر سلول‌های گیاهی و بازه غلظتی موثر آن در القای پاسخ‌های دفاعی سلول‌های گیاهی مشخص شده است (Khaldari *et al.*, 2021; Khaldari *et al.*, 2024). پیش از انجام تیمارها، به‌منظور پراکندگی بهتر نانوذرات در محیط کشت، محیط کشت حاوی نانوذرات به مدت ۳۰ دقیقه در حمام اولتراسونیک^۱ قرار گرفت. در ادامه، کشت‌های سوسپانسیون سلولی با نانوذرات اکسید مس در سه غلظت صفر، ۲۰ و ۴۰ میکروگرم در میلی‌لیتر تیمار و در بازه‌های زمانی ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت انکوبه^۲ شدند. برای هر تیمار، سه تکرار مستقل در نظر گرفته شد. پس از پایان مدت زمان تیمار، سلول‌های تیمار شده از محیط کشت جدا و زیست‌توده‌ی سلولی جهت اندازه‌گیری فنل و فلاونوئید کل و تحلیل‌های بیوشیمیایی مورد استفاده قرار گرفت. جهت سنجش میزان H_2O_2 ، مقدار ۳۵۰ میلی‌گرم از سلول‌های تیمار شده و سائیده شده در ازت مایع، با استفاده از پنج میلی‌لیتر محلول تری‌کلرواستیک اسید (TCA)، با غلظت ۱٪ مخلوط و همگن شد. سوسپانسیون حاصل به مدت ۱۵ دقیقه با سرعت ۱۲ هزار دور در دقیقه سانتریفیوژ گردید. سپس، به ۰/۵ میلی‌لیتر از مایع شفاف رویی^۳، ۰/۵ میلی‌لیتر بافر فسفات پتاسیم ۱۰ میلی‌مولار (pH=7) و یک میلی‌لیتر یدید پتاسیم (KI) یک‌مولار افزوده شد. سپس جذب نمونه‌ها در طول موج ۳۹۰ نانومتر با استفاده از اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شد. برای تعیین غلظت H_2O_2 در نمونه‌ها، منحنی استاندارد با استفاده از غلظت‌های مختلف H_2O_2 تهیه و مقدار H_2O_2 نمونه‌ها به صورت میکرومول بر گرم وزن تر ($\mu\text{mol } H_2O_2 \text{ g}^{-1} \text{ FW}$) بیان گردید (Alexieva *et al.*, 2001). تعیین مقدار کل پروتئین‌های محلول براساس روش برادفورد (Bradford, 1976) انجام شد. برای استخراج آنزیمی، ۵۰۰ میلی‌گرم از سلول‌های تیمار شده در نیتروژن مایع آسیاب و سپس در دمای چهار درجه سانتی‌گراد با بافر تریس

1. Ultrasonication bath

2. Incubation

1. Supernatant

هیدروکلریک اسید (Tris-HCl) حاوی ۱۰٪ گلیسرول همگن سازی گردید. پس از سانتریفیوژ نمونه های همگن با سرعت ۱۵ هزار دور در دقیقه به مدت ۱۵ دقیقه در دمای چهار درجه سانتی گراد، مایع شفاف رویی برای سنجش فعالیت آنزیم های CAT، GPX و APX مورد استفاده قرار گرفت. فعالیت آنزیم CAT از طریق اندازه گیری نرخ تجزیه H_2O_2 و بر پایه روش Scebba و همکاران (۱۹۹۸) ارزیابی شد. برای انجام واکنش، مخلوطی شامل سه میلی لیتر بافر فسفات ۵۰ میلی مولار (pH=7)، پنج میکرولیتر از محلول H_2O_2 ۳۰٪ و ۵۰ میکرولیتر از عصاره آنزیمی تهیه گردید. کاهش جذب نمونه در طول موج ۲۴۰ نانومتر طی مدت یک دقیقه ثبت شد و فعالیت آنزیم بر حسب میکرومول H_2O_2 تجزیه شده در دقیقه به ازای هر میلی گرم وزن تر ($\mu\text{mol } H_2O_2 \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ FW}$) محاسبه گردید. فعالیت آنزیم APX با پایش اکسایش آسکوربات و بر پایه روش Ranieri (۲۰۰۳) ارزیابی شد. مخلوط واکنش شامل ۱۰۰ میکرولیتر عصاره خام آنزیمی، ۶۰۰ میکرولیتر از محلول $EDTA^{10}$ با غلظت ۰/۱ میلی مولار در ۱/۵ میلی لیتر بافر فسفات پتاسیم ۵۰ میلی مولار (pH=7) و ۰/۴ میلی لیتر آسکوربات ۰/۵ میلی مولار بود. واکنش با افزودن ۰/۴ میلی لیتر از H_2O_2 (۳۰٪) آغاز شد. کاهش جذب نور در طول موج ۲۹۰ نانومتر به مدت چهار دقیقه ثبت گردید و فعالیت آنزیم بر حسب میکرومول آسکوربات اکسید شده در دقیقه به ازای هر میلی گرم پروتئین ($\mu\text{mol oxidized ascorbate min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ protein}$) بیان شد. برای سنجش فعالیت آنزیم GPX، مقدار ۵۰ میکرولیتر از عصاره خام آنزیمی به مخلوط واکنش شامل سه میکرولیتر گایاکول، ۱۰ میکرولیتر H_2O_2 با غلظت ۳۰٪ و سه میلی لیتر بافر فسفات سدیم ۵۰ میلی مولار (pH=7) افزوده شد. تغییر جذب در طول موج ۴۷۰ نانومتر طی یک دقیقه ثبت گردید و فعالیت آنزیم به صورت میکرومول گایاکول اکسید شده در دقیقه به ازای هر میلی گرم پروتئین ($\mu\text{mol oxidized mg}^{-1} \text{ protein}$) بیان شد (Dionisio-Sese and Tobira, 1998). به منظور سنجش محتوای فنولی و فلاونوئیدی کل، عصاره گیری به روش الکلی انجام گرفت. برای این منظور، کشت های سوسپانسیون ابتدا به روش انجمادی^{۱۱} خشک و مقدار ۱۰۰ میلی گرم از بافت خشک شده ابتدا به خوبی ساییده و در پنج میلی لیتر متانول ۹۰٪ همگن شد. به منظور استخراج ترکیبات محلول در متانول، نمونه ها به مدت ۲۰ دقیقه در دستگاه اولتراسونیک در دمای ۴۰ درجه سانتی گراد قرار داده شدند. سپس به مدت ۱۲ ساعت تحت ورتکس ملایم قرار گرفتند. در ادامه، نمونه همگن شده حاصل با سرعت شش هزار دور در دقیقه و مدت زمان ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ و مایع رویی به دست آمده در دمای ۴۵ درجه سانتی گراد به مدت یک ساعت تغلیظ گردید و تا زمان انجام آنالیزهای بعدی در دمای چهار درجه سانتی گراد نگهداری شد. مقدار کل ترکیبات فنولی موجود در عصاره های کشت سوسپانسیون با استفاده از واکنشگر Folin-Ciocalteu و بر اساس روش Singleton *et al* و همکاران (1999) با اندکی تغییرات اندازه گیری شد. برای انجام آزمون، مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از عصاره متانولی با دو میلی لیتر آب مقطر مخلوط

2. Ethylenediaminetetraacetic acid

1. Freeze drying

گردید، سپس یک میلی‌لیتر از واکنشگر Folin-Ciocalteu به آن افزوده شد. پس از گذشت سه دقیقه، یک میلی‌لیتر محلول سدیم کربنات ۲۰٪ به مخلوط اضافه گردید. مخلوط واکنش به مدت ۴۵ دقیقه در تاریکی و در دمای اتاق با ورتکس پیوسته آنکوبه و سپس میزان جذب نوری نمونه‌ها در طول موج ۷۲۵ نانومتر اندازه‌گیری شد. مقدار کل فنول‌ها بر اساس منحنی استاندارد اسیدگالیک (در دامنه غلظتی ۱۰ تا ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر) محاسبه و به صورت میلی‌گرم معادل اسیدگالیک در هر گرم وزن خشک ($\text{mg GAE g}^{-1} \text{DW}$) گزارش شد. تعیین محتوای کل فلاونوئیدها بر اساس روش chang و همکاران (۲۰۰۲) و با اندکی تغییرات انجام شد. برای این منظور، در لوله آزمایش، ۰/۵ میلی‌لیتر عصاره متانولی با ۰/۱ میلی‌لیتر محلول آلومینیوم کلرید ۱۰٪، ۰/۱ میلی‌لیتر استات پتاسیم یک مولار و ۱/۵ میلی‌لیتر اتانول ۹۵٪ مخلوط شد. سپس ۲/۸ میلی‌لیتر آب مقطر اضافه و حجم کلی به پنج میلی‌لیتر رسانده شد. پس از اختلاط کامل با ورتکس، نمونه‌ها به مدت ۳۰ دقیقه در تاریکی نگهداری شدند و سپس میزان جذب نوری در طول موج ۴۱۴ نانومتر با دستگاه طیف‌سنج نوری اسپکتروفوتومتر اندازه‌گیری شد. برای محاسبه مقدار فلاونوئید کل، منحنی استاندارد با استفاده از محلول‌های معادل کوئرستین در بازه غلظتی یک تا ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر تهیه گردید و نتایج به صورت میلی‌گرم معادل کوئرستین در هر گرم وزن خشک ($\text{mg QE g}^{-1} \text{DW}$) بیان شدند. تجزیه و تحلیل آماری داده‌های آزمایش با استفاده از نرم‌افزار SAS نسخه ۹.۳.۱ انجام شد. تجزیه و تحلیل واریانس (ANOVA) بر اساس طرح کاملاً تصادفی (CRD) با سه تکرار و به صورت دوعاملی (فاکتوریل) صورت گرفت. مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح معنی‌داری $P < 0.05$ انجام شد.

نتایج و بحث

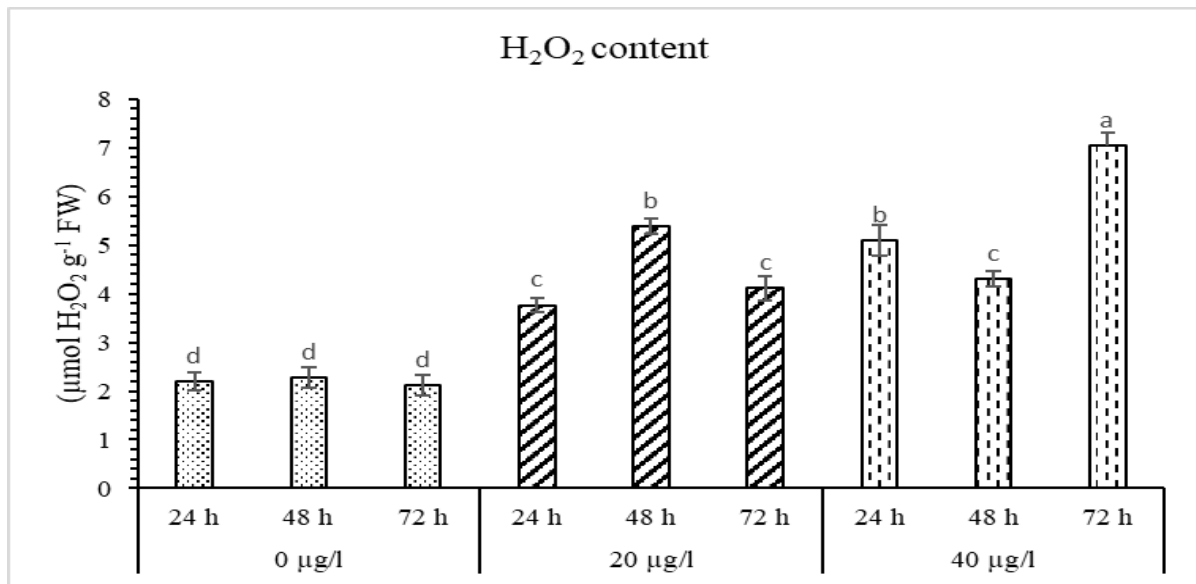
نتایج تحلیل واریانس نشان داد که غلظت نانوذرات، زمان تیمار و اثر متقابل آن‌ها بر خصوصیات بیوشیمیایی و متابولیکی مورد مطالعه در کشت سوسپانسیون سلولی گیاه درمنه اثر معنی‌داری داشتند. به طور خاص، میزان H_2O_2 تحت تأثیر معنی‌دار غلظت و اثر متقابل آن با مدت زمان تیمار قرار گرفت، در حالی که فعالیت آنزیم‌های CAT و APX هر دو به شدت از هر سه عامل (غلظت نانوذرات، مدت زمان تیمار و اثر متقابل آنها) متأثر بودند ($p < 0.01$). فعالیت GPX تنها تحت تأثیر غلظت معنی‌دار بود، در حالی که تغییر در محتوای ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی کل در سطح ۵٪ به تغییرات غلظت و اثر متقابل آن با زمان پاسخ نشان داد. این نتایج نشان می‌دهد که تغییرات در القای تنش اکسیداتیو و فعالیت سیستم‌های آنتی‌اکسیداتیو آنزیمی و مسیرهای بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه مورد مطالعه، تحت تأثیر اثرات متقابل غلظت نانوذرات و زمان تیمار قرار گرفتند، که نشان‌دهنده وابستگی پاسخ سلول‌ها به تعامل هم‌زمان این دو عامل است (جدول ۱). با توجه به نتایج مقایسه میانگین، غلظت نانوذرات به طور معنی‌داری بر میزان تجمع H_2O_2 تأثیر داشته و این اثر به صورت وابسته به زمان بروز کرده است. در تیمار شاهد (صفر میکروگرم در میلی‌لیتر)، مقدار H_2O_2 در تمامی زمان‌ها در سطحی پایین‌تر و نسبتاً ثابت قرار گرفت که نشان‌دهنده وضعیت پایدار اکسیداتیو در سلول‌های بدون نانوذرات است. با افزایش غلظت نانوذرات به ۲۰ میکروگرم

در میلی‌لیتر، محتوای H_2O_2 به‌طور محسوسی افزایش یافت و در زمان ۴۸ ساعت به بیشترین مقدار در این سطح غلظتی رسید، سپس در ۷۲ ساعت اندکی کاهش نشان داد.

جدول ۱- نتایج تجزیه واریانس صفات مورد مطالعه کشت سوسپانسیون سلولی درمنه تحت تأثیر غلظت نانوذرات و مدت زمان تیمار
Table1- Analysis of variance results for the studied traits of *Artemisia* cell suspension culture under the effects of nanoparticle concentration and treatment duration.

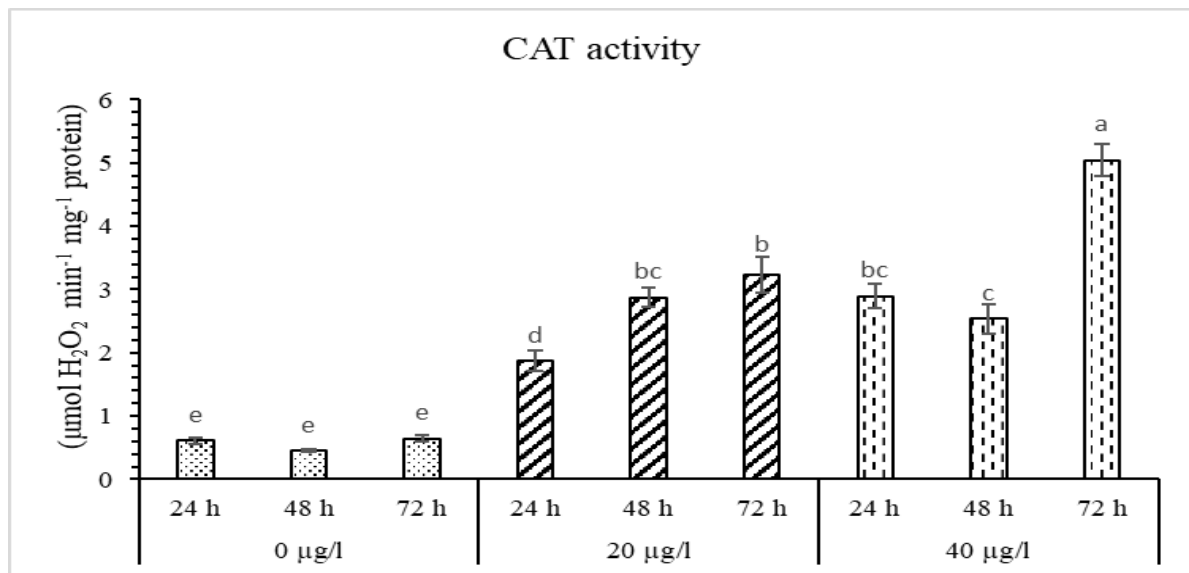
میانگین مربعات Mean Square (MS)						درجه آزادی Degrees of freedom	منابع تغییر Source of Variation
فلاونوئید کل Total Flavonoids	فنل کل Total Phenols	گایاکول پراکسیداز GPX	آسکوربات پراکسیداز APX	کاتالاز CAT	هیدروژن پراکسید H_2O_2		
۱۷۰/۳*	۳۳۴/۱۱*	۰/۳۹۲۵**	۱/۰۹۴**	۳۴/۴**	۴۸/۷۱**	۱	غلظت نانوذرات Concentration
۳/۸۱ ^{NS}	۱۱/۰۸ ^{NS}	۰/۰۰۰۱ ^{NS}	۰/۱۹۴**	۶/۲۷**	۲/۴۶ ^{NS}	۱	مدت زمان تیمار Treatment duration
۱۲۷/۴*	۳۹۰/۷۷*	۰/۰۰۲۵ ^{NS}	۰/۰۹۹**	۳/۳۵**	۳/۰۹*	۱	اثر متقابل غلظت × زمان Concentration × Time
۲۸/۴۶	۶۶/۵۳	۰/۰۰۵۱	۰/۰۰۲	۰/۳۷	۰/۶۷	۲۳	خطا Error
۴۳/۴۸	۳۶/۵۱	۳۱/۴۶	۱۴/۴۲	۲۷/۲۷	۲۰/۳۲		ضریب تغییرات Coefficient of Variation

در سطح غلظت بالاتر یعنی ۴۰ میکروگرم در میلی‌لیتر، روند تجمع H_2O_2 شدت بیشتری یافت و پس از افزایش تدریجی در زمان‌های ۲۴ و ۴۸ ساعت، در زمان ۷۲ ساعت به بیشترین مقدار کل ($7.05 \mu\text{mol } H_2O_2 \text{ g}^{-1} \text{ FW}$) رسید، که از نظر آماری دارای اختلاف معنی‌دار با سایر تیمارها بود. بر اساس نتایج تجزیه واریانس، اثر متقابل بین دو عامل غلظت و زمان معنی‌دار مشاهده شد؛ که بیانگر پاسخ تعاملی سلول‌ها به تنش نانوذرات در گذر زمان است. افزایش تجمع H_2O_2 در غلظت‌های بالا و در زمان‌های طولانی‌تر، نشان‌دهنده تقویت فرآیندهای القای تنش اکسیداتیو و افزایش ROS می‌باشد. این الگو بیانگر آن است که نانوذرات در سطح غلظتی بالاتر، به‌ویژه پس از گذشت ۷۲ ساعت، موجب فعال شدن مسیرهای تولید ROS و در نتیجه افزایش محسوس H_2O_2 می‌گردند. به‌طور خلاصه، اثر نانوذرات بر شاخص H_2O_2 در کشت سوسپانسیون سلولی درمنه هم وابسته به غلظت و هم به زمان تیمار است و اثر متقابل این دو عامل به‌صورت معنی‌داری موجب تشدید تنش اکسیداتیو در سلول‌ها شده است (شکل ۳). فعالیت آنزیم CAT به‌طور معنی‌داری تحت تأثیر غلظت نانوذرات و زمان تیمار قرار گرفت و اثر متقابل بین دو عامل نیز از نظر آماری معنی‌دار بود ($P < 0.01$). همان‌گونه که در نمودار مشاهده می‌شود (شکل ۴)، در تیمار شاهد سطح فعالیت کاتالاز در تمام سطوح زمانی ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت پایین و تقریباً ثابت باقی ماند. با افزایش غلظت نانوذرات به ۲۰ میکروگرم در میلی‌لیتر، فعالیت آنزیم به‌طور محسوسی افزایش یافت و در زمان ۷۲ ساعت به بیشینه مقدار خود ($3.23 \mu\text{mol } H_2O_2 \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ protein}$) در این سطح رسید، که اختلاف معنی‌داری با شاهد نشان داد. در بالاترین سطح غلظتی نانوذرات نیز فعالیت کاتالاز در مقایسه با سایر تیمارها بیشتر بود و پس از روند افزایشی ملایم تا ۷۲ ساعت، به بیشترین سطح کل ($5.04 \mu\text{mol } H_2O_2 \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ protein}$) رسید.



شکل ۳- تأثیر غلظت‌های مختلف (صفر، ۲۰ و ۴۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) از نانوذرات اکسید مس سنتز شده به روش سبز در زمان‌های تیمار مختلف (۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت) بر محتوای H₂O₂ در کشت سوسپانسیون سلولی *Artemisia annua* L. مقادیر نشان‌دهنده‌ی میانگین سه تکرار $\pm$ انحراف استاندارد میانگین (SE) هستند. حروف متفاوت در بالای ستون‌ها بیانگر اختلاف معنی‌دار در سطح $P < 0.05$ بر اساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن می‌باشند.

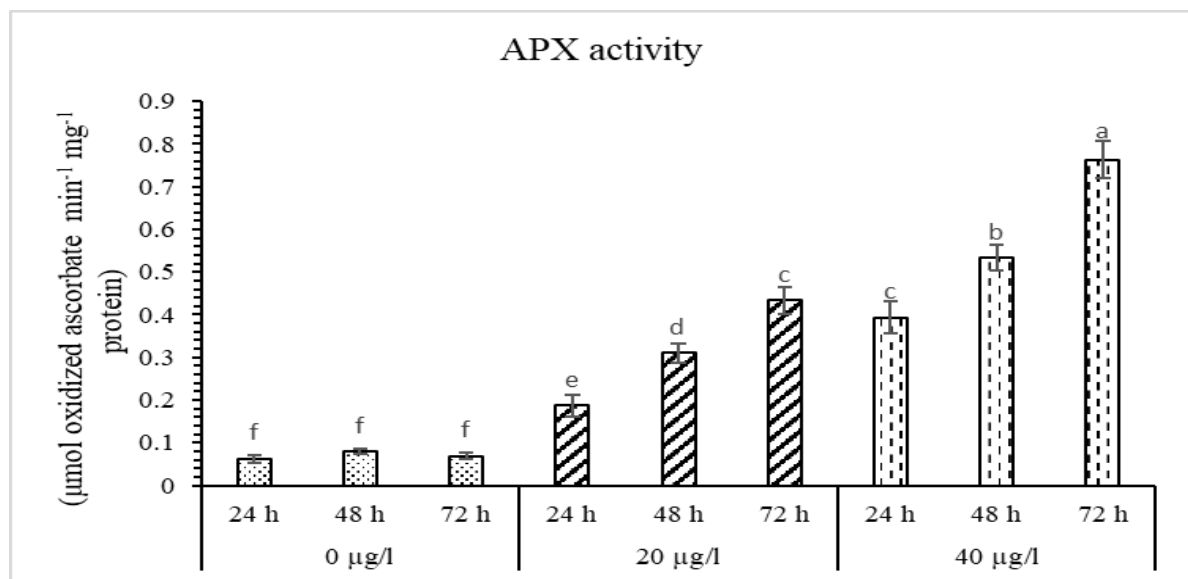
Figure 3- Effects of different concentrations (0, 20, and 40 $\mu\text{g mL}^{-1}$) of green-synthesized CuO nanoparticles at different exposure times (24, 48, and 72 h) on H₂O₂ content in *Artemisia annua* cell suspension cultures. Values are means of three replicates $\pm$ SE. Different letters above the columns indicate significant differences at $P < 0.05$ according to Duncan's multiple range test.



شکل ۴- تأثیر غلظت‌های مختلف (صفر، ۲۰ و ۴۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) از نانوذرات اکسید مس سنتز شده به روش سبز در زمان‌های تیمار مختلف (۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت) بر فعالیت آنزیم کاتالاز در کشت سوسپانسیون سلولی *Artemisia annua* L. مقادیر نشان‌دهنده‌ی میانگین سه تکرار $\pm$ انحراف استاندارد میانگین (SE) هستند. حروف متفاوت در بالای ستون‌ها بیانگر اختلاف معنی‌دار در سطح $P < 0.05$ بر اساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن می‌باشند.

Figure 4- Effects of different concentrations (0, 20, and 40 $\mu\text{g mL}^{-1}$) of green-synthesized CuO nanoparticles at different exposure times (24, 48, and 72 h) on catalase activity in *Artemisia annua* cell suspension cultures. Values are means of three replicates $\pm$ SE. Different letters above the columns indicate significant differences at $P < 0.05$ according to Duncan's multiple range test.

نتایج نشان داد که پویایی فعالیت آنزیم APX الگویی مشابه با فعالیت آنزیم CAT از خود بروز می‌دهد. به گونه‌ای که در تیمار شاهد سطح فعالیت آنزیم در تمامی زمان‌ها پایین و تقریباً ثابت باقی ماند، که معرف وضعیت پایه سامانه آنتی‌اکسیدانی در سلول‌های بدون تنش است. در غلظت ۲۰ میکروگرم در میلی‌لیتر نانوذرات، مقدار فعالیت APX با گذشت زمان به صورت پویایی افزایش یافت و در زمان ۷۲ ساعت به بیشترین مقدار خود ($0.43 \mu\text{mol oxidized ascorbate min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{protein}$) در این سطح غلظتی رسید. با افزایش غلظت به ۴۰ میکروگرم در میلی‌لیتر، روند فعالیت آنزیم به شکل چشمگیری افزایش یافت؛ به طوری که پس از گذشت ۷۲ ساعت از تیمار سلول‌ها، فعالیت APX به بیشترین مقدار فعالیت خود ($0.76 \mu\text{mol oxidized ascorbate min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{protein}$) نسبت به سایر ترکیبات تیماری رسید (شکل ۵). اثر متقابل معنی‌دار غلظت نانوذرات و زمان تیمار مشاهده شده در شاخص‌های CAT و APX، نشان‌دهنده‌ی پاسخ تعاملی و وابسته به هر دو عامل در تنظیم فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیداتیو تحت شرایط تنش نانوذرات است. این نتیجه بیانگر نقش هماهنگ و زمان‌مند سامانه‌های دفاعی در مقابله با پراکسید هیدروژن و گونه‌های فعال اکسیژن تولیدشده در اثر تیمار نانوذرات می‌باشد.

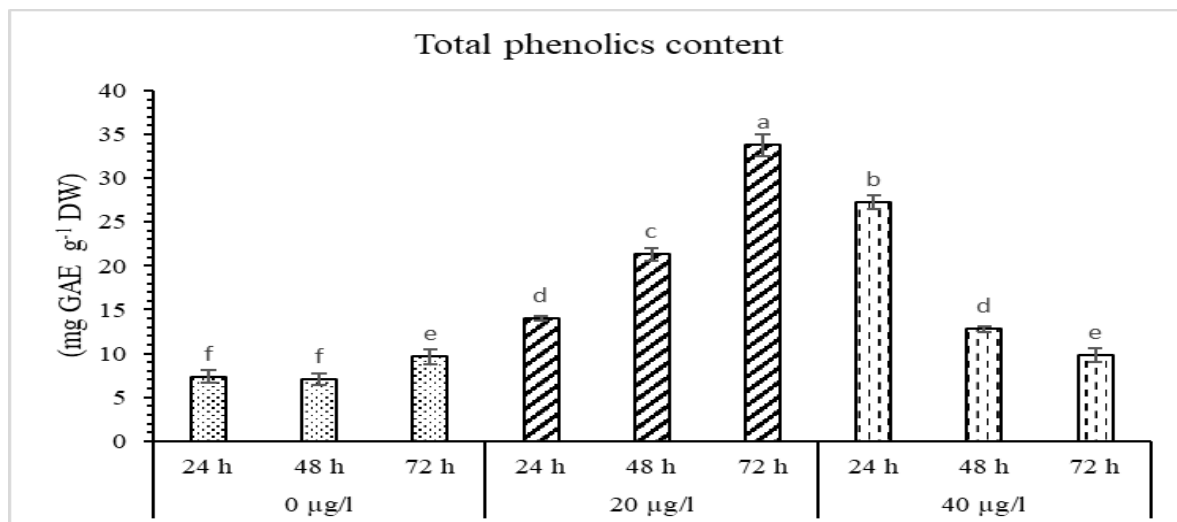


شکل ۵- تأثیر غلظت‌های مختلف (صفر، ۲۰ و ۴۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) از نانوذرات اکسید مس سنتز شده به روش سبز در زمان‌های تیمار مختلف (۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت) بر فعالیت آنزیم آسکوبارت پراکسیداز در کشت سوسپانسیون سلولی *Artemisia annua* L. مقادیر نشان‌دهنده‌ی میانگین سه تکرار $\pm$ انحراف استاندارد میانگین (SE) هستند. حروف متفاوت در بالای ستون‌ها بیانگر اختلاف معنی‌دار در سطح $P < 0.05$ بر اساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن می‌باشند.

Figure 5- Effects of different concentrations (0, 20, and 40 $\mu\text{g mL}^{-1}$) of green-synthesized CuO nanoparticles at different exposure times (24, 48, and 72 h) on ascorbate peroxidase activity in *Artemisia annua* cell suspension cultures. Values are means of three replicates $\pm$ SE. Different letters above the columns indicate significant differences at $P < 0.05$ according to Duncan's multiple range test.

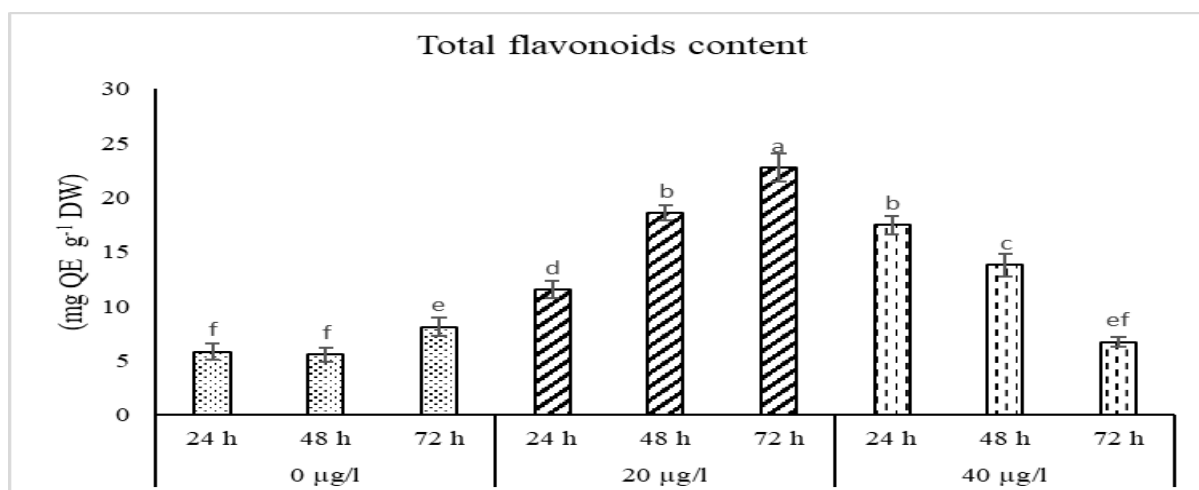
به طور کلی الگوی پویایی بروز تنش اکسیداتیو و فعالیت سامانه‌های دفاع آنتی اکسیدانی آنزیمی بیانگر آن است که افزایش غلظت نانوذرات، به‌ویژه در دوره‌های زمانی طولانی‌تر، موجب القای فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانی به‌منظور مهار تجمع ROS از جمله H_2O_2 می‌شود. مشاهده‌ی بیشترین فعالیت آنزیم CAT و APX در تیمار با بیشترین سطوح غلظتی و زمانی، نشان‌دهنده‌ی پاسخ سازگارانه سلول‌های سوسپانسیون در برابر تنش نانوالیسیستورها و تلاش سامانه دفاع آنتی اکسیدانی برای حفظ تعادل اکسایش-کاهش^{۱۲} سلولی است. به‌طور کلی، روند تغییرات هر دو آنزیم CAT و APX تأیید می‌کند که فعال شدن سیستم آنتی اکسیدانی در سلول‌های تیمار شده ماهیتی وابسته به غلظت و زمان دارد و نقش چشمگیری در تعدیل تنش اکسیداتیو ناشی از نانوذرات ایفا می‌کند. نتایج حاصل از بررسی محتوای فنول و فلاونوئید کل در کشت سوسپانسیون درمنه نشان داد که هر دو شاخص به‌طور معنی‌داری تحت تأثیر غلظت نانوذرات و برهم‌کنش دو عامل غلظت و زمان تیمار قرار گرفتند. در هر دو شاخص، کمترین مقادیر در تیمار شاهد فاقد نانوذرات مشاهده شد که در تمامی زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت در کمترین میزان خود قرار گرفتند. با افزایش غلظت نانوذرات تا ۲۰ میکروگرم در میلی‌لیتر، میزان بیوسنتز هر دو گروه متابولیت روندی افزایشی و وابسته به زمان نشان داد؛ مقدار فنول کل از حدود $14 \text{ mg GAE g}^{-1} \text{ DW}$ در ۲۴ ساعت به $33.8 \text{ mg GAE g}^{-1} \text{ DW}$ در ۷۲ ساعت افزایش یافت. از سوی دیگر محتوای فلاونوئید نیز از حدود $11.5 \text{ mg QE g}^{-1} \text{ DW}$ در ۲۴ ساعت به $22.8 \text{ mg QE g}^{-1} \text{ DW}$ در ۷۲ ساعت افزایش یافت (شکل ۶ و ۷). با افزایش غلظت نانوذرات تا ۴۰ میکروگرم در میلی‌لیتر، بیوسنتز متابولیت‌های مورد مطالعه روندی کاملاً متفاوت از خود نشان داد. به طوری که در اولین نمونه برداری (۲۴ ساعت) افزایش چشم‌گیر بیوسنتز و تجمع ترکیبات فنل و فلاونوئید نسبت به تیمار شاهد قابل مشاهده بود ($27.2 \text{ mg GAE g}^{-1} \text{ DW}$ و $17.45 \text{ mg QE g}^{-1} \text{ DW}$). در مقابل با افزایش مدت زمان تیمار، روندی کاهشی از تجمع متابولیت‌های مذکور مشاهده شد؛ به‌گونه‌ای که در بیشترین مدت زمان تیمار (۷۲ ساعت) میزان فنل و فلاونوئید کل به ترتیب تا $9.8 \text{ mg GAE g}^{-1} \text{ DW}$ و $6.7 \text{ mg QE g}^{-1} \text{ DW}$ کاهش یافت (شکل ۶ و ۷). ارزیابی فاکتورهای تولید ROS و فعالیت سامانه‌های دفاع آنتی اکسیدانی آنزیمی و غیر آنزیمی در سلول‌ها، از موثرترین روش‌های درک بروز تنش اکسیداتیو ناشی از عوامل تنش‌زا محسوب می‌شوند (Anjum *et al.*, 2012). تولید ROS به‌ویژه H_2O_2 در سلول‌های گیاهی، بیانگر وقوع تنش اکسیداتیو است که به‌دنبال آن سامانه‌های دفاع آنتی اکسیدانی در پاسخ به شرایط تنش فعال می‌شوند (Low and Merida, 1996). گزارش‌های متعددی نشان می‌دهند که اعمال تیمار نانوذرات موجب القای تنش اکسیداتیو و برانگیختگی چشمگیر فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدان می‌شود؛ واکنشی که به‌عنوان یکی از مؤلفه‌های اصلی سامانه دفاعی گیاه در برابر تنش‌های اکسیداتیو شناخته می‌شود. برای مثال، در گیاهچه‌های گندم، تیمار نانوذرات اکسید روی و مس سبب افزایش فعالیت آنزیم CAT شده است

(Dimkpa *et al.*, 2012)؛ همچنین در آرابیدوپسیس تیمار با نانوذرات اکسید مس منجر به القای فعالیت آنزیم‌های CAT، APX و GPX و افزایش بیان ژن‌های مرتبط با پاسخ به تنش اکسیداتیو گردیده است (Nair and Chung, 2014).



شکل ۶- تأثیر غلظت‌های مختلف (صفر، ۲۰ و ۴۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) از نانوذرات اکسید مس سنتز شده به روش سبز در زمان‌های تیمار مختلف (۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت) بر بیوسنتز و تجمع محتوای فنل کل در کشت سوسپانسیون سلولی *Artemisia annua* L. مقادیر نشان‌دهنده میانگین سه تکرار $\pm$ انحراف استاندارد میانگین (SE) هستند. حروف متفاوت در بالای ستون‌ها بیانگر اختلاف معنی‌دار در سطح $P < 0.05$ بر اساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن می‌باشند.

Figure 6- Effects of different concentrations (0, 20, and 40 $\mu\text{g mL}^{-1}$) of green-synthesized CuO nanoparticles at different exposure times (24, 48, and 72 h) on biosynthesis and accumulation of total phenolics content in *Artemisia annua* cell suspension cultures. Values are means of three replicates $\pm$ SE. Different letters above the columns indicate significant differences at $P < 0.05$ according to Duncan's multiple range test.



شکل ۷- تأثیر غلظت‌های مختلف (صفر، ۲۰ و ۴۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) از نانوذرات اکسید مس سنتز شده به روش سبز در زمان‌های تیمار مختلف (۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت) بر بیوسنتز و تجمع محتوای فلاونوئید کل در کشت سوسپانسیون سلولی *Artemisia annua* L. مقادیر نشان‌دهنده میانگین سه تکرار $\pm$ انحراف استاندارد میانگین (SE) هستند. حروف متفاوت در بالای ستون‌ها بیانگر اختلاف معنی‌دار در سطح $P < 0.05$ بر اساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن می‌باشند.

Figure 7- Effects of different concentrations (0, 20, and 40 $\mu\text{g mL}^{-1}$) of green-synthesized CuO nanoparticles at different exposure times (24, 48, and 72 h) on biosynthesis and accumulation of total flavonoids content in *Artemisia annua* cell suspension cultures. Values are means of three replicates $\pm$ SE. Different letters above the columns indicate significant differences at $P < 0.05$ according to Duncan's multiple range test.

علاوه بر این، در سیستم‌های کشت بافت و سلول نیز گزارشات مشابهی نظیر افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در کالوس‌های مرزه خوزستانی تیمارشده با نانوذرات بر پایه کربن (Ghorbanpour and Hadian, 2015) و القای تنش اکسیداتیو در سلول‌های گیاه شقایق شرقی (*Papaver orientale* L.) تحت تیمار نانوذرات اکسید مس در دسترس است (Khaldari et al., 2024). چنین مطالعاتی نشان داده‌اند که سلول‌های گیاهی در مواجهه با نانوذرات، مجموعه‌ای متنوع، پیچیده و درهم‌تنیده از پاسخ‌ها را در سطوح مولکولی و بیوشیمیایی بروز می‌دهند. برخی از این پاسخ‌ها در مراحل اولیه ظاهر می‌شوند؛ مانند بروز تنش اکسیداتیو؛ درحالی‌که بخشی دیگر به‌واسطه انتقال سیگنال‌های ناشی از تنش ایجاد شده، منجر به تغییر در الگوهای بیوسنتزی مرتبط با متابولیسم‌های ثانویه و بروز تغییرات کمی و کیفی در محتوای این متابولیت‌ها می‌شوند. بر اساس یافته‌های این پژوهش و مطالعات پیشین درباره نقش نانوذرات در القای مسیرهای منتهی به تولید متابولیت‌های ثانویه (Tan et al., 2009; Fazal et al., 2019)، می‌توان نتیجه گرفت که نانوذرات اکسید مس به طور چشمگیری سبب افزایش تولید H_2O_2 و ایجاد تنش اکسیداتیو در سلول‌های گیاهی می‌شوند. به‌دنبال وقوع این وضعیت، سلول‌ها با افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی نظیر CAT و APX تلاش می‌کنند اثرات زیان‌بار تجمع H_2O_2 را خنثی کنند. مطالعات مرتبط با فرایندهای انتقال سیگنال و پاسخ به تنش نشان داده‌اند که القای تنش اکسیداتیو و افزایش تجمع مولکول‌هایی نظیر H_2O_2 ، نقش محوری در مسیرهای دفاعی گیاه و القای بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه دارد. این مولکول‌ها، چه به‌صورت مستقل و چه در تعامل شبکه‌ای با سایر پیام‌رسان‌های سلولی، با فعال‌سازی مکانیسم‌های حفاظتی، مقاومت گیاه را در برابر شرایط نامساعد محیطی ارتقاء می‌دهند. چنین پاسخ‌هایی با تعدیل مسیرهای متابولیکی همراه بوده و به افزایش انباشت ترکیبات سودمند منجر می‌گردند. به‌عنوان نمونه، پرولین، کاروتنوئیدها، گلوکاتینون، اسید آسکوربیک و ترکیبات فنولی از مهم‌ترین مواد تولیدشده برای مهار و جبران صدمات ناشی از تنش اکسیداتیو محسوب می‌شوند (Chen et al., 2022; Zhang et al., 2021). هرچند H_2O_2 به‌عنوان یک مولکول پیام‌رسان کلیدی در تنظیم مسیرهای مرتبط با بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه در سلول‌های گیاهی شناخته شده است، اما هنوز نقش دقیق آن در انتقال پیام به مسیرهای پایین‌دستی، برنامه‌ریزی مجدد الگوهای بیان ژنی و در نهایت کنترل سطوح تولید ترکیبات ثانویه به‌طور کامل روشن نیست. با این حال، تا حدودی مشخص شده است که چنین مولکول‌هایی در انتقال سیگنال‌های القاشده توسط نانوذرات به مسیرهای پایین‌دستی دخیل هستند؛ فرآیندی که به‌نظر می‌رسد با افزایش لحظه‌ای غلظت یون‌های کلسیم (Ca^{2+}) و فعال‌سازی مسیرهای کیناز فعال‌شونده با میتوژن 13 (MAPK) ارتباط دارد (Fazal et al., 2019). در پشتیبانی از این فرضیه، مطالعاتی افزایش سطح Ca^{2+} و پروتئین‌های مرتبط با مسیر سیگنال‌دهی MAPK را در ریشه‌های برنج تیمارشده با نانوذرات نقره گزارش کرده‌اند. همچنین، در این پژوهش مشخص شده است که آبشارهای MAPK و فعال‌سازی فاکتورهای رونویسی پایین‌دستی نقش کلیدی در بازبرنامه‌ریزی رونویسی ژن‌های

دخیل در متابولیت‌های ثانویه ایفا می‌کنند (Mirzajani *et al.*, 2014). برخی پژوهش‌های متمرکز بر القای بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه از طریق الیستورها به وضوح نشان می‌دهند که بسیاری از الیسیتورهای کارا نظیر فیتوهورمون‌های متیل جاسمونات یا سالیسیلیک اسید نیز حداقل بخشی از فرآیندهای منتهی به بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه گیاهی را از طریق القای تنش اکسیداتیو و تجمع مولکول‌های نظیر H_2O_2 به سرانجام می‌رسانند. از این موارد می‌توان به همبستگی مثبت در بروز تنش اکسیداتیو و افزایش تولید H_2O_2 با بیوسنتز ترکیبات ترپنوئید در گیاه نعنا فلفلی تحت تیمار الیسیتورهای فیتوهورومونی اشاره کرد (Khaldari *et al.*, 2025; Afkar and Karimzadeh, 2025). بنابراین، شواهد تجربی فزاینده به‌روشنی بر نقش محوری القای تنش اکسیداتیو و تجمع H_2O_2 در تنظیم و کنترل مسیرهای بیوسنتزی متابولیت‌های ثانویه دلالت دارند. بر این اساس، می‌توان نتیجه گرفت که در این پژوهش، غلظت پایین نانوذرات اکسید مس (۲۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) باعث القای تنش اکسیداتیو کنترل‌شده در سلول‌های *A. annua* می‌شود؛ به‌گونه‌ای که تجمع H_2O_2 محدود و فعالیت آنزیم‌های CAT و APX در حد متعادل باقی می‌ماند. مولکول‌های H_2O_2 حاصل، نقش حساسی در آغاز مسیرهای سیگنال‌دهی پایین‌دستی ایفا می‌کنند که در نهایت موجب فعال‌سازی مکانیزم‌های دفاعی و القای بیوسنتز ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی می‌شود. افزایش مدت تیمار (تا ۷۲) باعث تشدید و تداوم انتقال سیگنال شده و در نتیجه انباشت بیشتر ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی را به‌دنبال دارد. بنابراین، می‌توان گفت که غلظت نانوذرات و زمان تیمار هر دو از عوامل تعیین‌کننده در افزایش میزان بیوسنتز و تجمع ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی به شمار می‌روند. در سطوحی غلظتی بالاتر نانوذرات (۴۰ میکروگرم در میلی‌لیتر)، گرچه در ابتدا (۲۴ ساعت) شاهد القای تنش اکسیداتیو (افزایش محتوای H_2O_2) و بروز پاسخ‌های دفاعی (فعالیت CAT و APX) متعادل هستیم، اما با گذشت مدت زمان تیمار (۷۲ ساعت)، شدت تنش اکسیداتیو در قیاس با تیمارهای با غلظت کمتر، به‌طور چشمگیری افزایش می‌یابد که با افزایش چشمگیر مقدار H_2O_2 و افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان قابل مشاهده است (اشکال ۳ تا ۵). این در حالی است که گرچه غلظت بالاتر نانوذرات در ابتدا (۲۴ ساعت) افزایش بیوسنتز ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی را به‌دنبال دارد، اما در ادامه و با افزایش مدت زمان تیمار سلول‌ها، محتوای فنلی و فلاونوئیدی به‌طور محسوسی کاهش یافته تا به پایین‌ترین میزان خود در ۷۲ ساعت پس از تیمار برسند (شکل ۶ و ۷). براساس مطالعات Lin و همکاران (2009) و Khaldari و همکاران (۲۰۲۱)، استفاده از نانوذرات در غلظت‌های بالا می‌تواند به‌جای ایجاد پاسخ تحریکی، موجب بروز تنش اکسیداتیو شدید در سلول‌های گیاهی شود. چنین سطحی از تنش، با تولید بیش‌ازحد ROS از جمله H_2O_2 همراه است که با غشاهای سلولی و اندامک‌هایی نظیر کلروپلاست و میتوکندری برهم‌کنش مستقیم دارد و به تدریج منجر به تخریب ساختار و عملکرد آن‌ها می‌گردد. با توجه به مشاهدات این پژوهش، به نظر می‌رسد در ابتدا، سلول‌های *A. annua* در مواجهه با غلظت‌های متعادل‌تر نانوذرات (۲۰ میکروگرم در میلی‌لیتر)، با فعال‌سازی مسیرهای دفاعی و آنتی‌اکسیدانی و همچنین تحریک سنتز متابولیت‌های ثانویه (فنول‌ها و فلاونوئیدها) سعی در حفظ تعادل

بیوشیمیایی و پایداری سلولی را دارند. اما در غلظت‌های بحرانی‌تر (۴۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) و با گذشت زمان بیشتر تیمار (۴۸ تا ۷۲ ساعت)، افزایش ROS از مرز ظرفیت حفاظتی سلول عبور می‌کند و سیستم آنتی‌اکسیدانی (GPX و APX، CAT) دیگر قادر به مهار مؤثر آن نیست. در این شرایط، سلول از حالت پاسخ سازگارانه به حالت تنش مخرب گذر می‌کند. این تغییر فاز منجر به اختلال در عملکرد پایداری سلولی، آنزیم‌های کلیدی و مجموعه سیستم متابولیکی و در نتیجه کاهش سنتز ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی می‌شود. علاوه بر این، افزایش شدید ROS خود باعث تجزیه و اکسیداسیون ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی موجود می‌گردد؛ زیرا این ترکیبات به‌عنوان بخشی از سامانه‌های آنتی‌اکسیدانی غیرآنزیمی، مستقیماً در حذف ROS مصرف می‌شوند (Agati *et al.*, 2012; Michalak, 2006). بنابراین، کاهش مشاهده‌شده در مقادیر فنلی و فلاونوئیدی در تیمارهای مذکور، نه تنها بازتابی از کاهش بازدهی مسیرهای بیوسنتزی است، بلکه ناشی از مصرف دفاعی و تخریب اکسیداتیو ترکیبات تولیدشده نیز می‌باشد. این پدیده چرخشی از پاسخ تحریکی به پاسخ بازدارنده، پدیده‌ای شناخته‌شده در تعامل گیاه و نانوذرات است و در چارچوب مفهوم وابستگی دوز و زمان قابل توضیح است.

نتیجه‌گیری

یافته‌های این پژوهش نشان داد که نانوذرات اکسید مس سنتز شده به روش سبز، به‌عنوان الیسیتورهای نانومقیاس، می‌توانند پاسخ‌های دفاعی سلول‌های *A. annua* را از طریق القای تنش اکسیداتیو و تجمع H_2O_2 فعال کنند. در غلظت‌های پایین‌تر (۲۰ میکروگرم در میلی‌لیتر)، این محرک موجب افزایش متعادل فعالیت آنزیم‌های CAT و APX و به‌دنبال آن بیوسنتز وابسته به زمان ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی شد. در مقابل، غلظت‌های (۴۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) هرچند در مراحل اولیه تولید این ترکیبات را افزایش دادند، اما با تداوم تیمار، تنش اکسیداتیو شدید از ظرفیت حفاظتی سلول فراتر رفت و کاهش معنی‌دار مقادیر این متابولیت‌ها رخ داد. بر اساس الگوهای مشاهده‌شده و مطالعات پیشین، به‌نظر می‌رسد H_2O_2 به‌عنوان یکی از اجزای کلیدی پاسخ دفاعی، در فعال‌سازی فرآیندهای بیوسنتزی نقش داشته باشد، هرچند بررسی دقیق سازوکارهای سیگنال‌دهی آن و مسیرهای پایین‌دستی، نیازمند پژوهش‌های تکمیلی است. نتایج این مطالعه بر اهمیت مدیریت دقیق غلظت و زمان تیمار برای بهره‌گیری از اثرات تحریکی نانوذرات و جلوگیری از اثرات مخرب تأکید دارد.

منابع

- Afkar, S., & Karimzadeh, G. (2025). Changes in Physiological Traits, Gene Expression and Phytochemical Profile of *Mentha piperita* in Response to Elicitor. *Biochemical Genetics*, 63(3), 2025-2039. <https://doi.org/10.1007/s10528-024-10805-6>.
- Agati, G., Azzarello, E., Pollastri, S., & Tattini, M. (2012). Flavonoids as antioxidants in plants: location and functional significance. *Plant science*, 196, 67-76. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2012.07.014>.
- Alexieva, V., Sergiev, I., Mapelli, S. & Karanov, E. The effect of drought and ultraviolet radiation on growth and stress markers in pea and wheat. *Plant. Cell. Environ.* 24, 1337–1344 (2001). <https://doi.org/10.1046/j.1365-3040.2001.00778.x>.

- Ali, A., Mohammad, S., Khan, M. A., Raja, N. I., Arif, M., Kamil, A., & Mashwani, Z. U. R. (2019). Silver nanoparticles elicited in vitro callus cultures for accumulation of biomass and secondary metabolites in *Caralluma tuberculata*. *Artificial cells, nanomedicine, and biotechnology*, 47(1), 715-724. <https://doi.org/10.1080/21691401.2019.1577884>.
- Anjum, N. A., Gill, S. S., Duarte, A. C., Pereira, E. & Ahmad, I. Silver nanoparticles in soil-plant systems. *J. Nanoparticle Res.* 15, 1896 (2013). <https://doi.org/10.1007/s11051-013-1896-7>.
- Bhakuni, R. S., Jain, D. C., Sharma, R. P., & Kumar, S. (2001). Secondary metabolites of *Artemisia annua* and their biological activity. *Current science*, 35-48.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, 72(1-2), 248-254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3).
- Chang, C., Yang, M., Wen, H. and Chern, J. (2002) Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. *Food and Drug Analysis* 10: 178-182. <https://doi.org/10.38212/2224-6614.2748>.
- Chen, H., Bullock, D. A.Jr., Alonso, J. M., and Stepanova, A. N. (2022). To fight or to grow: the balancing role of ethylene in plant abiotic stress responses. *Plants* 11, 33. <https://doi.org/10.3390/plants11010033>.
- de Vries, P. J., & Dien, T. K. (1996). Clinical pharmacology and therapeutic potential of artemisinin and its derivatives in the treatment of malaria. *Drugs*, 52(6), 818-836. <https://doi.org/10.2165/00003495-199652060-00004>.
- Dimkpa, C. O., McLean, J. E., Latta, D. E., Manangón, E., Britt, D. W., Johnson, W. P., ... & Anderson, A. J. (2012). CuO and ZnO nanoparticles: phytotoxicity, metal speciation, and induction of oxidative stress in sand-grown wheat. *Journal of nanoparticle research*, 14(9), 1125. <https://doi.org/10.1007/s11051-012-1125-9>.
- Dionisio-Sese, M. L. & Tobita, S. Antioxidant responses of rice seedlings to salinity stress. *Plant Sci.* 135, 1-9 (1998). [https://doi.org/10.1016/S0168-9452\(98\)00025-9](https://doi.org/10.1016/S0168-9452(98)00025-9).
- Fazal, H., Abbasi, B. H., Ahmad, N., Ali, M., Shujait Ali, S., Khan, A., & Wei, D. Q. (2019). Sustainable production of biomass and industrially important secondary metabolites in cell cultures of selfheal (*Prunella vulgaris* L.) elicited by silver and gold nanoparticles. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*, 47(1), 2553-2561 <https://doi.org/10.1080/21691401.2019.1625913>.
- Ghorbanpour, M., & Hadian, J. (2015). Multi-walled carbon nanotubes stimulate callus induction, secondary metabolites biosynthesis and antioxidant capacity in medicinal plant *Satureja khuzestanica* grown in vitro. *Carbon*, 94, 749-759. <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbon.2015.07.056>
- Hendawey, M. H., FADL, R., & El-Din, T. S. (2015). Biochemical role of some nanoparticles in the production of active constituents in *Stevia rebaudiana* L. callus. *Life Science Journal*, 12(7), 144-156.
- Hien, T. T., & White, N. J. (1993). Qinhaosu. *The Lancet*, 341(8845), 603-608.
- Kelly, K. (2009). History of medicine, facts on file. *New York NY*, 10001.
- Khaldari, I., Afshoon, E., & Nik, S. H. (2025). Phytohormonal elicitation triggers oxidative stress and enhances menthol biosynthesis through modulation of key pathway genes in *Mentha piperita* L. *Scientific Reports*, 15(1), 30495. <https://doi.org/10.1038/s41598-025-16667-1>.
- Khaldari, I., Naghavi, M. R., & Motamedi, E. (2021). Synthesis of green and pure copper oxide nanoparticles using two plant resources via solid-state route and their phytotoxicity assessment. *RSC advances*, 11(6), 3346-3353. <https://doi.org/10.1039/D0RA09924D>.
- Khaldari, I., Naghavi, M. R., Motamedi, E., & Zargar, M. (2024). The effects of green and chemically-synthesized copper oxide nanoparticles on the production and gene expression of morphinan alkaloids in *Oriental poppy*. *Scientific Reports*, 14(1), 6000. <https://doi.org/10.1038/s41598-024-56709-8>.
- Kinghorn, A. D. (2001). Pharmacognosy in the 21st century. *Journal of pharmacy and pharmacology*, 53(2), 135-148.
- Lala, S. (2021). Nanoparticles as elicitors and harvesters of economically important secondary metabolites in higher plants: A review. *IET nanobiotechnology*, 15(1), 28-57. <https://doi.org/10.1049/nbt2.12005>.

Lin, C., Fugetsu, B., Su, Y., & Watari, F. (2009). Studies on toxicity of multi-walled carbon nanotubes on Arabidopsis T87 suspension cells. *Journal of Hazardous Materials*, 170(2-3), 578-583. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2009.05.025>.

Low, P. S., & Merida, J. R. (1996). The oxidative burst in plant defense: function and signal transduction. *Physiologia Plantarum*, 96(3), 533-542. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1996.tb00469.x>.

Michalak, A. (2006). Phenolic compounds and their antioxidant activity in plants growing under heavy metal stress. *Polish journal of environmental studies*, 15(4), 523-530.

Mirzajani, F., Askari, H., Hamzelou, S., Schober, Y., Römp, A., Ghassempour, A., & Spengler, B. (2014). Proteomics study of silver nanoparticles toxicity on *Oryza sativa* L. *Ecotoxicology and environmental safety*, 108, 335-339. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2014.07.013>.

Mohammadi, F., Naghavi, M. R., Peighambari, S. A., Khosravi Dehaghi, N., Khaldari, I., Bravi, E., ... & Perretti, G. (2021). Abscissic acid crosstalk with auxin and ethylene in biosynthesis and degradation of inulin-type fructans in chicory. *Plant Biology*, 23(4), 636-642. <https://doi.org/10.1111/plb.13252>.

Nair, P. M. G., & Chung, I. M. (2014). Impact of copper oxide nanoparticles exposure on Arabidopsis thaliana growth, root system development, root lignification, and molecular level changes. *Environmental Science and Pollution Research*, 21(22), 12709-12722. <https://doi.org/10.1007/s11356-014-3210-3>.

Narayani, M., & Srivastava, S. (2017). Elicitation: a stimulation of stress in in vitro plant cell/tissue cultures for enhancement of secondary metabolite production. *Phytochemistry reviews*, 16(6), 1227-1252. <https://doi.org/10.1007/s11101-017-9534-0>.

Ramachandra Rao, S., & Ravishankar, G. A. (2002). Plant cell cultures: Chemical factories of secondary metabolites. *Biotechnology Advances*, 20(2), 101-153. [https://doi.org/10.1016/S0734-9750\(02\)00007-1](https://doi.org/10.1016/S0734-9750(02)00007-1).

Ranieri, A., Castagna, A., Pacini, J., Baldan, B., Mensuali Sodi, A., & Soldatini, G. F. (2003). Early production and scavenging of hydrogen peroxide in the apoplast of sunflower plants exposed to ozone. *Journal of Experimental Botany*, 54(392), 2529-2540. <https://doi.org/10.1093/jxb/erg270>

Robert Verpoorte, & A. W. Alfermann. (2000). *Metabolic Engineering of Plant Secondary Metabolism* (R. Verpoorte & A. W. Alfermann, Eds.). Springer Netherlands. <https://doi.org/10.1007/978-94-015-9423-3>.

Samuelsson, G. (2004) Drugs of natural origin: a textbook of pharmacognosy, 5th Swedish Pharmaceutical Press.

Scebba, F., Sebastiani, L., & Vitagliano, C. (1998). Changes in activity of antioxidative enzymes in wheat (*Triticum aestivum*) seedlings under cold acclimation. *Physiologia Plantarum*, 104(4), 747-752. <https://doi.org/10.1034/j.1399-3054.1998.1040433.x>.

Tan, X. M., Lin, C., & Fugetsu, B. (2009). Studies on toxicity of multi-walled carbon nanotubes on suspension rice cells. *Carbon*, 47(15), 3479-3487. <https://doi.org/10.1016/j.carbon.2009.08.018>.

VI, S. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology*, 299, 152-178. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(99\)99017-1](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(99)99017-1).

Xu, Z., & Deng, M. (2017). Identification and Control of Common Weeds: Volume 2 (Vol. 2). Springer.

Zhang, J., Zhou, M., Zhou, H., Zhao, D., Gotor, C., Romero, L. C., et al. (2021). Hydrogen sulfide, a signaling molecule in plant stress responses. *J. Integr. Plant Biol.* 63, 146-160. <https://doi.org/10.1111/jipb.13022>.

Modulatory Effect of *Ulva fasciata* L. Green Algal Extract on Physiological and Biochemical Responses of *Triticum aestivum* under Lead Heavy Metal Stress

Pages
25-43

S. Azadi¹, S. M. Seyyednejad^{2*}, A. Ghafarizadeh³ and A. Gilani⁴

1, 2 & 3) Department of Biology, Faculty of Science, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Khuzestan, Iran.

4) Seed and Plant Improvement Research Department, Kuzestan Agricultural and Natural Resources Research Center, AREEO, Ahvaz, Iran.

Corresponding author: sm.seyyednejad@gmail.com

Received date: 2025.10.04

Accepted date: 2026.01.10

Abstract

Soil contamination with heavy metals, particularly lead, represents a significant environmental challenge that reduces plant growth and performance by inducing oxidative stress and disrupting physiological processes. The present study aimed to investigate the effects of different concentrations (0, 2.5, 5, 7.5, and 10% v/v) of the green seaweed *Ulva fasciata* L. extract as a natural biostimulant on selected physiological and biochemical traits of *Triticum aestivum* under lead stress (0, 15, 45, and 75 ppm). The experiment was conducted as a factorial arrangement in a completely randomized design with three replications. The obtained data were subjected to statistical analysis using SAS software, and mean comparisons were performed using Duncan's multiple range test at a significance level of $P < 0.01$. Treatment with lead nitrate resulted in decreased leaf area, photosynthetic pigment content, and total protein, along with increased levels of malondialdehyde (MDA), proline, and soluble carbohydrates, indicating the occurrence of oxidative stress. In contrast, application of the seaweed extract, particularly at 10% concentration, mitigated the adverse effects of lead and enhanced photosynthetic pigments, total protein, and the activities of antioxidant enzymes, including catalase, peroxidase, and ascorbate peroxidase. These findings suggest that the bioactive compounds in the seaweed extract play a crucial role in enhancing plant tolerance to heavy metal stress through stimulation of the antioxidant system and improvement of photosynthetic processes. Accordingly, *U. fasciata* extract can be utilized as an environmentally friendly biostimulant to improve growth and resistance of crop plants in heavy metal-contaminated soils.

Keywords: Antioxidant enzymes, Proline, Malondialdehyde (MDA) and Biostimulant.

اثر تعدیلی عصاره جلبک سبز *Ulva fasciata* L. بر پاسخ‌های فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی گندم در مواجهه با تنش فلز سنگین سرب

شماره صفحات

۲۵-۴۳

سمیرا آزادی^۱، سیدمنصور سیدنژاد^{۲*}، آذین غفاری‌زاده^۳ و عبدالعلی گیلانی^۴

۱، ۲ و ۳) گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه شهیدچمران اهواز، اهواز، خوزستان، ایران.
۴) بخش اصلاح و تهیه بذر، مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان خوزستان، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، اهواز، ایران.

* نویسنده مسئول: sm.seyyednejad@gmail.com

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۱۰/۲۰

تاریخ دریافت: ۱۴۰۴/۰۷/۱۲

چکیده

آلودگی خاک با فلزات سنگین، به‌ویژه سرب، از چالش‌های مهم زیست‌محیطی است که با ایجاد تنش اکسیداتیو و اختلال در فرآیندهای فیزیولوژیکی، رشد و عملکرد گیاهان را کاهش می‌دهد. پژوهش حاضر با هدف بررسی اثر غلظت‌های مختلف (صفر، ۲/۵، ۷/۵ و ۱۰ درصد حجمی/حجمی) عصاره جلبک سبز *Ulva fasciata* L. به عنوان یک محرک زیستی طبیعی بر برخی ویژگی‌های فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی گیاه *Triticum aestivum* تحت تنش سرب (صفر، ۱۵، ۴۵ و ۷۵ ppm) انجام شد. آزمایش به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار اجرا گردید. داده‌ها با نرم‌افزار SAS تجزیه و تحلیل آماری شدند و مقایسه میانگین‌ها با آزمون چنددامنه دانکن در سطح احتمال ۰/۰۱ $P <$ انجام گرفت. تیمار گیاهان با نیترات سرب موجب کاهش سطح برگ، محتوای رنگدانه‌های فتوسنتزی و پروتئین کل و افزایش میزان مالون‌دی‌آلدئید (MDA)، پرولین و کربوهیدرات‌های محلول گردید که بیانگر بروز تنش اکسیداتیو بود. در مقابل، کاربرد عصاره جلبک به‌ویژه در غلظت ۱۰ درصد، اثرات منفی سرب را تعدیل نموده و موجب افزایش رنگدانه‌های فتوسنتزی، پروتئین کل و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی شامل کاتالاز، پراکسیداز و آسکوربات پراکسیداز گردید. به نظر می‌رسد ترکیبات زیست‌فعال عصاره جلبک از طریق تحریک سامانه آنتی‌اکسیدانی و بهبود فرآیندهای فتوسنتزی، نقش مؤثری در افزایش تحمل گیاه به تنش فلزات سنگین دارند. بر این اساس، عصاره جلبک *U. fasciata* می‌تواند به عنوان محرک زیستی سازگار با محیط زیست در بهبود رشد و مقاومت گیاهان زراعی در خاک‌های آلوده به فلزات سنگین مورد استفاده قرار گیرد.

واژه‌های کلیدی:

واژه‌های کلیدی: آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی، پرولین، مالون‌دی‌آلدئید (MDA) و محرک زیستی.

مقدمه

آلودگی خاک‌ها با فلزات سنگین، به ویژه سرب، یکی از مشکلات زیست‌محیطی مهم است که عمدتاً ناشی از فعالیت‌های انسانی و صنعتی می‌باشد (Zwolaket *et al.*, 2019). طبق گزارش آژانس حفاظت محیط زیست، سرب به عنوان یکی از مهم‌ترین فلزات سنگین آلاینده محیط به شمار می‌رود (Wieczoreket *et al.*, 2018). سمیت سرب در گیاهان به صورت زردی و قهوه‌ای شدن برگ‌ها و کاهش رشد ریشه نمود پیدا می‌کند (Hadi and Aziz, 2015; Zulfiqaret *et al.*, 2019). حتی در غلظت‌های پایین، سرب می‌تواند تعادل آب سلول‌های گیاهی را مختل نموده، تولید گونه‌های اکسیژن فعال (ROS) را افزایش دهد و در نتیجه موجب تنش اکسیداتیو گردد. این تنش به آسیب غشاها و DNA، تغییر در ساختار فیزیولوژیکی سلول، تخریب و مهار فعالیت آنزیم‌ها و نهایتاً مرگ سلولی منجر می‌شود (Kumar and Prasad, 2018; Zulfiqaret *et al.*, 2019; Navabpouret *et al.*, 2020). مطالعات متعدد نشان داده‌اند که گیاهان در معرض سرب کاهش قابل توجهی در میزان فتوسنتز دارند. این کاهش ناشی از تخریب کلروپلاست‌ها، مهار سنتز کلروفیل، پلاستوکوئینون و کاروتنوئیدها، ممانعت از انتقال الکترون و کاهش فعالیت آنزیم‌های چرخه کالوین است. در واقع، سرب با ایجاد اختلال در جذب فلزات ضروری مانند منیزیم و آهن، سنتز کلروفیل را محدود می‌کند (Zulfiqaret *et al.*, 2019; Aslamet *et al.*, 2021). افزایش تخریب کلروفیل در گیاهان تحت تیمار سرب به دلیل افزایش فعالیت کلروفیل‌از بوده و نشان داده شده است که کلروفیل *b* نسبت به کلروفیل *a* بیشتر تحت تأثیر قرار می‌گیرد (Nas and Ali, 2018; Guptaet *et al.*, 2024). همچنین محققان بسیاری گزارش نمودند، سمیت فلز سنگین سرب باعث کاهش درصد جوانه‌زنی، شاخص جوانه‌زنی، شاخص تحمل، طول گیاه و توده خشک گیاه می‌شود (Yanget *et al.*, 2010; Kanwal *et al.*, 2020; Osman and Fadhlallah, 2023). در سال‌های اخیر، استفاده از عصاره جلبک‌های دریایی به دلیل پتانسیل بالای آن‌ها در کشاورزی ارگانیک و پایدار، توجه زیادی را به خود جلب کرده است (Ghafarizadeh *et al.*, 2017; Arioli *et al.*, 2024). این عصاره‌ها حاوی عناصر ماکرو و میکرو، ویتامین‌ها، هورمون‌های رشد و تنظیم‌کننده‌های گیاهی از جمله جیبرلین، سیتوکینین و اکسین (Karkhane *et al.*, 2020)، آمینواسیدها و پلی‌ساکاریدها (Shahzamani *et al.*, 2022) و بتائین‌ها (Margal *et al.*, 2023) هستند. برخلاف کودهای شیمیایی، عصاره جلبک‌های دریایی غیرسمی بوده، منجر به تخریب محیط زیست ایجاد نمی‌شوند و آلودگی خطرناک برای انسان و سایر موجودات به همراه ندارند (Ghafarizadeh *et al.*, 2017). اثرات مثبت عصاره جلبک‌های دریایی بر محصولات کشاورزی در غلظت‌های مختلف به اثبات رسیده است، به طوری که در صورت تأمین مقادیر مناسب مواد مغذی، موجب توسعه سیستم‌های ریشه‌ای و ارتقای مراحل مختلف فاز زایشی گیاه می‌شود (Ghafarizadeh *et al.*, 2015; Mattner *et al.*, 2018). مطالعات مختلف نشان داده‌اند که محلول‌پاشی عصاره جلبک‌های دریایی، رشد و عملکرد گیاهان مختلف از جمله گندم (*Triticumaestivum*) (Ghafarizadeh *et al.*, 2016)، گوجه فرنگی (*Solanum lycopersicum*) و فلفل شیرین (*Capsicum annum*) (Ali

et al., 2019)، توت فرنگی (*Fragaria × ananassa*) (Alam et al., 2013)، کلزای زمستانه (*Brassica napus*) (Jannin et al., 2013) و کاج (*Pinus contorta*) (MacDonald et al., 2012) را بهبود می‌بخشند. یکی دیگر از مزایای جلبک‌ها تولید زیست‌توده بالا است که می‌تواند به کاهش تنش‌های محیطی، از جمله آلودگی با فلزات سنگین، کمک کند (Amrutha et al., 2025). تحقیقات نشان داده‌اند که عصاره جلبک دریایی به دلیل حضور گلایسین بتائین، تحمل گیاهان نسبت به تنش‌های محیطی را افزایش داده و با حفظ تعادل اسمزی سلول‌های گیاهی و محافظت از غشای ریشه، اثرات مخرب تنش‌ها را کاهش می‌دهد (Kumaret al., 2024). علاوه بر این، پلی‌ساکاریدهای سولفات و الیگوساکاریدهای کم‌وزن مولکولی موجود در جلبک‌های دریایی فعالیت‌های بیولوژیکی متنوعی از جمله فعالیت آنتی‌اکسیدانی دارند و قادرند پاسخ‌های دفاعی گیاه را القا کنند (Ghafarizadeh and Niroomand, 2021). لامینارین موجود در عصاره جلبک دریایی نیز تولید ترکیبات ضدقارچی (فیتوالکسین) و آنزیم‌های هیدرولیزکننده مانند کیتیناز و گلوکاناز را تحریک می‌کند و به این ترتیب سیستم دفاعی گیاهان را تقویت می‌نماید (Shukla et al., 2021). با وجود مطالعات متعدد در زمینه اثرات عصاره جلبک‌ها و سمیت سرب، اطلاعات محدودی درباره تأثیر عصاره جلبک سبز *Ulva fasciata* بر ویژگی‌های فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی گندم تحت تنش سرب موجود است. همچنین، اثرات دقیق عصاره جلبک بر شاخص‌های آنتی‌اکسیدانی و مولکول‌های سیگنال‌دهنده استرس در گیاهان تحت این تنش تاکنون به‌طور جامع مورد بررسی قرار نگرفته است. بر این اساس، هدف از مطالعه حاضر بررسی اثر غلظت‌های مختلف عصاره جلبک سبز *U. fasciata* بر ویژگی‌های فیزیولوژیکی و رشد گندم، شامل میزان رنگدانه‌های فتوسنتزی، پروتئین و کربوهیدرات محلول کل، مالون‌دی‌آلدئید، پرولین و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی مانند کاتالاز، پراکسیداز و آسکوربات پراکسیداز تحت تنش فلز سنگین سرب می‌باشد.

مواد و روش‌ها

پژوهش حاضر در سال زراعی ۱۳۹۶-۱۳۹۵ در ایستگاه تحقیقات شاور و وابسته به مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان خوزستان (31° 50' N و 48° 28' E) که در ارتفاع ۳۳ متری از سطح دریا واقع است، اجرا گردید. در این تحقیق از جلبک سبز *Ulva fasciata* L. از شاخه‌ی Chlorophyta، رده‌ی Ulvophyceae، راسته‌ی Ulvales، تیره‌ی Ulvaceae، جمع‌آوری شده از منطقه ساحلی چابهار (25° 17' N و 60° 37' E) استفاده گردید. شناسایی گونه جلبکی توسط مرکز تحقیقات چابهار انجام شد. جلبک مورد استفاده به منظور رفع تمامی ناخالصی‌ها با آب دریا و آب شیرین شست‌وشو داده شد، سپس به مدت ۱۰ روز در هوای آزاد خشک گردید و به شکل پودر یکنواخت در آمد. برای تهیه عصاره جلبکی ۵۰ گرم پودر جلبک با ۵۰۰ میلی لیتر آب مقطر به مدت ۶۰ دقیقه جوشانده شد و پس از عبور از صافی عصاره حاصل به عنوان ۱۰۰ درصد در نظر گرفته شد (Ghafarizadeh et al., 2017). سطوح عامل اول شامل درصدهای صفر، ۲/۵، ۷/۵ و ۱۰ با افزودن آب مقطر تهیه شد. عامل دوم نیترات سرب ۴ سطح شامل صفر، ۱۵، ۴۵ و ۷۵ میلی گرم در لیتر بود. آزمایش با دو

عامل عصاره جلبک دریایی و نیترات سرب به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی در ۳ تکرار انجام شد. واحدهای آزمایش شامل گلدان‌هایی به قطر ۳۰ سانتی‌متر با گنجایش ۲۰ کیلوگرم خاک بودند. در هر گلدان به طور متوسط ۲۵ عدد بذر گندم رقم چمران کاشته شد. گلدان‌ها در محیط باز قرار داشتند، منافذی در کف گلدان‌ها به منظور زهکش خاک تعبیه شد. اطلاعات خاک شامل pH ۷/۱ و $EC = ۷/۳$ بود. عصاره جلبکی مورد استفاده به صورت افشانه برگی و نیترات سرب به صورت محلول در آب به خاک گلدان‌ها در مرحله پنجه‌زنی اعمال شد. آبیاری برحسب نیاز و طبق عرف منطقه در طول دوره رشد اعمال گردید. نمونه‌گیری در مرحله گیاهچه ای (در حالت چهار برگ برگی گیاه) انجام شد. جهت سنجش سطح برگ از دستگاه سطح برگ سنج (Leaf area meter) مدل WinDIAS استفاده گردید و نتایج برحسب میلی‌متر مربع گزارش شد.

سنجش میزان رنگدانه‌های فتوسنتزی

استخراج رنگدانه‌های کلروفیل a ، کلروفیل b ، کلروفیل کل و کاروتنوئید بر اساس روش Lichtenthaler (1987) و با استفاده از حلال استون ۸۰ درصد انجام شد. جذب نمونه‌ها با دستگاه اسپکتروفتومتر UV- VIS WPA (biowave) biochrom ساخت انگلستان خوانده شد و نتایج با استفاده از روابط ۱، ۲، ۳ و ۴ محاسبه و بر حسب میلی‌گرم بر گرم وزن تر بافت گیاهی گزارش گردید.

$$\text{Chl}_a \text{ (mg/g)} = (12.25 A_{663} - 2.79 A_{646}) (v) / 1000 W \quad \text{رابطه ۱:}$$

$$\text{Chl}_b \text{ (mg/g)} = (21.50 A_{646} - 5.10 A_{663}) (v) / 1000 W \quad \text{رابطه ۲:}$$

$$\text{Chl}_{\text{Total}} \text{ (mg/g)} = \text{Chl}_a + \text{Chl}_b \quad \text{رابطه ۳:}$$

$$\text{Car (mg/g)} = ((1000 A_{470} - 1.82 \text{Chl}_a - 85.02 \text{Chl}_b) / 198) (v) / 1000 W \quad \text{رابطه ۴:}$$

سنجش محتوی کربوهیدرات محلول

میزان کربوهیدرات محلول بر اساس فنل-اسیدسولفوریک (DuBois et al., 1956) و با استفاده از حلال اتانول ۸۰ درصد سنجش شد. جذب نمونه‌ها در طول موج ۴۸۵ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر UV- VIS WPA (biowave) biochrom خوانده شد و از گلوکز خالص جهت رسم منحنی استاندارد استفاده گردید. نتایج برحسب میلی‌گرم در گرم وزن خشک نمونه بافت گیاهی گزارش شد.

سنجش میزان پروتئین‌های کل

میزان پروتئین به روش لوری اصلاح شده (Lowry et al., 1951) و با استفاده از پروتئین آلبومین گاوی (استاندارد) سنجیده و جذب نمونه‌ها در طول موج ۶۶۰ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر مذکور خوانده شد. نتایج بر حسب میلی‌گرم بر گرم وزن تر بافت گیاهی گزارش گردید.

سنجش میزان پرولین

پرولین بر اساس روش Bates et al., 1973 و با استفاده از اسید سولفوسالسیلیک ۳ درصد استخراج و سنجش شد. جذب نمونه‌ها در ۵۲۰ نانومتر با استفاده از اسپکتروفتومتر خوانده شد و نتایج بر حسب میلی‌مول بر گرم وزن تر بافت گیاهی گزارش شد.

سنجش میزان مالون دی آلدئید (MAD)

میزان مالون دی آلدئید با استفاده از محلول ۰/۵ درصد تیوباربیتوریک اسید حاوی تری کلرواستیک اسید ۲۰ درصد سنجش شد. جذب نمونه‌ها در طول موج‌های ۵۳۲ و ۶۰۰ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر خوانده شد. سپس با ضریب خاموشی $1 \text{ cm}^{-1} \text{ mM}^{-1}$ مقدار مالون دی آلدئید بر حسب میلی‌مول بر گرم وزن تر بافت گیاهی محاسبه و نتایج گزارش گردید (Davey et al., 2005).

سنجش میزان آنزیم‌های آنتی اکسیدانی

آنزیم کاتالاز بر اساس روش (Aebi, 1984)، آسکوربات پراکسیداز (Chen and Asada, 1989)، پراکسیداز (Hoyle, 1972) و سپس فعالیت آنزیم بر حسب تغییرات واحد جذب در دقیقه به ازای هر میلی‌گرم پروتئین محاسبه و به واحد آنزیم بر میلی‌گرم پروتئین گزارش گردید. نتایج به دست آمده با استفاده از نرم افزار SAS 9.2 مورد تجزیه آماری قرار گرفت. میانگین‌ها نیز با استفاده از آزمون چند دامنه دانکن در سطح احتمال $P < 0.01$ محاسبه شد و نمودارها به کمک نرم افزار Excel رسم گردید.

نتایج و بحث

اثر متقابل عصاره جلبک سبز *U. fasciata* و نیترات سرب بر سطح برگ، رنگدانه‌های فتوسنتزی و پروتئین

کل

با توجه به نتایج حاصل از آنالیز واریانس، بین میزان کلروفیل *a* و *b*، کل و کارتنوئید و پروتئین کل در سطوح عصاره

جلبک *U. fasciata*، نیترات سرب و اثر متقابل دو عامل در سطح یک درصد تفاوت معنی‌داری مشاهده شد (جدول ۱).

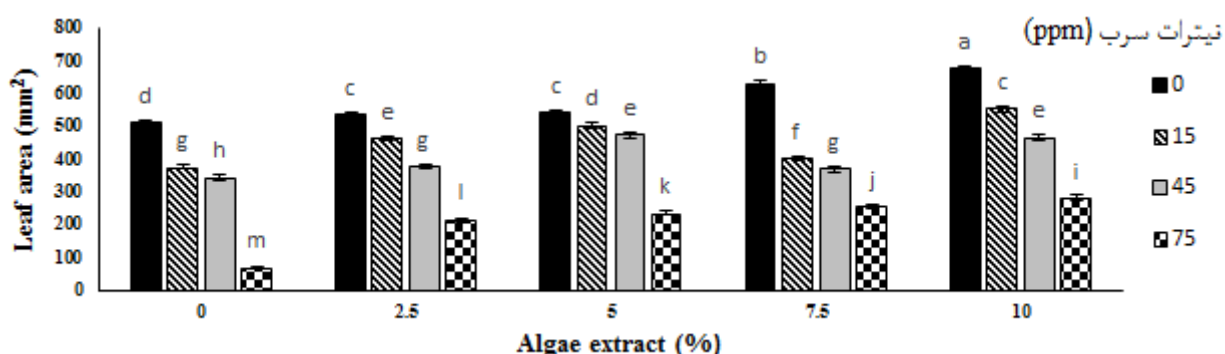
جدول ۱- نتایج آنالیز واریانس مربوط به کلروفیل *a* و *b*، کل و کارتنوئید و پروتئین کل در برگ‌های گیاهچه گندم

Table 1- The analysis of variance for chlorophyll *a*, chlorophyll *b*, total chlorophyll, carotenoids and total proteins in the leaves of wheat seedlings

total proteins in the leaves of wheat seedlings							
میانگین مربعات						درجه آزادی	منابع تغییرات
پروتئین	کارتنوئید	کلروفیل کل	کلروفیل <i>b</i>	کلروفیل <i>a</i>	سطح برگ		
۴۷۸/۰۸۳**	۵/۰۷۹**	۵/۴۹۲**	۲/۷۷۴**	۰/۵۲۴**	۴۵۸۱۶/۷۹۵**	۴	غلظت کود جلبکی (A)
۱۶۵/۳۳۱**	۵/۶۶۲**	۱۳/۱۱۷**	۸/۴۵۵**	۰/۵۲۷**	۳۵۴۷۹۱/۷۴۰**	۳	نیترات سرب (B)
۳/۰۹۹**	۱/۳۹۹**	۰/۲۱۶**	۰/۲۹۵**	۰/۱۰۰**	۵۴۱۰/۶۹۳**	۱۲	اثر متقابل A و B
۰/۹۹۷	۰/۹۹۸	۰/۹۹۳	۰/۹۹۱	۰/۹۹۲	۰/۹۹۶	۴۰	خطا
۳/۰۴۲	۳/۶۲۵	۴/۷۱۶	۶/۹۲۱	۳/۷۲۶	۲/۴۶۰		(%) C.v

* و ** به ترتیب معنی دار در سطح احتمال $P < 0.05$ و $P < 0.01$ ns به منزله عدم وجود اختلاف معنی دار می‌باشد.

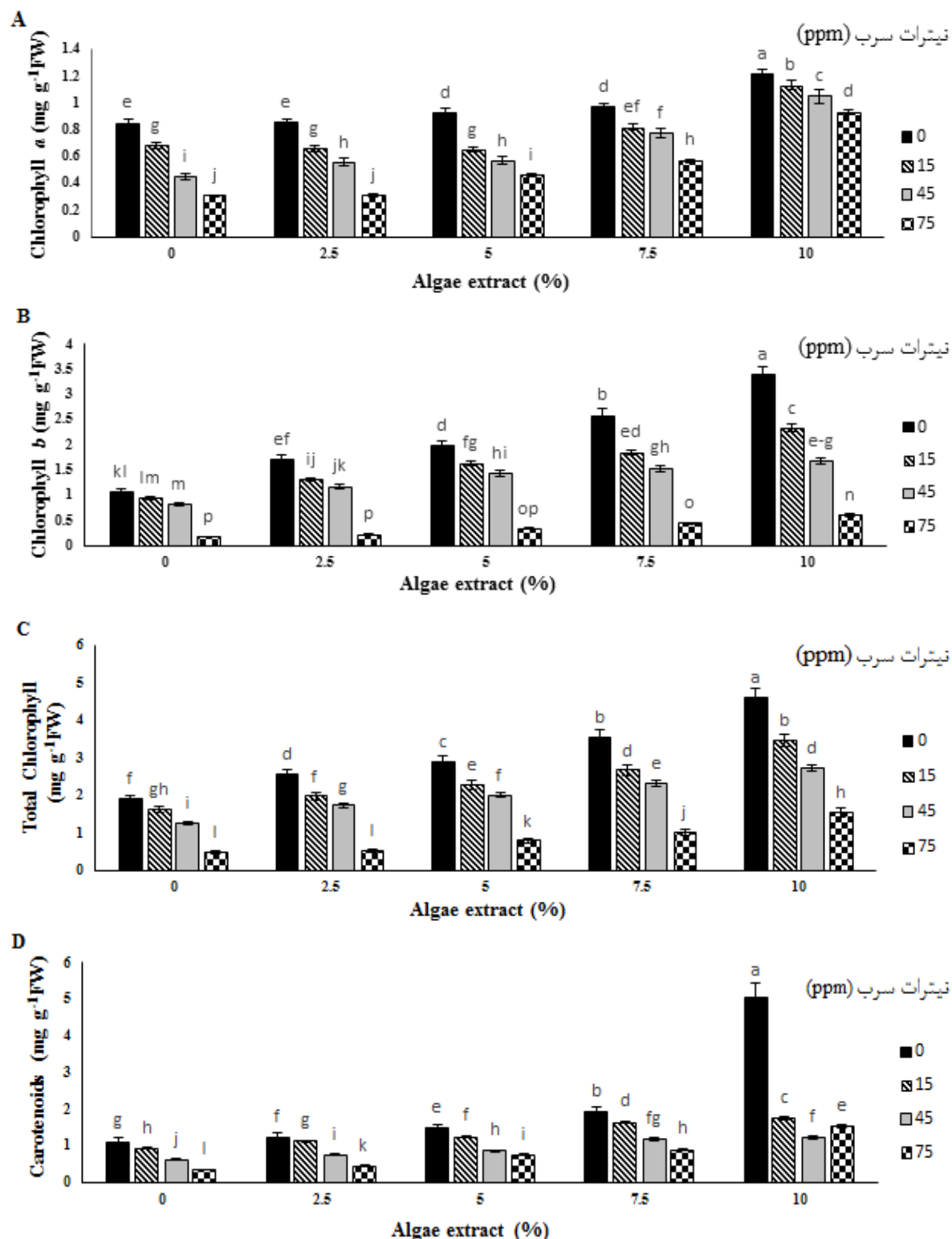
بر اساس مقایسه میانگین‌ها کاربرد عصاره جلبک سبز *U. fasciata* موجب افزایش سطح برگ نسبت به تیمار شاهد (۳۲۶/۴۰ میلی مترمربع) شد، بطوری‌که بیشترین سطح برگ مربوط به تیمار ۱۰ درصد (۴۹۵/۹۵ میلی مترمربع) و کمترین آن مربوط به تیمار ۲/۵ درصد عصاره جلبک سبز (۴۰۰/۳۷ میلی مترمربع) بود. اعمال نیترات سرب منجر به کاهش معنادار میزان سطح برگ در تمامی تیمارها شد. کمترین میزان سطح برگ مربوط به تیمار ۲/۵ درصد عصاره جلبکی به همراه ۷۵ppm نیترات سرب (۲۱۶/۱۹ میلی مترمربع) بود (شکل ۱).



شکل ۱- نمودار مقایسه میانگین اثر متقابل سطوح مختلف عصاره جلبک سبز *U. fasciata* و نیترات سرب روی تغییرات میزان سطح برگ گیاهچه گندم. نمودارهای دارای حروف یکسان اختلاف معنی‌داری از لحاظ آماری ندارند ($P < 0.05$).

Figure 1- Comparison of the mean interaction effects of different levels of *U. fasciata* green algal extract and lead nitrate on leaf area of wheat seedlings. Columns with the same letter do not have a significant difference ($P < 0.05$).

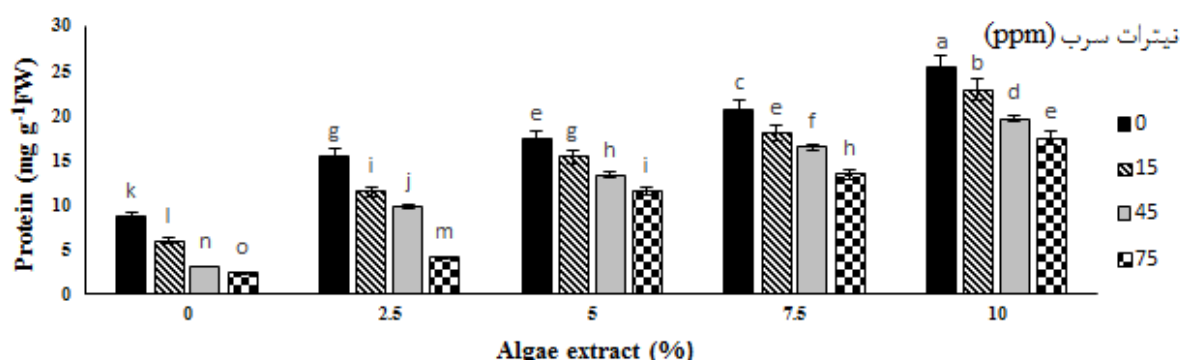
با توجه به شکل ۲، کاربرد عصاره جلبک سبز *U. fasciata* موجب افزایش رنگدانه‌های فتوسنتزی نسبت به تیمار شاهد گردید. بیشترین محتوای کلروفیل *a* (۱۰۸۱/۰ میلی گرم بر گرم وزن تر بافت گیاهی)، کلروفیل *b* (۲۰۰۷/۰ میلی گرم بر گرم وزن تر بافت گیاهی)، کلروفیل کل (۳۰۸۹/۰ میلی گرم بر گرم وزن تر بافت گیاهی) و کاروتنوئید (۲۳۸۳/۰ میلی گرم بر گرم وزن تر بافت گیاهی) در تیمار ۱۰ درصد مشاهده شد. بر اساس مقایسه میانگین سطوح مختلف عصاره جلبکی و نیترات سرب کمترین میزان کلروفیل *a* (۳۱۱/۰ میلی گرم بر گرم وزن تر بافت گیاهی)، کلروفیل *b* (۲۱۹/۰ میلی گرم بر گرم وزن تر بافت گیاهی)، کلروفیل کل (۵۳۰/۰ میلی گرم بر گرم وزن تر بافت گیاهی) و کاروتنوئید (۴۴۹/۰ میلی گرم بر گرم وزن تر بافت گیاهی) مربوط به تیمار ۲/۵ درصد عصاره جلبکی به همراه ۷۵ppm نیترات سرب بود. در مجموع، نتایج نشان داد که کاربرد عصاره جلبکی به صورت محلول پاشی موجب کاهش شدت اثرات بازدارنده نیترات سرب بر سنتز رنگدانه‌های فتوسنتزی گردید، به گونه‌ای که مقادیر حاصل در تیمارهای حاوی عصاره جلبکی نسبت به نمونه‌های تحت تنش فلز سنگین سرب، در سطح بالاتری حفظ شدند (شکل D-۲A).



شکل ۲- نمودار مقایسه میانگین اثر متقابل سطوح مختلف عصاره جلبک سبز *U. fasciata* و نیترات سرب روی تغییرات میزان کلروفیل *a* (A)، کلروفیل *b* (B)، کلروفیل کل (C) و کاروتنوئید (D) برگ‌های گیاهچه‌گندم. نمودارهای دارای حروف یکسان اختلاف معنی‌داری از لحاظ آماری ندارند ($P < 0.05$).

Figure 2- Comparison of the mean interaction effects of different levels of *U. fasciata* green algal extract and lead nitrate on chlorophyll *a* (A), chlorophyll *b* (B), Total chlorophyll (C) and carotenoids (D) content in the leaves of wheat seedlings. Columns with the same letter do not have a significant difference ($P < 0.05$).

با توجه به شکل ۳، استفاده از عصاره جلبک سبز *U. fasciata* به صورت افشانه برگی موجب افزایش محتوای پروتئین کل نسبت به تیمار شاهد (۵/۱۰۷ میلی گرم بر گرم وزن تر بافت گیاهی) گردید. بیشترین محتوای پروتئین کل (۲۵/۵۳ میلی گرم بر گرم وزن تر بافت گیاهی) در تیمار ۱۰ درصد مشاهده شد. اعمال نیترات سرب منجر به کاهش معنادار میزان پروتئین کل در تمامی نمونه‌ها نسبت به تیمار شاهد شد. بر اساس مقایسه میانگین سطوح مختلف عصاره جلبکی و نیترات سرب کمترین میزان پروتئین کل (۴/۱۵ میلی گرم بر گرم وزن تر بافت گیاهی) مربوط به تیمار ۲/۵ درصد عصاره جلبکی به همراه ۷۵ppm نیترات سرب بود. نتایج نشان دهنده اثرات تعدیل کننده عصاره جلبکی در تنش فلز سنگین سرب بر سنتز پروتئین بود (شکل ۳).



شکل ۳- نمودار مقایسه میانگین اثر متقابل سطوح مختلف عصاره جلبک سبز *U. fasciata* و نیترات سرب روی تغییرات میزان پروتئین برگ‌های گیاهچه گندم. نمودارهای دارای حروف یکسان اختلاف معنی‌داری از لحاظ آماری ندارند ($P < 0.05$).

Figure 3- Comparison of the mean interaction effects of different levels of *U. fasciata* green algal extract and lead nitrate on protein content in the leaves of wheat seedlings. Columns with the same letter do not have a significant difference ($P < 0.05$).

اثر متقابل عصاره جلبک سبز *U. fasciata* و نیترات سرب بر کربوهیدرات محلول کل، پرولین، مالون‌دی‌آلدئید

و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی

با توجه به نتایج حاصل از آنالیز واریانس، بین میزان کربوهیدرات محلول کل، پرولین، مالون‌دی‌آلدئید و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی در سطوح عصاره جلبک *U. fasciata*، و نیترات سرب و اثر متقابل دو عامل در سطح یک درصد تفاوت معنی‌داری مشاهده شد (جدول ۲). کاربرد عصاره جلبک سبز *U. fasciata* موجب کاهش میزان کربوهیدرات محلول کل، پرولین و مالون‌دی‌آلدئید نسبت به تیمار شاهد (به ترتیب ۵۵/۸۴ میلی گرم بر وزن خشک بافت گیاهی، ۳۰/۲۱ میلی مول بر گرم وزن تر بافت گیاهی و ۱۵/۱۴ میلی مول بر گرم وزن تر بافت گیاهی) گردید، به طوری که کمترین میزان کربوهیدرات محلول کل (۳۴/۴۶ میلی گرم بر وزن خشک بافت گیاهی)، پرولین (۱۰/۶۵ میلی مول بر گرم وزن تر بافت گیاهی) و مالون‌دی‌آلدئید (۸/۰۴ میلی مول بر گرم وزن تر بافت گیاهی) در تیمار ۱۰ درصد عصاره جلبکی بدست آمد. تنش فلز سنگین سرب در غلظت ۷۵ppm بیشترین میزان کربوهیدرات محلول کل (۵۵/۹۷ میلی گرم بر وزن خشک بافت گیاهی)، پرولین (۳۳/۸۲

میلی مول بر گرم وزن تر بافت گیاهی) و مالون دی آلدئید (۲۰/۳۹ میلی مول بر گرم وزن تر بافت گیاهی) را نسبت به شاهد نشان داد.

جدول ۲- نتایج آنالیز واریانس مربوط به کربوهیدرات محلول کل، پرولین، مالون دی آلدئید، آنزیم های کاتالاز، پراکسیداز و آسکوربات- پراکسیداز در برگ های گیاهچه گندم

Table 2: The analysis of variance for total soluble carbohydrates, proline, malondialdehyde, catalase, peroxidase and ascorbate peroxidase enzymes in the leaves of wheat seedlings

میانگین مربعات						درجه آزادی	منابع تغییرات
آسکوربات پراکسیداز	پراکسیداز	کاتالاز	مالون دی آلدئید	پرولین	کربوهیدرات		
۰/۱۲۳**	۲۲/۶۸۵**	۰/۳۹۶**	۱۰۱/۳۴۲**	۶۹۴/۶۳۷**	۹۰۳/۸۱۱**	۴	غلظت کود جلبکی (A)
۰/۳۳۳**	۷۶/۸۹۷**	۰/۳۱۳**	۱۵۷/۲۱۴**	۲۵۲۶/۲۰۰**	۱۸۵۲/۴۳۷**	۳	نیترات سرب (B)
۰/۰۰۱**	۰/۸۱۳**	۰/۰۶۳**	۳/۶۰۵**	۱۴۰/۸۳۴**	۲۱/۹۶۵**	۱۲	اثر متقابل A و B
۰/۹۸۱	۰/۹۷۷	۰/۹۹۲	۰/۹۸۴	۰/۹۹۸	۰/۹۹۲	۴۰	خطا
۴/۴۸۱	۷/۲۲۳	۸/۳۷۲	۴/۸۲۶	۳/۲۹۰	۲/۸۸۰		C.V (%)

* و ** به ترتیب معنی دار در سطح احتمال ۰/۰۵ و ۰/۰۱ P <

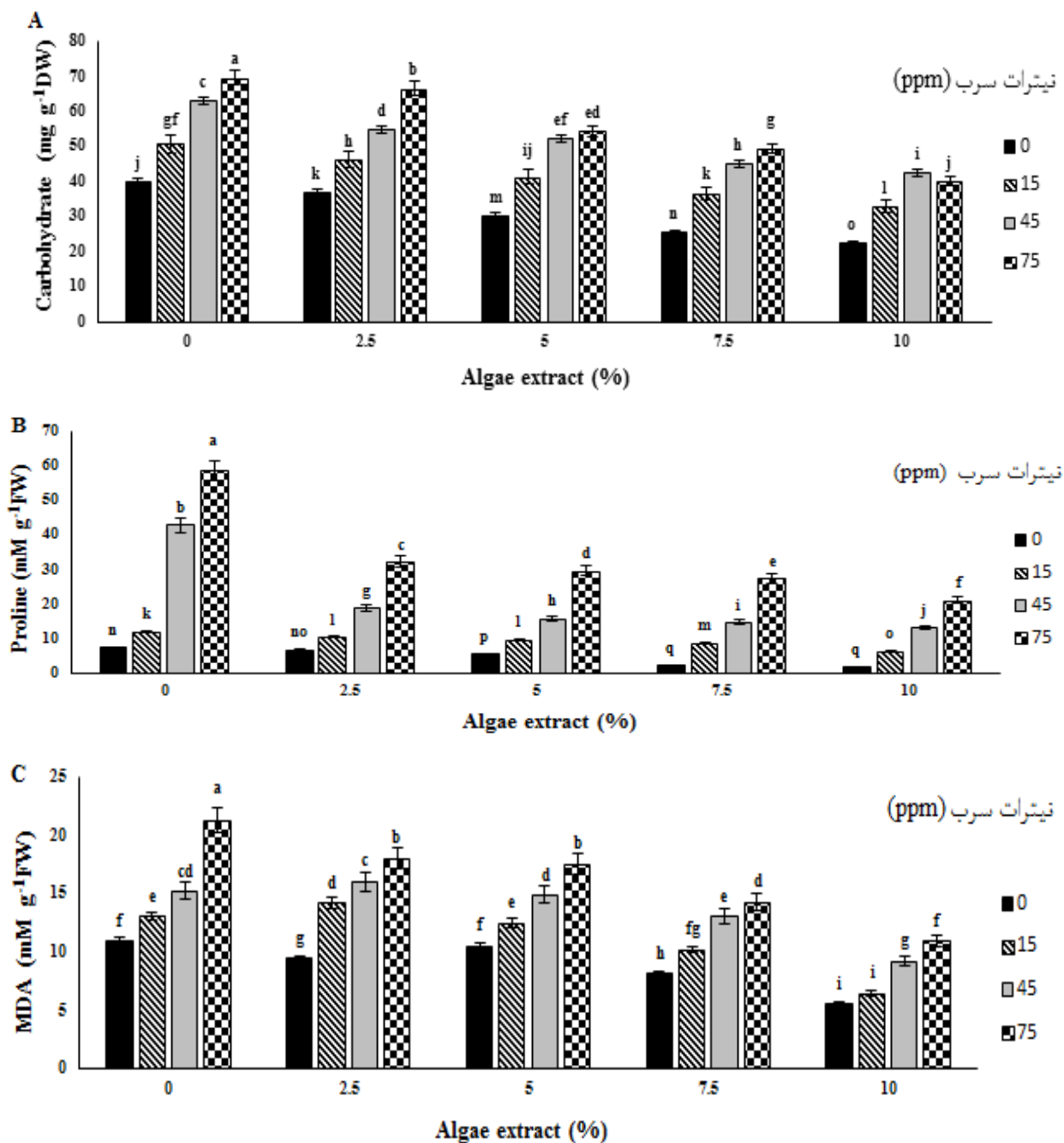
NS به منزله عدم وجود اختلاف معنی دار می باشد.

مقایسه میانگین سطوح مختلف عصاره جلبکی و نیترات سرب بیشترین میزان کربوهیدرات محلول کل (۳۴/۴۶ میلی گرم بر وزن خشک بافت گیاهی)، پرولین (۱۰/۶۵ میلی مول بر گرم وزن تر بافت گیاهی) و مالون دی آلدئید (۸/۰۴ میلی مول بر گرم وزن تر بافت گیاهی) را در تیمار ۲/۵ درصد عصاره جلبکی به همراه ۷۵ppm نیترات سرب نشان داد (شکل ۴A-C).

باتوجه به شکل ۵، کاربرد عصاره جلبک سبز *U. fasciata* روند متفاوتی در میزان فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدانی نسبت به تیمار شاهد نشان داد. با افزایش غلظت فلز سنگین سرب، فعالیت آنزیم های پراکسیداز و آسکوربات پراکسیداز در تمامی تیمارها افزایش یافت. بر اساس مقایسه میانگین سطوح مختلف عصاره جلبکی و نیترات سرب بیشترین میزان فعالیت آنزیم های کاتالاز (۰/۷۳۳) واحد آنزیم بر میلی گرم پروتئین، پراکسیداز (۱۰/۲۴) واحد آنزیم بر میلی گرم پروتئین و آسکوربات پراکسیداز (۰/۷۷۵) واحد آنزیم بر میلی گرم پروتئین در تیمار ۵ درصد عصاره جلبکی به همراه ۷۵ppm نیترات سرب مشاهده شد (شکل ۴A-C).

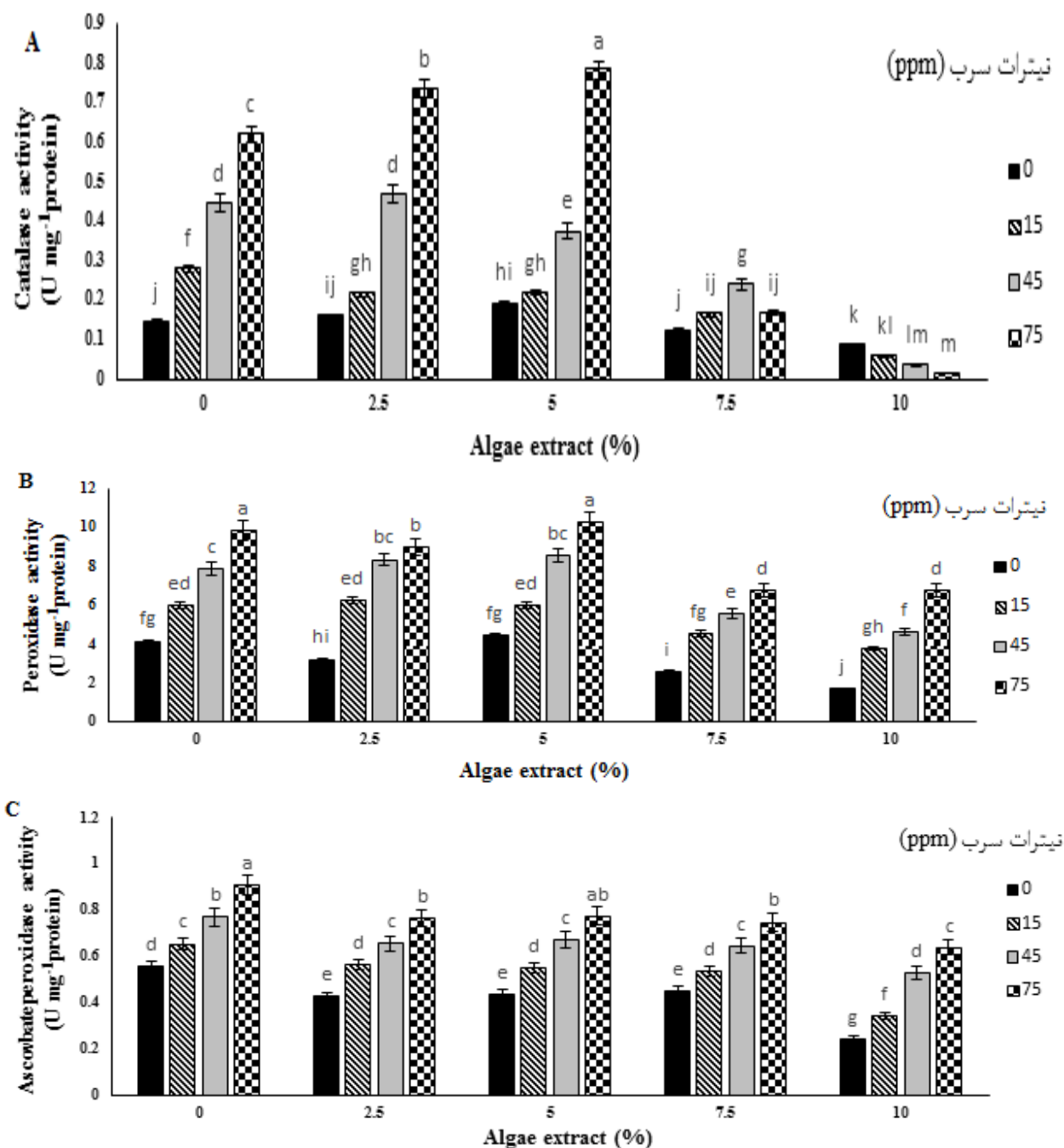
بر اساس نتایج به دست آمده، با افزایش غلظت نیترات سرب، سطح برگ ها در مقایسه با تیمار شاهد به طور معنی داری کاهش یافت. مطالعات پیشین نشان داده اند، فلزات سنگین به ویژه سرب با مهار تقسیم سلولی و کاهش گسترش سلول ها، رشد گیاهان را به طور قابل توجهی محدود می کنند. این اثر منفی منجر به کاهش سطح برگ، کاهش ظرفیت تفرق و محدودیت در انتقال ترکیبات ضروری به اندام های هوایی شده و در نتیجه رشد بخش های هوایی گیاه را کند می کند. تنش سرب با ایجاد اختلال در تنظیم ژن های مرتبط با هورمون های رشد و پروتئین های ساختاری، مستقیماً بر تشکیل سلول و گسترش سطح برگ تأثیر گذار است (Zulfiqaret al., 2019; Aslamet al., 2021; El Khattabi et al., 2025).

مطالعات متعددی گزارش کرده‌اند که قرار گرفتن گیاهان در معرض غلظت‌های بالای فلزات سنگین، موجب کاهش محتوای رنگدانه‌های فتوسنتزی می‌شود (Dalyanet al., 2019; Kumaret al., 2024)، یافته‌ای که با نتایج مطالعه حاضر هم‌راستا است.



شکل ۴- نمودار مقایسه میانگین اثر متقابل سطوح مختلف عصاره جلبک سبز *U. fasciata* و نیترات سرب روی تغییرات میزان کربوهیدرات (A)، پرولین (B) و مالون‌دی‌آلدئید (C) برگ‌های گیاهچه گندم. نمودارهای دارای حروف یکسان اختلاف معنی‌داری از لحاظ آماری ندارند ($P < 0.05$).

Figure 4- Comparison of the mean interaction effects of different levels of *U. fasciata* green algal extract and lead nitrate on carbohydrate (A), proline (B), and malondialdehyde (MDA) (C) contents in the leaves of wheat seedlings. Columns with the same letter do not have a significant difference ($P < 0.05$).



شکل ۵- نمودار مقایسه میانگین اثر متقابل سطوح مختلف عصاره جلبک سبز *U. fasciata* و نیتрат سرب روی تغییرات فعالیت آنزیم‌های کاتالاز (A)، پراکسیداز (B) و آسکوربات پراکسیداز (C) برگ‌های گیاهچه گندم. نمودارهای دارای حروف یکسان اختلاف معنی‌داری از لحاظ آماری ندارند ($P < 0.05$).

Figure 5- Comparison of the mean interaction effects of different levels of *U. fasciata* green algal extract and lead nitrate on activity of catalase (A), peroxidase (B) and ascorbate peroxidase (C) enzymes in the leaves of wheat seedlings. Columns with the same letter do not have a significant difference ($P < 0.05$).

مه‌ار فرایند فتوسنتز یکی از شناخته‌شده‌ترین علائم سمیت ناشی از سرب محسوب می‌شود، از منظر بیوشیمیایی، این پدیده عمدتاً ناشی از افزایش فعالیت آنزیم کلروفیلز و تشدید پراکسیداسیون لیپیدهاست (Aslamet *al.*, 2021). همچنین، سرب

با اتصال به گروه‌های تیولی (SH-) و لیگندهای نیتروژنی و گوگردی در پروتئین‌ها، فعالیت آنزیم‌هایی نظیر فردوکسین +NADP+ ردوکتاز، γ -آمینولولولینیک اسید دهیدراتاز و پروتوکلروفیلدردوکتاز را مهار کرده، در نتیجه محتوای رنگدانه‌های فتوسنتزی را کاهش می‌دهد و علاوه بر این، جانشینی فلزات سنگین به جای منیزیم مرکزی در ساختار کلروفیل از دیگر مکانیسم‌های کاهش جذب نور و افت بازده فتوسنتزی است (Zulfiqaret al., 2019; Aslamet al., 2021; El Khattabi et al., 2025).

جلبک‌های دریایی از منابع ارزشمند زیستی در اکوسیستم‌های دریایی به شمار می‌روند. عصاره‌های استخراج‌شده از جلبک‌ها به دلیل دارا بودن ترکیبات محرک رشد مانند اکسین، جیبرلین و سیتوکینین و همچنین حضور عناصر ماکرو از قبیل K، Ca، P و میکرومغذی‌هایی مانند Fe، Mo، B، Co، Mn، Cu و Zn به عنوان کودهای مایع و محرک‌های زیستی مؤثر در کشاورزی مورد استفاده قرار می‌گیرند (Ghafarizadeh et al., 2018a). نتایج حاصل از پژوهش حاضر نشان داد که استفاده از عصاره جلبکی به صورت محلول پاشی برگ، اثرات منفی تنش فلز سنگین سرب را کاهش داده و موجب افزایش سطح برگ و محتوای رنگدانه‌های فتوسنتزی گردید. این نتایج با یافته‌های پیشین مبنی بر اثر مثبت عصاره‌های جلبک بر سنتز کلروفیل و افزایش بیان ژن‌های مرتبط با هورمون‌های رشد هم‌خوانی دارد (Amrutha et al., 2025).

مکانیسم حفاظتی عصاره جلبک احتمالاً ناشی از افزایش سطح سیتوکینین‌ها و تنظیم تعادل هورمون‌های گیاهی است، سیتوکینین‌ها با تسریع توسعه کلروپلاست و افزایش تعداد و اندازه گرانها، موجب بهبود کارایی فتوسنتزی و تأخیر در پیری سلول‌ها می‌شوند. افزون بر این، حضور عناصر معدنی مانند منیزیم و آهن در عصاره جلبک می‌تواند سنتز کلروفیل را تحریک کرده و از آسیب‌های ناشی از جانشینی فلزات سنگین در ساختار آن جلوگیری کند (Ali et al., 2021).

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که در گیاه گندم تحت تیمار نیترات سرب، میزان مالون دی‌آلدئید (MDA) به‌طور معنی‌داری نسبت به شاهد افزایش یافت. تنش فلز سرب با تأثیر بر فرایندهای انتقال الکترون در کلروپلاست، موجب افزایش تولید گونه‌های اکسیژن فعال‌شده و در نتیجه باعث آسیب غشاهای سلولی و تشدید پراکسیداسیون لیپیدها می‌گردد. افزایش MDA شاخصی از آسیب اکسیداتیو و افزایش تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن در بافت گیاه است که به اختلال در ساختار غشا و عملکرد آنزیم‌ها منجر می‌شود (Kaur et al., 2012; Rizvi et al., 2020; Navabpour et al., 2020). شدت سمیت فلزی در گیاهان به نوع گونه گیاهی، عنصر خاص، غلظت فلز، pH و ترکیب خاک بستگی دارد (Sperdouli et al., 2022).

گیاهان برای مقابله با تنش‌های محیطی، از مکانیسم‌های مختلفی از جمله تجمع مواد محلول سازگار استفاده می‌کنند. در پژوهش حاضر نیز مشاهده شد که گیاه گندم، همانند سایر گیاهان، برای مقابله با تنش ناشی از سرب، میزان پرولین آزاد و کربوهیدرات‌های محلول خود را افزایش داد. پرولین در گیاهان نقش چندگانه‌ای ایفا می‌کند؛ این اسید آمینه موجب حفظ ساختار طبیعی پروتئین‌ها، جلوگیری از دناتوراسیون آنزیم‌ها و حفظ تعادل اسمزی و pH سلولی می‌شود. همچنین، به عنوان

تنظیم‌کننده واکنش‌های اکسیداسیون-احیا و منبع کربن و نیتروژن در زمان تنش عمل می‌کند. پس از رفع تنش، پرولین به سرعت تجزیه شده و می‌تواند انرژی لازم برای فرایندهای ترمیمی سلولی را فراهم کند. طبق گزارش‌ها، پرولین بیش از آن‌که شاخصی از سازگاری به تنش باشد، به عنوان نشانگر وقوع تنش عمل می‌کند (Ghafarizadeh et al., 2018b).

علاوه بر این، افزایش تجمع کربوهیدرات‌های محلول به گیاه کمک می‌کند تا ذخایر کربوهیدراتی لازم برای حفظ متابولیسم پایه و تنظیم پتانسیل آب سلولی را در شرایط تنش فلزی حفظ نماید (Yang et al., 2024). متابولیسم‌های قندی با تبدیل پلی‌ساکاریدها و الیگوساکاریدها به یکدیگر، تعادل اسمزی سلول را کنترل کرده و از تخریب پروتئین‌ها و آنزیم‌ها در اثر تنش اکسیداتیو جلوگیری می‌کنند. به عبارتی، افزایش قندهای محلول در شرایط تنش‌زا به عنوان یکی از مکانیسم‌های مهم تحمل تنش شناخته می‌شود (Riyazuddin et al., 2021; Saddhe et al., 2021). در عین حال، محتوای پروتئین کل در گیاهان تحت تنش معمولاً کاهش می‌یابد، زیرا تنش سبب تخریب ساختارهای پروتئینی و اختلال در فرایندهای بیوشیمیایی می‌شود (Hasan et al., 2017).

در پژوهش حاضر، کاربرد عصاره جلبک توانست اثرات منفی ناشی از تنش فلز سنگین را تعدیل کند، به گونه‌ای که غلظت ۱۰ درصد عصاره بیشترین افزایش در میزان پروتئین سلولی و بیشترین کاهش در MDA و پرولین را نشان داد. در غلظت‌های پایین‌تر عصاره، تجمع پرولین، قند محلول و MDA بیشتر بود. این یافته‌ها با تحقیقات قبلی هم‌خوانی دارد (Riyazuddin et al., 2024; Rani et al., 2024). در مطالعه ای، Nessim & El-Shenody, 2018 نیز گزارش کردند که عصاره جلبک‌های دریایی با افزایش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی سلول، مقاومت گیاه در برابر تنش فلزی را بهبود می‌بخشد و پراکسیداسیون لیپیدها و آسیب DNA ناشی از فلزات سنگین را کاهش می‌دهد.

تنش سرب با افزایش غلظت کلسیم سیتوزولی، موجب فعال‌سازی آنزیم NADPH اکسیداز غشای پلاسمایی می‌شود که خود باعث القای تنش اکسیداتیو و افزایش تولید گونه‌های اکسیژن فعال می‌گردد. در پی این افزایش، پاسخ آنتی‌اکسیدانی گیاه از طریق افزایش فعالیت آنزیم‌هایی مانند کاتالاز تحریک می‌شود (Dalyan et al., 2019; Zhang et al., 2018). کاتالاز از جمله آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی کلیدی است که با تجزیه H_2O_2 به آب و اکسیژن، از تجمع ROS جلوگیری می‌کند و در تنظیم تعادل اکسیداتیو سلول نقش دارد (Ghafarizadeh et al., 2018a). در مطالعه حاضر نیز، فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی به‌طور معنی‌داری ($P < 0.05$) نسبت به شاهد افزایش یافت. افزایش تولید ROS همچنین موجب آسیب به مولکول‌های DNA از جمله بازهای پورینی و پیریمیدینی، دئوکسی‌ریبوز و اکسایش بازها می‌شود. در نتیجه، سرب باعث مهار فعالیت‌های متابولیکی، کاهش رشد سلولی و افت نسبت DNA به RNA می‌گردد (Dutta et al., 2018). در مطالعات مختلف، افزایش فعالیت آنزیم پراکسیداز در پاسخ به آسیب‌های سلولی گزارش شده است. این افزایش احتمالاً بخشی از یک واکنش حفاظتی برای تأخیر در فرآیند پیری سلولی است. بنابراین، افزایش فعالیت آنزیم پراکسیداز در ایجاد مقاومت گیاه در

برابر آسیب‌های اکسیداتیو القاشده توسط فلزات سنگین نقش مؤثری دارد (Mohamed et al., 2025; Venkatachalam et al., 2025). آنزیم پراکسیداز با استفاده از ترکیبات فنولیک به عنوان دهنده الکترون، موجب تجزیه پراکسید هیدروژن می‌شود (Ghafari-zadeh et al., 2018a).

از میان آنزیم‌های پراکسیداز، آنزیم آسکوربات پراکسیداز از مهم‌ترین آنزیم‌های درگیر در سم‌زدایی H_2O_2 به شمار می‌رود. این آنزیم در چرخه گلوکوتاتیون-آسکوربات در کلروپلاست، با استفاده از آسکوربات به عنوان دهنده الکترون، موجب تجزیه پراکسید هیدروژن می‌شود. آسکوربات پراکسیداز در غلظت‌های پایین‌تر H_2O_2 فعال شده و نقش تنظیمی مهمی در تعادل گونه‌های اکسیژن فعال و پیام‌رسانی سلولی ایفا می‌کند (Ghafari-zadeh et al., 2018a).

نتیجه‌گیری کلی

نتایج حاصل از پژوهش حاضر نشان داد که تنش ناشی از فلز سنگین سرب تأثیر منفی قابل توجهی بر رشد، فیزیولوژی و مکانیسم‌های دفاعی گیاه گندم دارد. افزایش غلظت نیترات سرب موجب کاهش سطح برگ، افت میزان رنگدانه‌های فتوسنتزی، افزایش پراکسیداسیون لیپیدها و در نتیجه اختلال در فرآیندهای فتوسنتزی شد. همچنین افزایش قابل ملاحظه در محتوای مالون‌دی‌آلدئید، پرولین و کربوهیدرات‌های محلول بیانگر بروز تنش اکسیداتیو و فعال شدن مکانیسم‌های دفاعی گیاه بود. در مقابل، کاربرد عصاره جلبک دریایی *U. Fasciata* به ویژه در غلظت ۱۰ درصد توانست اثرات زیان‌بار تنش سرب را به‌طور مؤثری تعدیل نموده و با بهبود رشد رویشی و کاهش شاخص‌های تنش اکسیداتیو، تحمل گیاه را ارتقا دهد. به نظر می‌رسد ترکیبات زیست‌فعال موجود در عصاره جلبک از طریق بهبود تعادل اکسیداتیو و تنظیم فرآیندهای فیزیولوژیکی، در افزایش تحمل گندم به تنش فلزات سنگین نقش دارند. در مجموع، این نتایج نشان می‌دهد که عصاره *U. fasciata* می‌تواند به‌عنوان یک محرک زیستی سازگار با محیط زیست برای کاهش آثار منفی آلودگی فلزات سنگین در گیاهان زراعی مورد استفاده قرار گیرد.

منابع

- Aebi, H. (1984). Catalase in vitro. *Methods in Enzymology*, 105 (1): 121-126.
- Alam, M. Z., Braun, G., Norrie, J., & Hodges, D. M. (2013). Effect of *Ascophyllum* extract application on plant growth, fruit yield and soil microbial communities of strawberry. *Canadian Journal of Plant Science*, 93(1): 23-36.
- Ali, O., Ramsubhag, A., & Jayaraman, J. (2021). Biostimulant properties of seaweed extracts in plants: Implications towards sustainable crop production. *Plants*, 10 (3): 531.
- Ali, O., Ramsubhag, A., & Jayaraman, J. (2019). Biostimulatory activities of *Ascophyllum nodosum* extract in tomato and sweet pepper crops in a tropical environment. *PLoS One*, 14 (5): e0216710.
- Amrutha, T. G., Devi, U., Babybai, H. V., & Shilpa, H. D. (2025). Seaweed Extract as a Potential Stimulant in Mitigating Abiotic Stress: A Comprehensive Review. *Journal of Advances in Biology & Biotechnology*, 28 (9): 990-1001.

- Arioli, T., Mattner, S. W., Islam, M. T., Tran, T. L. C., Weisser, M., Winberg, P., & Cahill, D. M. (2024).** Applications of seaweed extracts in agriculture: An Australian perspective. *Journal of Applied Phycology*, 36 (2): 713-726.
- Aslam, M., Aslam, A., Sheraz, M., Ali, B., Ulhassan, Z., Najeeb, U., ... & Gill, R. A. (2021).** Lead toxicity in cereals: mechanistic insight into toxicity, mode of action, and management. *Frontiers in plant science*, 11 (1): 587785.
- Bates, L. S., Waldren, R. P., & Teare, I. D. (1973).** Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant and soil*, 39 (1): 205-207.
- Chen, G.N. & Asada, K. (1989).** Ascorbate peroxidase in tea Leaves: occurrence of two isozymes and differences in their enzymatic and molecular properties. *Plant and Cell Physiology*, 30 (1): 987-998.
- Dalyan, E., Yüzbaşıoğlu, E., & Akpınar, I. (2019).** Physiological and biochemical changes in plant growth and different plant enzymes in response to lead stress. *Lead in plants and the environment*, 129-147.
- Davey, M.W., Stals, E., Panis, B., Keulemans, J. & Swennen, R.L. (2005).** High throughput of malondialdehyde in plant tissue. *Analytical Biochemistry*, 347 (1): 201-207.
- DuBois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A., & Smith, F. (1956).** Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical chemistry*, 28 (3): 350-356.
- Dutta, S., Mitra, M., Agarwal, P., Mahapatra, K., De, S., Sett, U., & Roy, S. (2018).** Oxidative and genotoxic damages in plants in response to heavy metal stress and maintenance of genome stability. *Plant signaling & behavior*, 13 (8): e1460048.
- El Khattabi, O., Lamwati, Y., Henkrar, F., Collin, B., Levard, C., Colin, F., ... & Fahr, M. (2025).** Lead-induced changes in plant cell ultrastructure: an overview. *Biometals*, 38 (1): 1-19.
- Ghfarizadeh, A., & Niroomand, A. (2021).** Marine Algae as a New Source of Bioactive Compositions. *Alkhas*, 3 (4): 1-5.
- Ghfarizadeh, A., Seyyed Nejad, S. M., & Gilani, A. (2018a).** Studies on the effect of seaweed liquid fertilizer (*Nizamuddiniana zanardinii*) in different levels of urea on some growth parameters and antioxidant activity of seedlings *Triticum aestivum* cv.'Chamran2'. *Applied Biology*, 31 (1): 207-227.
- Ghfarizadeh, A., SEYYED, N. S. M., Vafaei, M., Gilani, A., & Saboor, A. (2018b).** A study on the allelopathic effect of olive fruit pomace (*Olea europaea* L.) on some physiological parameters and yield of three wheat cultivars in climatic conditions of Khuzestan. *Journal of Plant Environmental Physiology*, 13 (1): 31-50.
- Ghfarizadeh, A., Seyyed Nejad, S. M., & Gilani, A. (2017).** Synergistic effect of seaweed extract and urea fertilizer on growth and biochemical parameters of *Triticum aestivum* at vegetative stage. *European online journal of natural and social sciences*, 6(4): pp-545.
- Ghfarizadeh, A., Seyyed Nejad, S. M., & Abdolali Gilani, A. (2016).** The effect of foliar spray of brown seaweed water extract and different levels of nitrogen on some physiological, biochemical, parameters and yield of wheat. *Journal of Plant Environmental Physiology*, 41 (1): 13-25.
- Ghfarizadeh, A., Seyyed Nejad, S. M., & Gilani, M. (2015).** Investigation the effect of different levels of urea fertilizer and brown seaweed extract on the physiological traits and grain yield. *crop physiology journal*, 7 (27): 69-83.
- Gupta, M., Dwivedi, V., Kumar, S., Patel, A., Niazi, P., & Yadav, V. K. (2024).** Lead toxicity in plants: mechanistic insights into toxicity, physiological responses of plants and mitigation strategies. *Plant Signaling & Behavior*, 19 (1): 2365576.
- Hadi, F., & Aziz, T. (2015).** A mini review on lead (Pb) toxicity in plants. *Journal of Biology and Life Science*, 6(2): 91-101.
- Hasan, M. K., Cheng, Y., Kanwar, M. K., Chu, X. Y., Ahammed, G. J., & Qi, Z. Y. (2017).** Responses of plant proteins to heavy metal stress—a review. *Frontiers in plant science*, 8 (1): 1492.
- Hoyle, M.C. (1972).** Indoleacetic acid oxidase: A dual catalytic enzyme. *Plant Physiology*, 50(1), 15-18.
- Jannin, L., Arkoun, M., Etienne, P., Laine, P., Goux, D., Garnica, M., ... & Ourry, A. (2013).** *Brassica napus* growth is promoted by *Ascophyllum nodosum* (L.) Le Jol. seaweed extract: microarray analysis and physiological characterization of N, C, and S metabolisms. *Journal of plant growth regulation*, 32 (1): 31-52.

- Kanwal, A., Farhan, M., Sharif, F., Hayyat, M. U., Shahzad, L., & Ghafoor, G. Z. (2020). Effect of industrial wastewater on wheat germination, growth, yield, nutrients and bioaccumulation of lead. *Scientific reports*, 10 (1): 11361.
- Karkhane, M., Lashgarian, H. E., Mirzaei, S. Z., Ghaffarizadeh, A., Sepahvand, A., & Marzban, A. (2020). Antifungal, antioxidant and photocatalytic activities of zinc nanoparticles synthesized by *Sargassum vulgare* extract. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 29 (1): 101791.
- Kaur, G., Singh, H. P., Batish, D. R., & Kumar, R. K. (2012). Growth, photosynthetic activity and oxidative stress in wheat (*Triticum aestivum*) after exposure of lead to soil. *Journal of environmental biology*, 33 (2): 265.
- Nessim, A., & El-Shenody, R. (2018). Mitigation of lead stress in *Triticum aestivum* by seed priming in aqueous extracts of the macroalgae *Halimeda opuntia* and *Codium fragile*. *Egyptian Journal of Botany*, 58 (2): 263-274.
- Kumar, G., Nanda, S., Singh, S. K., Kumar, S., Singh, D., Singh, B. N., & Mukherjee, A. (2024). Seaweed extracts: enhancing plant resilience to biotic and abiotic stresses. *Frontiers in Marine Science*, 11 (1): 1457500.
- Kumar, A., & Prasad, M. N. V. (2018). Plant-lead interactions: transport, toxicity, tolerance, and detoxification mechanisms. *Ecotoxicology and environmental safety*, 166 (1): 401-418.
- Lichtenthaler, H. K. (1987). Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. In *Methods in enzymology*. 148 (2): 350-382.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., & Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of biological chemistry*, 193 (1): 265-275.
- MacDonald, J. E., Hacking, J., Weng, Y., & Norrie, J. (2012). Root growth of containerized lodgepole pine seedlings in response to *Ascophyllum nodosum* extract application during nursery culture. *Canadian Journal of Plant Science*, 92 (6): 1207-1212.
- Margal, P. B., Thakare, R. S., Kamble, B. M., Patil, V. S., Patil, K. B., & Titirmare, N. S. (2023). Effect of seaweed extracts on crop growth and soil: a review. *Journal of Experimental Agriculture International*, 45 (9): 9-19.
- Mattner, S. W., Milinkovic, M., & Arioli, T. (2018). Increased growth response of strawberry roots to a commercial extract from *Durvillaea potatorum* and *Ascophyllum nodosum*. *Journal of applied phycology*, 30(5): 2943-2951.
- Mohamed, H. I., Ullah, I., Toor, M. D., Tanveer, N. A., Din, M. M. U., Basit, A., ... & Rehman, M. U. (2025). Heavy metals toxicity in plants: understanding mechanisms and developing coping strategies for remediation: a review. *Bioresources and Bioprocessing*, 12 (1): 95.
- Nas, F. S., & Ali, M. (2018). The effect of lead on plants in terms of growing and biochemical parameters: a review. *MOJ Ecology & Environmental Sciences (MOJES)*, 3 (4), 265-268.
- Navabpour, S., Yamchi, A., Bagherikia, S., & Kafi, H. (2020). Lead-induced oxidative stress and role of antioxidant defense in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Physiology and molecular biology of plants*, 26 (4): 793-802.
- Osman, H. E., & Fadhlallah, R. S. (2023). Impact of lead on seed germination, seedling growth, chemical composition, and forage quality of different varieties of Sorghum. *Journal of Umm Al-Qura University for Applied Sciences*, 9 (1): 77-86.
- Rani, M., Vikas, Kumar, R., Lathwal, M., & Kamboj, A. (2024). Effect and responses of lead toxicity in plants. In *Lead toxicity mitigation: sustainable Nexus approaches* (pp. 211-241). Cham: Springer Nature Switzerland.
- Riyazuddin, R., Nisha, N., Ejaz, B., Khan, M. I. R., Kumar, M., Ramteke, P. W., & Gupta, R. (2021). A comprehensive review on the heavy metal toxicity and sequestration in plants. *Biomolecules*, 12 (1): 43.
- Rizvi, A., Zaidi, A., Ameen, F., Ahmed, B., AlKahtani, M. D., & Khan, M. S. (2020). Heavy metal induced stress on wheat: phytotoxicity and microbiological management. *RSC advances*, 10 (63): 38379-38403.
- Saddhe, A. A., Manuka, R., & Penna, S. (2021). Plant sugars: Homeostasis and transport under abiotic stress in plants. *Physiologia plantarum*, 171 (4): 739-755.

Shahzamani, K., Lashgarian, H. E., Karkhane, M., Ghaffarizadeh, A., Ghotekar, S., & Marzban, A. (2022). Bioactivity assessments of phyco-assisted synthesized selenium nanoparticles by aqueous extract of green seaweed, *Ulva fasciata*. *Emergent Materials*, 5(6): 1689-1698.

Shukla, P. S., Borza, T., Critchley, A. T., & Prithiviraj, B. (2021). Seaweed-based compounds and products for sustainable protection against plant pathogens. *Marine drugs*, 19 (2): 59.

Sperdouli, I. (2022). Heavy metal toxicity effects on plants. *Toxics*, 10 (12): 715.

Venkatachalam, J., Mohan, H., & Seralathan, K. K. (2025). Role of plant growth promoting bacteria in alleviating heavy metals induced oxidative stress in plant systems: a review. *Environmental Science and Pollution Research*, 1-20.

Wieczorek, J., Baran, A., Urbański, K., Mazurek, R., & Klimowicz-Pawlas, A. (2018). Assessment of the pollution and ecological risk of lead and cadmium in soils. *Environmental geochemistry and health*, 40 (6): 2325-2342.

Yang, Y., Wang, S., Zhao, C., Jiang, X., & Gao, D. (2024). Responses of non-structural carbohydrates and biomass in plant to heavy metal treatment. *Science of the Total Environment*, 909: 168559.

Yang, Y., Wei, X., Lu, J., You, J., Wang, W., & Shi, R. (2010). Lead-induced phytotoxicity mechanism involved in seed germination and seedling growth of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Ecotoxicology and environmental safety*, 73 (8): 1982-1987.

Zhang, Y., Deng, B., & Li, Z. (2018). Inhibition of NADPH oxidase increases defense enzyme activities and improves maize seed germination under Pb stress. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 158: 187-192.

Zulfiqar, U., Farooq, M., Hussain, S., Maqsood, M., Hussain, M., Ishfaq, M., ... & Anjum, M. Z. (2019). Lead toxicity in plants: Impacts and remediation. *Journal of environmental management*, 250: 109557.

Zwolak, A., Sarzyńska, M., Szpyrka, E., & Stawarczyk, K. (2019). Sources of soil pollution by heavy metals and their accumulation in vegetables: A review. *Water, air, & soil pollution*, 230 (7): 164.

Effect of foliar application of humic acid and silicon on some quantitative and qualitative characteristics of *Matricaria chamomilla* L. under salinity stress

Pages
45-62

M. Salehi^{1*} and R. Zeinali²

1&2) Department of Horticultural Sciences and Engineering, Nahavand Higher Education Complex, Bu -Ali Sina University, Hamedan, Iran.

*Corresponding author: mahtab.salehi@basu.ac.ir

Received date: 2025.11.01

Accepted date: 2026.02.01

Abstract

In order to investigate the effect of foliar application of humic acid and silicon on some quantitative and qualitative characteristics of *Matricaria chamomilla* L. under salt stress, an experiment was conducted as a factorial based on a completely randomized design with three replications in research greenhouse of Nahavand Higher Education Complex during 2024. Experimental factors included salinity stress at three levels (0, 50, 100 mM), foliar application of humic acid at three levels (0, 0.5 and 1.5 g.L⁻¹) and silicon foliar application at three levels (0, 1.5 and 3 mM). Chlorophyll *a*, *b* content, fresh and dry weight of flower, height of the plant, capitulum diameter, total phenol and flavonoid contents were measured traits in this experiment. The results indicated a positive effect of the application of humic acid and silicon on most of the studied traits, so that the highest amount of chlorophyll *a* (1.04 mg.g⁻¹) and chlorophyll *b* (0.55 mg.g⁻¹) was observed at 50 mM salinity and using 0.5 g.L⁻¹ humic acid and without the use of silicon. The highest values of plant height (41 cm) and capitulum diameter (8.28 mm) were obtained by applying 50 mM salinity and the simultaneous use of 0.5 g.L⁻¹ humic acid and 3 mM silicon. The increase percentage of these traits compared to the absence of humic acid and silicon at the same salinity level were 24.39 and 23.55%, respectively. The highest levels of total phenols (13.07 mg gallic acid.g⁻¹ extract) and total flavonoids (26.66 mg rutin.g⁻¹ extract) were obtained at a salinity level of 100 mM, 1.5 mM silicon, and without the use of humic acid. With simultaneous application of humic acid and silicon, the adverse effects of salt stress on some traits such as plant height and capitulum diameter were reduced. Therefore, the use of humic acid and silicon can be suggested as an effective method to reduce the destructive effects of salinity stress.

Keywords: Chlorophyll *a* and *b* content, *Matricaria chamomilla* L., Salinity, Total phenol and flavonoid contents.

اثر محلول پاشی اسید هیومیک و سیلیکون روی برخی خصوصیات کمی و کیفی بابونه (*Matricaria chamomilla* L.) در شرایط تنش شوری

مهتاب صالحی^{۱*} و رومینا زینلی^۲

۱ و ۲) گروه علوم و مهندسی باغبانی، دانشگاه بوعلی سینا - مجتمع آموزش عالی نهاوند (ویژه دختران)، همدان، ایران.

* نویسنده مسئول: mahtab.salehi@basu.ac.ir

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۱۱/۱۲

تاریخ دریافت: ۱۴۰۴/۰۸/۱۰

چکیده

به منظور بررسی اثر محلول پاشی اسید هیومیک و سیلیکون بر برخی خصوصیات کمی و کیفی بابونه تحت تنش شوری، آزمایشی به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی در سه تکرار در گلخانه تحقیقاتی مجتمع آموزش عالی نهاوند در سال ۱۴۰۳ اجرا شد. فاکتورهای مورد بررسی شامل تنش شوری در سه سطح (صفر، ۵۰ و ۱۰۰ میلی مولار)، محلول پاشی اسید هیومیک در سه سطح (صفر، ۵۰/۵ و ۱۰۰/۵ گرم در لیتر) و محلول پاشی سیلیکون در سه سطح (صفر، ۱/۵ و ۳ میلی مولار) بود. صفاتی که در این آزمایش مورد اندازه گیری قرار گرفتند، عبارت بودند از: محتوای کلروفیل a و b ، وزن تر و خشک گل، ارتفاع گیاه، قطر کاپیتول، محتوای فنل و فلاونوئید کل. نتایج، بیانگر تأثیر مثبت کاربرد اسید هیومیک و سیلیکون بر اکثر صفات مورد بررسی بود، به طوری که بیشترین میزان کلروفیل a (۱/۰۴ میلی گرم بر گرم) و بیشترین میزان کلروفیل b (۰/۵۵ میلی گرم بر گرم) در شوری ۵۰ میلی مولار و با استفاده از ۰/۵ گرم در لیتر اسید هیومیک و بدون کاربرد سیلیکون مشاهده شد. بیشترین مقادیر ارتفاع گیاه (۴۱ سانتی متر) و قطر کاپیتول (۸/۲۸ میلی متر)، با کاربرد ۵۰ میلی مولار شوری و استفاده همزمان از ۰/۵ گرم در لیتر اسید هیومیک و ۳ میلی مولار سیلیکون به دست آمد. درصد افزایش این صفات در مقایسه با عدم کاربرد اسید هیومیک و سیلیکون در همان سطح شوری، به ترتیب ۲۴/۳۹ و ۲۳/۵۵ درصد بود. بیشترین میزان فنل کل (۱۳/۰۷ میلی گرم اسید گالیک بر گرم عصاره) و فلاونوئید کل (۲۶/۶۶ میلی گرم روتین بر گرم عصاره)، در سطح شوری ۱۰۰ میلی مولار، ۱/۵ میلی مولار سیلیکون و بدون استفاده از اسید هیومیک به دست آمد. با کاربرد همزمان اسید هیومیک و سیلیکون، آثار سوء تنش شوری در برخی صفات مانند ارتفاع گیاه و قطر کاپیتول کاهش یافت. بنابراین می توان کاربرد اسید هیومیک و سیلیکون را به عنوان راهکاری مؤثر برای کاهش اثرات تخریبی تنش شوری پیشنهاد کرد.

واژه‌های کلیدی: بابونه، شوری، محتوای فنل و فلاونوئید کل و محتوای کلروفیل a و b .

مقدمه

شوری خاک، یکی از مشکلات اساسی در بسیاری از مناطق خشک و نیمه خشک جهان از جمله ایران است. در این مناطق، اغلب میزان بارندگی به اندازه‌ای نیست که بتواند نمک‌های خاک را شسته و از دسترس ریشه گیاه خارج کند و همچنین میزان تبخیر بالا از سطح خاک، منجر به تجمع نمک و شورتر شدن سطح خاک می‌شود (Aghaei Joubani *et al.*, 2015). شوری موجب بروز تنش اسمزی و یونی و به دنبال آن، تخریب غشای سلول، تغییر سطوح تنظیم‌کننده‌های رشد، عدم توازن تغذیه‌ای، اختلال در فعالیت آنزیم‌ها، کاهش بازده فتوسنتز و در نهایت، از بین رفتن گیاه می‌گردد (Hasanuzzaman *et al.*, 2013). همچنین، تنش شوری موجب کاهش میزان کلروفیل از طریق اکسیداسیون آن توسط رادیکال‌های آزاد، تداخل یون‌های نمک با کمپلکس‌های رنگدانه پروتئین، اختلال در عمل کلروپلاست و افزایش فعالیت آنزیم کلروفیل‌از می‌شود (Sarker and Oba, 2020). آسیب و کاهش محتوای رنگیزه‌های فتوسنتزی، منجر به کاهش بازده جذب نور در هر دو فتوسیستم I و II و در نتیجه کاهش ظرفیت فتوسنتزی می‌شود (Ashraf and Harris, 2013). گیاهان برای سم‌زدایی گونه‌های اکسیژن واکنش‌گر، از مسیرهای مشخصی بهره می‌گیرند که عبارتند از: طیف وسیعی از املاح سازگار از جمله پروتئین محلول، پرولین و قندهای محلول یا سیستم‌های آنتی‌اکسیدانی غیر آنزیمی همانند کارتنوئیدها، فلاونوئیدها و سایر ترکیبات فنلی و آنزیمی مانند پلی‌فنل‌اکسیداز (به تنهایی یا در ترکیب با یکدیگر). این مسیرها، نقش مهمی در متعادل کردن تنش اسمزی و محافظت از ساختمان ماکرومولکول‌ها (مانند پروتئین‌ها و غشاها) در برابر آسیب‌های ناشی از تنش شوری دارند (Tester and Davenport, 2003). گزارش‌های متعددی مبنی بر نقش عنصر سیلیس در کاهش اثرات مضر تنش شوری در گیاهان وجود دارد (Abdelaal *et al.*, 2015; Hurtado *et al.*, 2020; Rizwan *et al.*, 2020). سیلیکون با افزایش مقاومت به آفات (Sakr, 2017) و بیماری‌ها (Fauteux *et al.* 2005)، بهبود تعادل آبی (Wang *et al.* 2021)، فعال نمودن آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی، کاهش جذب سدیم و افزایش جذب پتاسیم و کلسیم (Ahmad *et al.* 2019) و افزایش سنتز کلروفیل (Silva *et al.* 2012)، موجب افزایش تحمل گیاهان به تنش شوری می‌گردد.

Veisi *et al.* (2023) گزارش کردند که محلول پاشی گیاه همیشه بهار (*Calendula officinalis* L.) با نانوذرات سیلیکون در غلظت کمتر (۷۵ میلی گرم در لیتر)، باعث افزایش کلروفیل در همه سطوح تنش شوری شد و حتی در غلظت‌های بیشتر (۱۵۰ و ۳۰۰ میلی گرم در لیتر)، باعث افزایش کلروفیل (در شوری ۷۰ میلی مولار) و یا حفظ آن در بالاترین سطح شوری (۱۰۰ میلی مولار) شد (Veisi *et al.*, 2023). نانوذرات سیلیکون، به‌ویژه در غلظت‌های کمتر، با حذف یا سمیت‌زدایی رادیکال‌های آزاد، باعث بهبود سیستم دفاعی گیاه و افزایش کارایی فتوسیستم II و عملکرد کوآنتومی می‌شوند (Tripathi *et al.*, 2017). درواقع، افزایش رشد گیاه در حضور سیلیکون می‌تواند ناشی از تجمع سیلیکون در برگ‌ها باشد که از طریق بهبود توانایی مکانیکی ساقه و برگ‌ها، باعث ایستادگی ساقه و گسترش برگ‌ها در برابر نور و افزایش جذب نور و ظرفیت فتوسنتزی گیاه

می‌شود (Raj and Thakral, 2008). بررسی اثر نانوذرات سیلیکون توأم با تیمار شوری بر برخی فاکتورهای رشدی در گیاه زعفران (*Crocus sativus* L.) نشان داد که کاربرد نانوسیلیکون از طریق محلول‌پاشی، تا حدود زیادی اثرات منفی ناشی از تنش شوری بر فاکتورهای رشدی زعفران را بهبود بخشید (Asemeh and Pourakbar, 2016).

گزارش شده است که کاربرد سیلیکون می‌تواند با تغییر میزان اسمولیت‌ها مانند پرولین (Yin *et al.*, 2016)، گلايسين بتائين (Torabi *et al.*, 2015)، کربوهیدرات‌ها (Ming *et al.*, 2012)، ترکیبات آنتی‌اکسیدانی مثل فنل‌ها (Hashemi *et al.*, 2010)، قند محلول و آمینواسیدها (Hajiboland *et al.*, 2017)، تحمل به شوری را در گیاه افزایش دهد. با توجه به ملاحظات محیط زیست، اخیراً استفاده از اسیدهای آلی برای بهبود خصوصیات فیزیکی، شیمیایی و زیستی خاک، کاربرد زیادی یافته و باعث اثرات مفیدی در افزایش تولید و بهبود کیفیت محصولات کشاورزی شده است (Samavat and Malakooti, 2006). پژوهش‌های مختلف نشان داده است که اسید هیومیک می‌تواند اثرات مستقیم و غیرمستقیم بر فرایندهای فیزیولوژیکی رشد گیاه داشته باشد. این پژوهش‌ها نشان داده است که در محیط‌های شور، اثرات غیرمستقیم این ترکیبات بر سیستم خاک، از طریق بهبود ویژگی‌های فیزیکی، شیمیایی و بیولوژیکی ریزوسفر است (Mohamed, 2012; Rady, 2012; Pizzeghello *et al.*, 2013). اثرات مستقیم این ترکیبات بر سیستم گیاه از طریق افزایش جوانه‌زنی، به‌دلیل ویژگی جذب آب و تأمین رطوبت مناسب برای بذر، رشد گیاه، افزایش نفوذپذیری غشای سلولی و جذب عناصر غذایی، تسریع انتقال عناصر غذایی ضروری در ریشه، سنتز و فعالیت‌های آنزیمی و فعالیت‌های شبه‌هورمونی می‌باشد و به این ترتیب، سبب تحمل گیاه به شوری خواهد شد (Gülser *et al.*, 2010; Ouni *et al.*, 2014). بابونه با نام علمی *Matricaria chamomilla* L. گیاهی از تیره کاسنیان است. یکی از گیاهان دارویی شناخته شده است که در صنایع داروسازی، آرایشی - بهداشتی و عطرسازی، از اهمیت زیادی برخوردار است (Petronilho *et al.*, 2012). مرکز اصلی و خزانه ژنی این گیاه، منطقه مدیترانه به‌ویژه ایران می‌باشد (Ghanavati *et al.*, 2010). بابونه دارای خواص بسیاری از جمله درمان اختلالات گوارشی (Menale *et al.*, 2021)، سرماخوردگی (Güzel *et al.*, 2015)، اختلالات کبدی (Živković *et al.*, 2020)، مشکلات عصبی و تنفسی (Neves *et al.*, 2009) می‌باشد. همچنین از این گیاه برای درمان درد و عفونت (Mikou *et al.*, 2016) و برای درمان بیماری‌های پوستی، چشمی و دهانی استفاده می‌شود (Petrakou *et al.*, 2020). نظر به اهمیت دارویی گیاه بابونه و با توجه به روند روبه‌رشد شور شدن خاک‌های زراعی به‌ویژه در مناطق خشک و نیمه‌خشک ایران و لزوم پژوهش در زمینه یافتن راهکارهای تحمل و مقاومت به شوری در گیاهان و با توجه به نقش اسید هیومیک و سیلیکون در کاهش اثرات مخرب تنش‌های زنده و غیرزنده، این مطالعه با هدف بررسی اثر اسید هیومیک و سیلیکون بر گیاه بابونه تحت تنش شوری، آزمایشی به صورت فاکتوریل در قالب طرح

کاملاً تصادفی با ۳ تکرار، با سه عامل شامل شوری در سه سطح (صفر، ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌مولار)، اسید هیومیک در سه سطح (صفر، ۱/۵ و ۳ گرم در لیتر) و سیلیکون در سه سطح (صفر، ۱/۵ و ۳ میلی‌مولار) در گلخانه مجتمع آموزش عالی نهاوند در نیمه دوم

فروردین ماه ۱۴۰۳ اجرا گردید. میانگین بیشترین دمای گلخانه ۳۵ درجه سلسیوس و کمترین دما ۲۰ درجه سلسیوس بود. میزان روشنایی ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی بود. بذر بابونه از شرکت پاکان بذر اصفهان تهیه شد. سیلیکون مورد استفاده در آزمایش (سیلیکات پتاسیم به شکل کود مایع، شامل ۲۶ درصد سیلیسیوم محلول در آب و ۱۲/۶ درصد پتاسیم محلول در آب)، از شرکت سپاهان اصفهان تهیه گردید. اسید هیومیک مورد استفاده با نام تجاری Diamond Grow، متشکل از مواد آلی (۵۰ درصد)، پتاسیم (۱۲ درصد)، کلسیم (۱ درصد)، نیتروژن (۱ درصد) و کربن کل (۳۶ درصد) بود. برای اعمال تنش شوری از نمک NaCl استفاده شد. گلدان‌ها با خاک زراعی با مشخصات فیزیکوشیمیایی ارائه شده در جدول ۱، پر شد. وزن خاک گلدان‌ها ۳ کیلوگرم و ابعاد گلدان‌ها ۳۰ سانتی‌متر (قطر دهانه) × ۲۲ سانتی‌متر (ارتفاع) بود.

جدول ۱ - خصوصیات فیزیکی و شیمیایی خاک گلدان‌ها

Table 1- Physio-chemical properties of pots soil

بافت خاک Soil texture	شن (درصد) Sand (%)	سیلت (درصد) Silt (%)	رس (درصد) Clay (%)	فسفر قابل جذب (پی. پی. ام) Absorbable phosphorus (ppm)	پتاسیم قابل جذب (پی. پی. ام) Absorbable potassium (ppm)
لومی Loam	40	35	25	54	334

ادامه جدول ۱ -

Table 1 coninued

هدایت الکتریکی (دسی‌زیمنس بر متر) Electrical conductivity (ds.m ⁻¹)	اسیدیته گل اشباع (پی. ای. اچ) Saturated soil acidity (pH)	کربنات کلسیم معادل (درصد) Carbonate calcium equivalent (%)	نیتروژن کل (درصد) Total nitrogen (%)	کربن آلی (درصد) Organic carbon (%)
4.3	7.8	35	0.14	1/4

پس از آماده‌سازی گلدان‌ها، در هر گلدان ۱۰ عدد بذر کاشته شد. بعد از استقرار کامل بوته‌ها، تعداد گیاهان به ۵ عدد بوته در هر گلدان تنک گردید. محلول‌های شوری، با حل کردن مقادیر مورد نیاز از کلرید سدیم (ساخت شرکت مرک) با خلوص ۹۵ درصد در آب آبیاری برای رسیدن به هدایت الکتریکی تیمار مورد نظر، تهیه و آب آبیاری (با هدایت الکتریکی ۰/۶۹ دسی‌زیمنس بر متر) به عنوان شاهد در نظر گرفته شد. محلول پاشی با اسید هیومیک و سیلیکون و آبیاری با آب شور، با ظهور برگ‌ها آغاز شد و تا شروع گلدهی ادامه یافت. به منظور جلوگیری از تجمع نمک، آبشویی گلدان‌ها، هر دوهفته یک‌بار با آب معمولی انجام گرفت و برای اطمینان از رسیدن به شوری مورد نظر، هدایت الکتریکی آب خروجی جمع‌شده در زیرگلدانی اندازه‌گیری شد. آبیاری با آب شور به حدی انجام می‌شد که محلول نمک از انتهای گلدان خارج شود و هدایت الکتریکی آب ورودی و آب خروجی (در زیرگلدانی)، اندازه‌گیری می‌شد تا سطح تنش در تمام گلدان و در تمام مراحل رشد، ثابت باشد (Mollazadeh et al., 2024). گلدهی از ۱۵ تیرماه، آغاز گردید و عملیات برداشت گل‌ها، از ۱۵ تیرماه آغاز و تا آخر شهریورماه ادامه داشت. گل‌ها در دمای اتاق، خشک گردیدند و سپس برای اندازه‌گیری فنل و فلاونوئید کل، به آزمایشگاه انتقال داده شدند. در این آزمایش، صفاتی از قبیل محتوای کلروفیل a و b ، وزن تر و خشک گل، ارتفاع گیاه، قطر کاپیتول و میزان فنل و فلاونوئید کل اندازه‌گیری

شدند. به منظور عصاره‌گیری از گیاه، از روش Ozkan *et al* (2007) استفاده شد، به این صورت که مقدار ۱۵ گرم از پودر گل‌ها، در یک بالنِ دردار ریخته شد و ۱۵۰ میلی‌لیتر متانول به آن اضافه گردید. عصاره‌گیری به مدت ۲ ساعت با استفاده از دستگاه اولتراسونیک انجام شد (۱۵ دقیقه عصاره‌گیری، ۱۵ دقیقه استراحت به دستگاه، در مجموع این فرایند ۴ ساعت به طول انجامید). با استفاده از قیف بوختر و کاغذ صافی، عصاره صاف گردید. عصاره صاف‌شده با دستگاه تبخیرکننده دوار در دمای زیر ۴۰ درجه، تغلیظ و دوباره توزین شد، وزن عصاره محاسبه گردید و تا زمان مصرف، در فریزر ۱۸- درجه سانتی‌گراد قرار داده شد (Ozkan *et al.*, 2007). جهت بررسی محتوای فنل کل، از روش Gutfinger (1981) استفاده شد. به طور خلاصه، غلظت‌های مختلف از اسید گالیک (استاندارد)، عصاره گیاه و آب مقطر (شاهد) در سه تکرار تهیه شد و به آنها به ترتیب، آب مقطر، معرف فولین - سیوکالتو و سدیم کربنات اضافه گردید. بعد از ۹۰ دقیقه، جذب نمونه‌ها در برابر شاهد، توسط اسپکتروفوتومتر UV در طول موج ۷۲۵ نانومتر اندازه‌گیری شد. در پایان، محتوای فنل کل، برحسب مقدار معادل اسید گالیک (میلی‌گرم) در عصاره محاسبه شد (Gutfinger, 1981). به منظور بررسی محتوای فلاونوئید کل، از روش Yoo و همکاران (۲۰۰۸) استفاده شد. بدین ترتیب که ابتدا، غلظت‌های مختلف از روتین (استاندارد)، عصاره و آب مقطر (شاهد) در سه تکرار تهیه شد و به آنها به ترتیب، سدیم نیتريت، آلومینیوم کلرید و سود اضافه شد. سپس جذب محلول صورتی‌رنگ در برابر شاهد، توسط اسپکتروفوتومتر UV در طول موج ۵۱۰ نانومتر اندازه‌گیری گردید. در نهایت، محتوای فلاونوئید کل، برحسب مقدار معادل روتین (میلی‌گرم در عصاره) محاسبه شد (Yoo *et al.*, 2008). برای تعیین میزان کلروفیل *a* و *b* از روش Arnon (1949) استفاده گردید. استخراج کلروفیل از برگ، توسط استون ۸۰٪ صورت گرفت. مقدار ۰/۲ گرم از بافت تر برگ هرکدام از تیمارها، وزن شد. ساییدن برگ با استون به صورت تدریجی و تا حصول یک محلول سبزرنگ ادامه یافت. سپس حجم محلول با استون، به ۲۰ میلی‌لیتر رسید. آنگاه، جذب محلول به وسیله دستگاه اسپکتروفوتومتر در طول موج‌های ۶۴۵ و ۶۶۳ نانومتر ثبت گردید (Arnon, 1949) و در نهایت به منظور محاسبه محتوای کلروفیل *a* و *b* از رابطه‌های ۱ و ۲ استفاده شد.

$$\text{رابطه ۱: } a \text{ (mg/g) کلروفیل} = [V / (1000 \times W)] [D \text{ (در ۶۴۵ نانومتر)} - 2/69 D \text{ (در ۶۶۳ نانومتر)}] \quad 12/7$$

$$\text{رابطه ۲: } b \text{ (mg/g) کلروفیل} = [V / (1000 \times W)] [D \text{ (در ۶۶۳ نانومتر)} - 4/68 D \text{ (در ۶۴۵ نانومتر)}] \quad 22/9$$

در این رابطه‌ها، D = غلظت نوری؛ V = حجم نهایی استون ۸۰٪ (۲۰ میلی‌لیتر)؛ W = وزن تر نمونه بر حسب گرم (۰/۲ گرم) می‌باشد. تجزیه واریانس داده‌ها با نرم‌افزار آماری SAS 9.1 و مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون آماری کمترین اختلاف معنی‌دار (LSD) در سطح پنج درصد انجام گرفت.

نتایج و بحث

براساس نتایج جدول تجزیه واریانس، اثر شوری بر محتوای کلروفیل *b*، ارتفاع گیاه و میزان فنل کل در سطح ۱ درصد و بر

میزان فلاونوئید کل، در سطح ۵ درصد معنی دار بود. اثر اسید هیومیک بر ارتفاع گیاه در سطح ۱ درصد و بر میزان فنل کل، در سطح ۵ درصد معنی دار بود. اثر سیلیکون بر وزن تر و خشک گل، ارتفاع گیاه و قطر کاپیتول، در سطح ۱ درصد و بر محتوای کلروفیل b ، در سطح ۵ درصد معنی دار بود. اثر دو عامل شوری $\times$ هیومیک، شوری $\times$ سیلیکون و هیومیک $\times$ سیلیکون و همچنین اثر سه عامل شوری $\times$ هیومیک $\times$ سیلیکون بر صفات محتوای کلروفیل a ، کلروفیل b ، وزن تر و خشک گل، ارتفاع گیاه، قطر کاپیتول، میزان فنل و فلاونوئید کل، از نظر آماری در سطح ۱ درصد معنی دار بود (جدول ۲).

جدول ۲ - تجزیه واریانس تأثیر محلول پاشی اسید هیومیک و سیلیکون بر برخی صفات کمی و کیفی بابونه تحت تنش شوری

Table 2- Variance analysis of humic acid and silicon foliar application effect on some quantitative and qualitative traits of *Matricaria chamomilla* L. under salinity stress

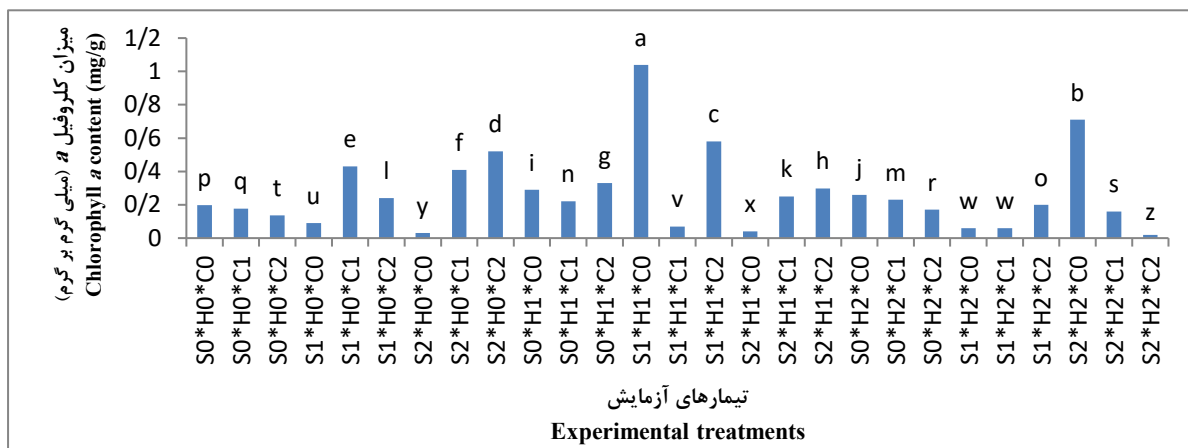
(Means of squares) میانگین مربعات								درجه آزادی	منابع تغییرات
فلاونوئید کل Total flavonoid	فنل کل Total phenol	قطر کاپیتول Capitulum diameter	ارتفاع گیاه Plant height	وزن خشک گل Flower dry weight	وزن تر گل Flower fresh weight	کلروفیل b Chlorophyll b	کلروفیل a Chlorophyll a	DF	Source of variations
40.78*	12.48**	0.76 ^{ns}	84.70**	0.00012 ^{ns}	0.0011 ^{ns}	0.1013**	0.075 ^{ns}	2	شوری Salinity
15.07 ^{ns}	11.31*	0.53 ^{ns}	139.59**	0.00007 ^{ns}	0.0006 ^{ns}	0.0331 ^{ns}	0.15 ^{ns}	2	اسید هیومیک Humic acid
5.20 ^{ns}	1.12 ^{ns}	3.91**	177.81**	0.00071**	0.0064**	0.0590*	0.073 ^{ns}	2	سیلیکون Silicon
21.50**	7.79**	2.02**	77.50**	0.00014**	0.0012**	0.071**	0.17**	8	شوری $\times$ اسید هیومیک Salinity $\times$ Humic acid
55.71**	9.71**	1.40**	81.22**	0.00035**	0.0032**	0.052**	0.06**	8	شوری $\times$ سیلیکون Salinity $\times$ Silicon
42.19**	3.93**	1.50**	110.36**	0.00025**	0.0023**	0.046**	0.13**	8	اسید هیومیک $\times$ سیلیکون Humic acid $\times$ Silicon
40.76**	6.63**	1.29**	69.13**	0.00019**	0.0017**	0.057**	0.16**	26	شوری $\times$ اسید هیومیک $\times$ سیلیکون $\times$ Humic acid $\times$ Silicon
12.67	2.37	0.31	14.18	0.00006	0.0005	0.015	0.049	74	خطا Error
17.90	15.34	8.33	12.49	21.15	23.15	24.66	24.16		ضریب تغییرات (درصد) C.V. (%)

* : معنی دار بودن در سطح احتمال ۵ درصد ** : معنی دار بودن در سطح احتمال ۱ درصد ns : غیر معنی دار

*: significant at P<0.05 **: significant at P<0.01 ns: not significant

بالاترین میزان کلروفیل a (۱/۰۴ میلی گرم بر گرم) و کلروفیل b (۰/۵۵ میلی گرم بر گرم) در شوری ۵۰ میلی مولار و با کاربرد ۰/۵ گرم در لیتر اسید هیومیک و بدون کاربرد سیلیکون به دست آمد (شکل ۱ و ۲). افزایش غلظت اسید هیومیک به ۱/۵ گرم در لیتر، در سطح شوری ۵۰ میلی مولار باعث کاهش میزان کلروفیل a و b گردید. این موضوع نشان می دهد که اثربخشی اسید هیومیک در افزایش سطح کلروفیل، بسته به غلظت آن، می تواند متغیر باشد. میزان کلروفیل در گیاهان، یکی از فاکتورهای مهم تأثیرگذار بر فتوسنتز می باشد. گزارش شده است که با توجه به شدت تنش، طول دوره تنش و مرحله رشدی گیاه، تأثیر تنش بر هر کدام از مقادیر کلروفیل a ، b و کل، ممکن است متفاوت باشد (Meganid et al., 2015). در بررسی اثرات تنش شوری بر کاهو (*Lactuca sativa* L.) بومی اهواز و استفاده از اسید هیومیک با هدف کاهش اثرات شوری، نتایج حاکی از آن بود که با افزایش غلظت اسید هیومیک به مقدار ۳۰ میلی گرم در کیلوگرم، میزان کلروفیل افزایش یافت (Silavi and Eftekhari, 2015).

2016). کاربرد اسید هیومیک در گیاه فلفل (*Capsicum annuum* L.) تحت تنش شوری، سبب افزایش معنی‌دار کلروفیل شد (Bacilio *et al.*, 2016) که با نتایج مطالعه حاضر، همخوانی دارد.



شکل ۱- اثر محلول پاشی اسید هیومیک و سیلیکون بر میزان کلروفیل *a* بابونه تحت تنش شوری

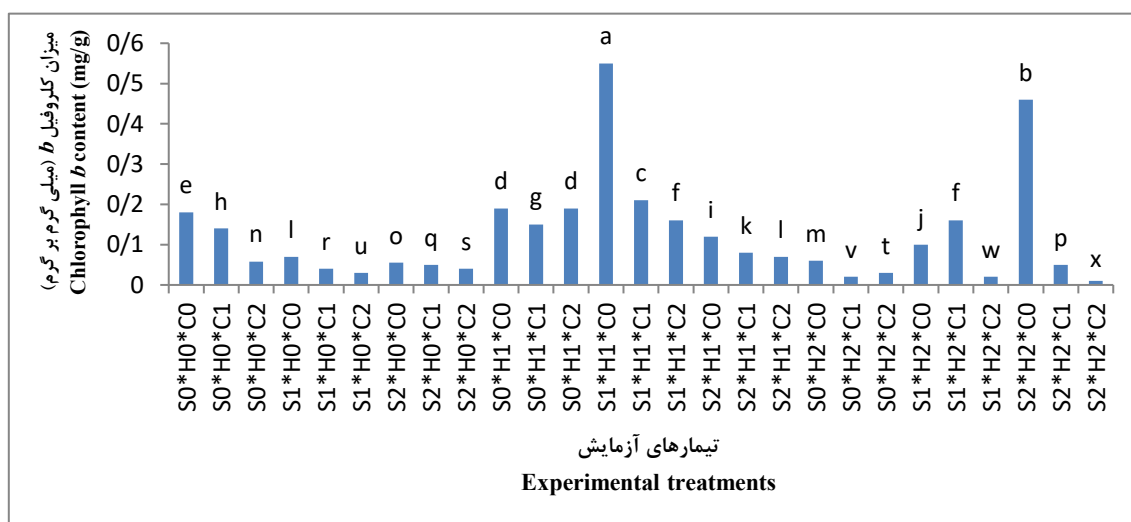
حروف مشابه، نشان‌دهنده عدم اختلاف معنی‌دار در سطح ۵ درصد با استفاده از آزمون LSD است.

S0: شوری صفر؛ S1: شوری ۵۰ میلی‌مولار؛ S2: شوری ۱۰۰ میلی‌مولار؛ H0: اسید هیومیک صفر؛ H1: اسید هیومیک ۰/۵ گرم در لیتر؛ H2: اسید هیومیک ۱/۵ گرم در لیتر؛ C0: سیلیکون صفر؛ C1: سیلیکون ۱/۵ میلی‌مولار؛ C2: سیلیکون ۳ میلی‌مولار

Figure 1- Effect of humic acid and silicon foliar application on chlorophyll *a* of *Matricaria chamomilla* L. under salinity stress

Similar letters indicate no significant difference at the 5% level using the LSD test.

S0: Salinity 0; S1 (Salinity 50 mM); S2 (Salinity 100 mM); H0: Humic acid 0; H1: Humic acid 0.5 g/L; H2: Humic acid 1.5 g/L; C0: Silicon 0; C1: Silicon 1.5 mM; C2: Silicon 3 mM



شکل ۲- اثر محلول پاشی اسید هیومیک و سیلیکون بر میزان کلروفیل *b* بابونه تحت تنش شوری

حروف مشابه، نشان‌دهنده عدم اختلاف معنی‌دار در سطح ۵ درصد با استفاده از آزمون LSD است.

S0: شوری صفر؛ S1: شوری ۵۰ میلی‌مولار؛ S2: شوری ۱۰۰ میلی‌مولار؛ H0: اسید هیومیک صفر؛ H1: اسید هیومیک ۰/۵ گرم در لیتر؛ H2: اسید هیومیک ۱/۵ گرم در لیتر؛ C0: سیلیکون صفر؛ C1: سیلیکون ۱/۵ میلی‌مولار؛ C2: سیلیکون ۳ میلی‌مولار

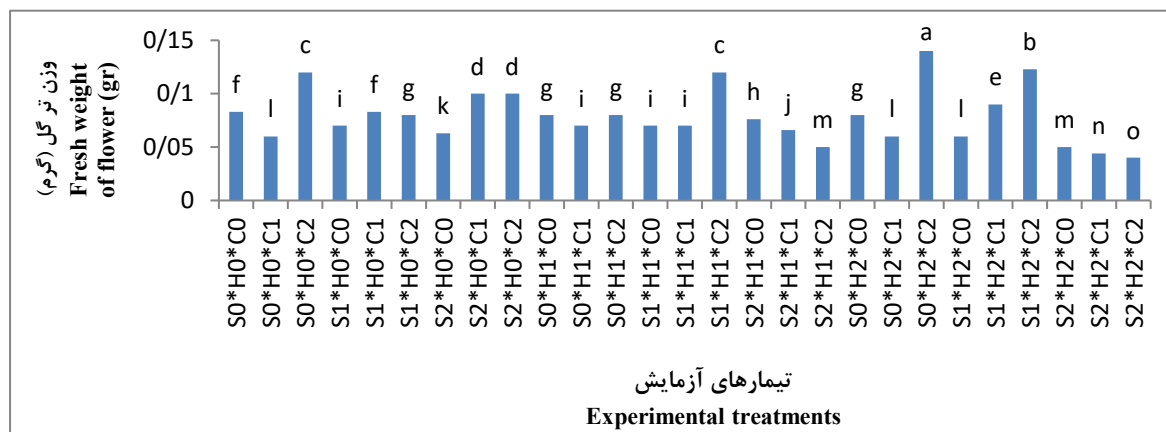
Figure 2- Effect of humic acid and silicon foliar application on chlorophyll *b* of *Matricaria chamomilla* L. under salinity stress

Similar letters indicate no significant difference at the 5% level using the LSD test.

S0: Salinity 0; S1 (Salinity 50 mM); S2 (Salinity 100 mM); H0: Humic acid 0; H1: Humic acid 0.5 g/L; H2: Humic acid 1.5 g/L; C0: Silicon 0; C1: Silicon 1.5 mM; C2: Silicon 3 mM

همان گونه که در شکل ۳ مشاهده می شود، بالاترین وزن تر گل (۰/۱۴ گرم) در بالاترین سطح اسید هیومیک و سیلیکون و بدون تنش شوری ایجاد شد. بالاترین وزن خشک گل (۰/۰۶ گرم) نیز در همین تیمار به دست آمد (شکل ۴). هرچند استفاده از اسید هیومیک و سیلیکون در سطح شوری ۵۰ میلی مولار نیز توانست وزن گل مناسبی تولید کند؛ به طوری که میزان کاهش وزن تر گل در سطح شوری ۵۰ میلی مولار نسبت به تیمار بدون شوری، فقط ۱۴/۲۸ درصد بود. اگرچه در بالاترین سطح شوری (۱۰۰ میلی مولار)، کاربرد اسید هیومیک و سیلیکون نتوانست از کاهش وزن تر و خشک گل جلوگیری کند. *Mohammed et al.* (2019) گزارش کردند که کاربرد بالاترین سطح اسید هیومیک (۳ لیتر در هکتار)، باعث افزایش وزن تر و خشک گل در بابونه (*Matricaria chamomilla* L.) گردید (*Mohammed et al.*, 2019). مطالعات نشان داده اند که استفاده از سیلیکون می تواند به طور قابل توجهی آسیب ناشی از شوری را کاهش دهد (*Liang et al.*, 2005; *Yan et al.*, 2018). به دلیل نقش مثبت سیلیکون در مکانیسم هایی مانند رسوب یون های سدیم (*Zhu et al.*, 2019)، کاهش جذب سدیم، افزایش جذب پتاسیم (*Liang et al.*, 2005) و افزایش انتخاب پتاسیم نسبت به سدیم (*Kim et al.*, 2017)، کاربرد سیلیکون در جهت افزایش تحمل به شوری پیشنهاد شده است. تأثیر سیلیکون در جذب و انتقال عناصر مغذی، می تواند از طریق دو مکانیسم صورت گیرد: مکانیسم اول، رسوب سیلیکون در دیواره سلولی که می تواند جذب آپوپلاستی برخی از عناصر از طریق ریشه و کاهش انتقال آنها در جریان تعرق را کاهش دهد (*Mali and Aery*, 2008)؛ در مکانیسم دوم، سیلیکون می تواند عملکرد و یکپارچگی غشای سلولی را بهبود بخشد و باعث افزایش جذب و انتقال عناصر غذایی شود (*Zhu et al.*, 2019). در مطالعه حاضر، بیشترین ارتفاع گیاه بابونه (۴۱ سانتی متر) با کاربرد ۰/۵ گرم در لیتر اسید هیومیک و ۳ میلی مولار سیلیکون در شوری ۵۰ میلی مولار به دست آمد (شکل ۵). بدین ترتیب، استفاده از اسید هیومیک و سیلیکون، تا حدودی در کاهش آثار مخرب شوری نقش داشتند. کاهش ارتفاع گیاه به دلیل تنش شوری در گلرنگ (*Carthamus tinctorius* L.) (*Gengmao et al.*, 2015) و گندم (*Triticum aestivum* L.) (*Bybordi*, 2014) گزارش شده است؛ با این حال، استفاده از سیلیکون، اثرات منفی تنش شوری را جبران کرد و ارتفاع گیاه با افزایش غلظت سیلیکون در مقایسه با گیاهان تیمار نشده، بهبود یافت. اثر تسریع کنندگی مواد هیومیکی روی رشد ساقه، به علت تأثیر بر فعالیت H^+ -ATPase ریشه و توزیع نیتрат ریشه در ساقه بوده که به نوبه خود، منجر به تغییرات در توزیع سایتوکینین ها، پلی آمین ها و ATP می شود؛ بنابراین روی رشد ساقه اثر دارد (*Rubio et al.*, 2009). براساس نتایج به دست آمده، بیشترین قطر کاپیتول (۸/۲۸ میلی متر) در شوری ۵۰ میلی مولار و با کاربرد ۰/۵ گرم در لیتر اسید هیومیک و ۳ میلی مولار سیلیکون تولید شد (شکل ۶). چنان که مشاهده می شود، اسید هیومیک و سیلیکون نقش مهمی در افزایش قطر کاپیتول در این سطح شوری داشتند. هرچند، کاربرد همین غلظت های اسید هیومیک و سیلیکون در سطح شوری ۱۰۰ میلی مولار تأثیر قابل توجهی بر قطر کاپیتول نداشت. می توان نتیجه گرفت که اثربخشی اسید هیومیک و سیلیکون، تنها در برخی سطوح شوری قابل مشاهده است. نتایج مطالعه *Hussain et al.* (2018) نشان داد که کاربرد سیلیکون در شرایط تنش شوری و سدیمی در

آفتابگردان (*Helianthus annuus* L.)، باعث افزایش ۲۲ تا ۳۰ درصدی قطر طبق گردید (Hussain *et al.*, 2018). کاربرد ۳ لیتر در هکتار اسید هیومیک در شرایط نیتروژن کافی، باعث افزایش معنی‌دار قطر طبق در آفتابگردان (*Helianthus annuus*) شد (Tadayyon *et al.*, 2021).

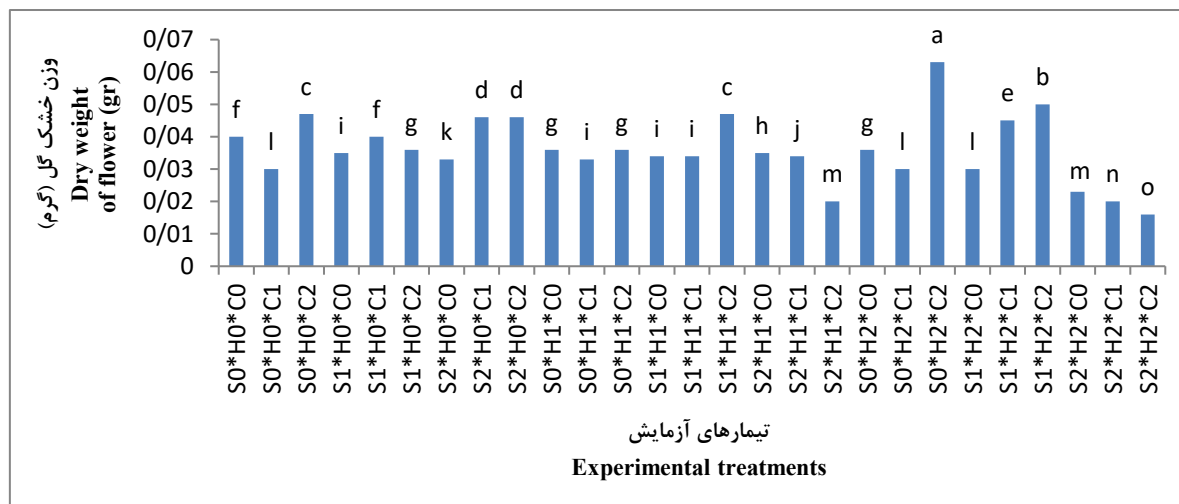


شکل ۳- اثر محلول پاشی اسید هیومیک و سیلیکون بر وزن تر گل بابونه تحت تنش شوری
حروف مشابه، نشان‌دهنده عدم اختلاف معنی‌دار در سطح ۵ درصد با استفاده از آزمون LSD است.
S0: شوری صفر؛ S1: شوری ۵۰ میلی‌مولار؛ S2: شوری ۱۰۰ میلی‌مولار؛ H0: اسید هیومیک صفر؛ H1: اسید هیومیک ۰/۵ گرم در لیتر؛ H2: اسید هیومیک ۱/۵ گرم در لیتر؛ C0: سیلیکون صفر؛ C1: سیلیکون ۱/۵ میلی‌مولار؛ C2: سیلیکون ۳ میلی‌مولار

Figure 3- Effect of humic acid and silicon foliar application on flower fresh weight of *Matricaria chamomilla* L. under salinity stress

Similar letters indicate no significant difference at the 5% level using the LSD test.

S0: Salinity 0; S1 (Salinity 50 mM); S2 (Salinity 100 mM); H0: Humic acid 0; H1: Humic acid 0.5 g/L; H2: Humic acid 1.5 g/L; C0: Silicon 0; C1: Silicon 1.5 mM; C2: Silicon 3 mM

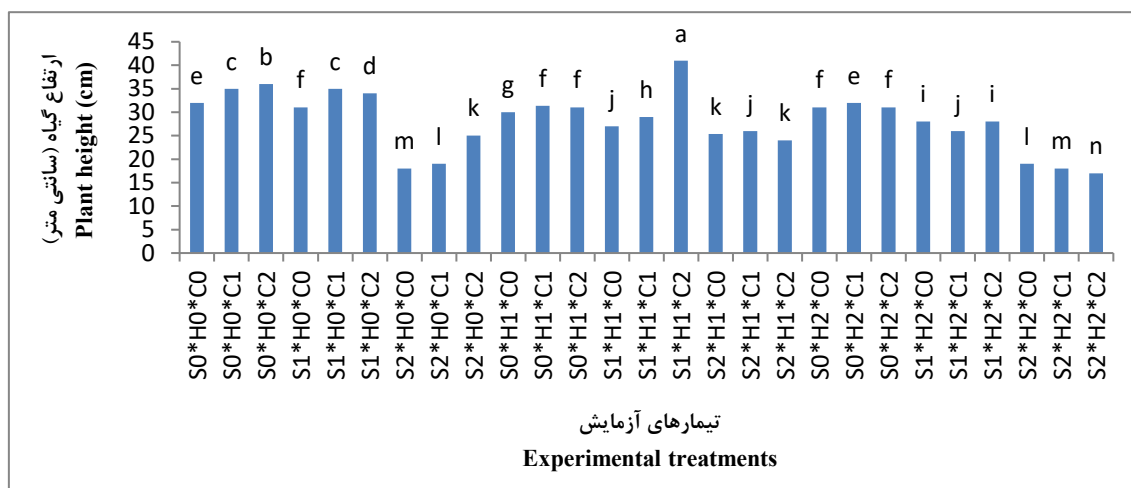


شکل ۴- اثر محلول پاشی اسید هیومیک و سیلیکون بر وزن خشک گل بابونه تحت تنش شوری
حروف مشابه، نشان‌دهنده عدم اختلاف معنی‌دار در سطح ۵ درصد با استفاده از آزمون LSD است.
S0: شوری صفر؛ S1: شوری ۵۰ میلی‌مولار؛ S2: شوری ۱۰۰ میلی‌مولار؛ H0: اسید هیومیک صفر؛ H1: اسید هیومیک ۰/۵ گرم در لیتر؛ H2: اسید هیومیک ۱/۵ گرم در لیتر؛ C0: سیلیکون صفر؛ C1: سیلیکون ۱/۵ میلی‌مولار؛ C2: سیلیکون ۳ میلی‌مولار

Figure 4- Effect of humic acid and silicon foliar application on flower dry weight of *Matricaria chamomilla* L. under salinity stress

Similar letters indicate no significant difference at the 5% level using the LSD test.

S0: Salinity 0; S1 (Salinity 50 mM); S2 (Salinity 100 mM); H0: Humic acid 0; H1: Humic acid 0.5 g/L; H2: Humic acid 1.5 g/L; C0: Silicon 0; C1: Silicon 1.5 mM; C2: Silicon 3 mM



شکل ۵- اثر محلول پاشی اسید هیومیک و سیلیکون بر ارتفاع بابونه تحت تنش شوری

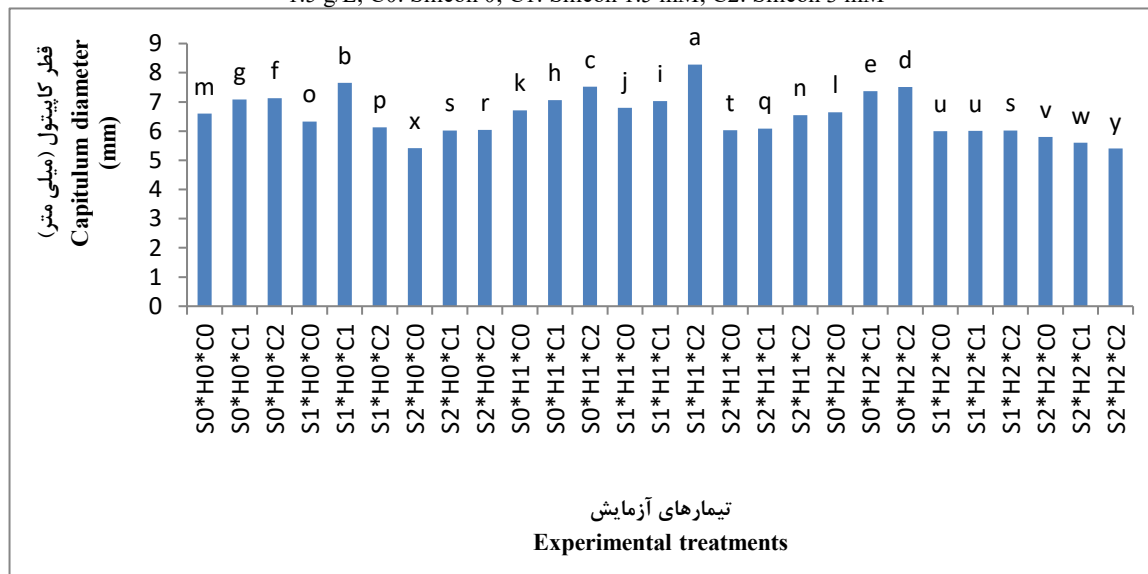
حروف مشابه، نشان دهنده عدم اختلاف معنی دار در سطح ۵ درصد با استفاده از آزمون LSD است.

S0: شوری صفر؛ S1: شوری ۵۰ میلی مولار؛ S2: شوری ۱۰۰ میلی مولار؛ H0: اسید هیومیک صفر؛ H1: اسید هیومیک ۰/۵ گرم در لیتر؛ H2: اسید هیومیک ۱/۵ گرم در لیتر؛ C0: سیلیکون صفر؛ C1: سیلیکون ۱/۵ میلی مولار؛ C2: سیلیکون ۳ میلی مولار

Figure 5- Effect of humic acid and silicon foliar application on height of *Matricaria chamomilla* L. under salinity stress

Similar letters indicate no significant difference at the 5% level using the LSD test.

S0: Salinity 0; S1 (Salinity 50 mM); S2 (Salinity 100 mM); H0: Humic acid 0; H1: Humic acid 0.5 g/L; H2: Humic acid 1.5 g/L; C0: Silicon 0; C1: Silicon 1.5 mM; C2: Silicon 3 mM



شکل ۶- اثر محلول پاشی اسید هیومیک و سیلیکون بر قطر کاپیتول بابونه تحت تنش شوری

حروف مشابه، نشان دهنده عدم اختلاف معنی دار در سطح ۵ درصد با استفاده از آزمون LSD است.

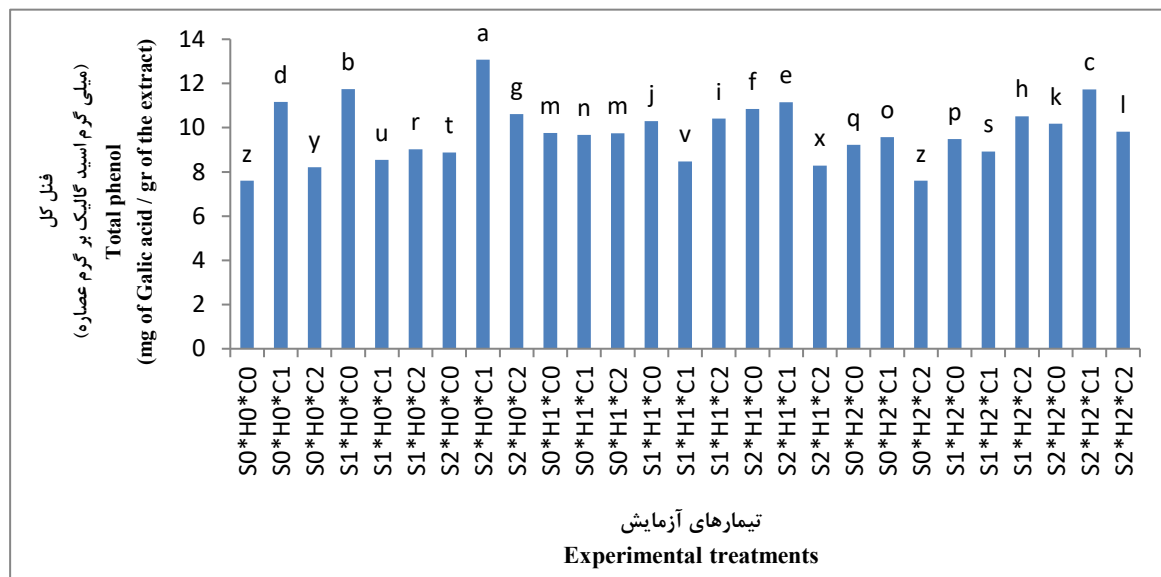
S0: شوری صفر؛ S1: شوری ۵۰ میلی مولار؛ S2: شوری ۱۰۰ میلی مولار؛ H0: اسید هیومیک صفر؛ H1: اسید هیومیک ۰/۵ گرم در لیتر؛ H2: اسید هیومیک ۱/۵ گرم در لیتر؛ C0: سیلیکون صفر؛ C1: سیلیکون ۱/۵ میلی مولار؛ C2: سیلیکون ۳ میلی مولار

Figure 6- Effect of humic acid and silicon foliar application on capitulum diameter of *Matricaria chamomilla* L. under salinity stress

Similar letters indicate no significant difference at the 5% level using the LSD test.

S0: Salinity 0; S1 (Salinity 50 mM); S2 (Salinity 100 mM); H0: Humic acid 0; H1: Humic acid 0.5 g/L; H2: Humic acid 1.5 g/L; C0: Silicon 0; C1: Silicon 1.5 mM; C2: Silicon 3 mM

در این مطالعه، بیشترین میزان فنل کل (۱۳/۰۷ میلی گرم اسید گالیک بر گرم عصاره) در سطح شوری ۱۰۰ میلی مولار، با استفاده از ۱/۵ میلی مولار سیلیکون و بدون کاربرد اسید هیومیک به دست آمد (شکل ۷). در حالی که در همین سطح شوری و سیلیکون و با افزایش اسید هیومیک به ۰/۵ گرم در لیتر، میزان فنل کل ۱۴/۶۹ درصد کاهش یافت و به ۱۱/۱۵ میلی گرم اسید گالیک بر گرم عصاره رسید. از آنجا که در شوری ۱۰۰ میلی مولار، استفاده از سطح بالاتر سیلیکون (۳ میلی مولار) باعث کاهش فنل کل گردید، به نظر می‌رسد که سطح غلظت سیلیکون، عامل تعیین‌کننده‌ای بوده و می‌تواند مسیرهای متابولیت‌های ثانویه را تحت تأثیر قرار دهد. در مطالعه‌ای روی گیاه بادرشبی (*Dracocephalum moldavica* L.)، کاربرد ۲۰۰ میلی گرم در لیتر اسید هیومیک، باعث کاهش ۵۶/۵ درصدی میزان فنل تحت تنش شوری ۱۰۰ میلی مولار گردید (Narimani et al., 2018). تولید ترکیبات فنلی تحت اثر شوری در گیاهان مختلف گزارش شده است. این ترکیبات، آنتی‌اکسیدان‌های نیرومندی در بافت‌های گیاهان تحت تنش هستند و این ویژگی به علت ساختار اسکلتی و گروه فنلی این متابولیت‌هاست. گروه‌های هیدروکسیل آزاد متصل به حلقه آروماتیک، توان جaro کردن رادیکال‌های آزاد را داشته؛ بدین ترتیب، آسیب‌های اکسیداتیو را کاهش می‌دهند و ساختارهای سلولی را از تأثیرات منفی شوری محافظت می‌کنند (Al-Amier and Craker, 2007). کاربرد ۳ میلی مولار سیلیکون به طور قابل توجهی، محتوای فنل کل را در اندام‌های هوایی ریحان (*Ocimum basilicum* L.) تحت تنش شوری ۱۰۰ میلی مولار افزایش داد (Robatjazi et al., 2020).



شکل ۷- اثر محلول پاشی اسید هیومیک و سیلیکون بر میزان فنل کل بابونه تحت تنش شوری

حروف مشابه، نشان‌دهنده عدم اختلاف معنی‌دار در سطح ۵ درصد با استفاده از آزمون LSD است.

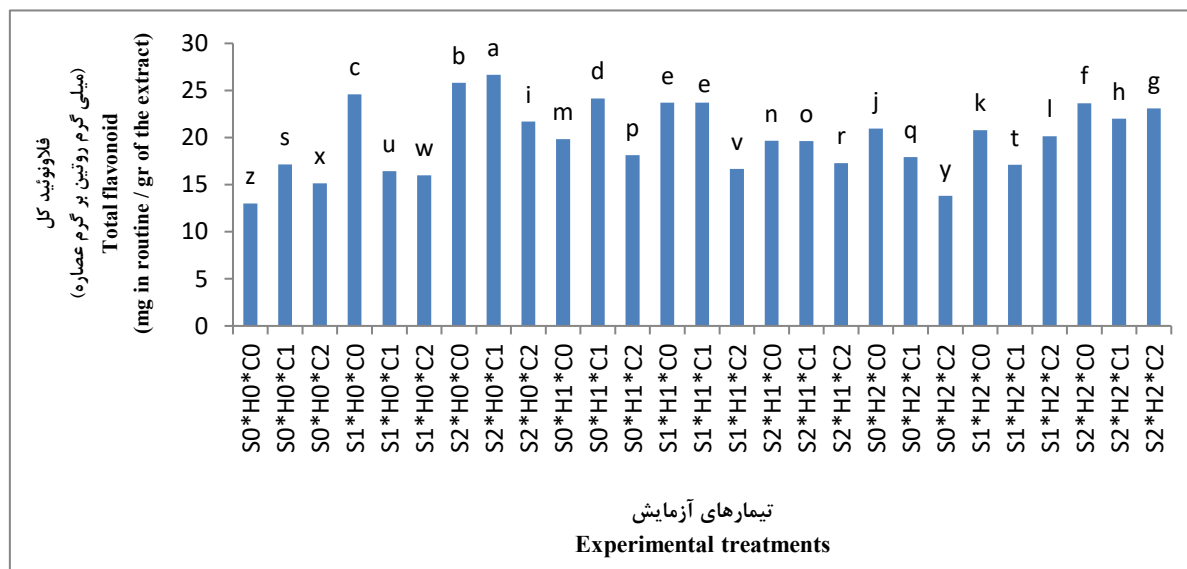
S0: شوری صفر؛ S1: شوری ۵۰ میلی مولار؛ S2: شوری ۱۰۰ میلی مولار؛ H0: اسید هیومیک صفر؛ H1: اسید هیومیک ۰/۵ گرم در لیتر؛ H2: اسید هیومیک ۱/۵ گرم در لیتر؛ C0: سیلیکون صفر؛ C1: سیلیکون ۱/۵ میلی مولار؛ C2: سیلیکون ۳ میلی مولار

Figure 7- Effect of humic acid and silicon foliar application on total phenol content of *Matricaria chamomilla* L. under salinity stress

Similar letters indicate no significant difference at the 5% level using the LSD test.

S0: Salinity 0; S1 (Salinity 50 mM); S2 (Salinity 100 mM); H0: Humic acid 0; H1: Humic acid 0.5 g/L; H2: Humic acid 1.5 g/L; C0: Silicon 0; C1: Silicon 1.5 mM; C2: Silicon 3 mM

بیشترین میزان فلاونوئید کل (۲۶/۶۶ میلی گرم روتین بر گرم عصاره) در سطح شوری ۱۰۰ میلی مولار، با استفاده از ۱/۵ میلی مولار سیلیکون و بدون کاربرد اسید هیومیک به دست آمد (شکل ۸). در حالی که در همین سطح شوری و سیلیکون و با کاربرد ۰/۵ گرم در لیتر اسید هیومیک، مقدار فلاونوئید کل، ۲۶/۴۰ درصد کاهش یافت و به ۱۹/۶۲ میلی گرم روتین بر گرم عصاره رسید. Narimani *et al.* (2018) نیز گزارش کردند که میزان فلاونوئید در گیاه بادرشبی (*Dracocephalum moldavica* L.)، با کاربرد ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی گرم در لیتر اسید هیومیک کاهش یافت (Narimani *et al.*, 2018). در مورد نقش سیلیکون در افزایش میزان فلاونوئید، Amiripour *et al.* (2021) گزارش کردند که بیشترین میزان فلاونوئید در گیاه گشنیز (*Coriandrum sativum* L.)، با کاربرد ۵۰ میلی گرم بر لیتر سیلیکون و در تنش شوری ۲۰۰ میلی مولار به دست آمد (Amiripour *et al.*, 2021). سیلیکون به دلیل نقشی که در بهبود تولید متابولیت‌های ثانویه مانند فنل و فلاونوئید کل دارد، می‌تواند گیاهان تحت تنش را از رادیکال‌های آزاد محافظت کند (Fatemi *et al.*, 2020).



شکل ۸ - اثر محلول پاشی اسید هیومیک و سیلیکون بر میزان فلاونوئید کل بابونه تحت تنش شوری

حروف مشابه، نشان‌دهنده عدم اختلاف معنی‌دار در سطح ۵ درصد با استفاده از آزمون LSD است.

S0: شوری صفر؛ S1: شوری ۵۰ میلی مولار؛ S2: شوری ۱۰۰ میلی مولار؛ H0: اسید هیومیک صفر؛ H1: اسید هیومیک ۰/۵ گرم در لیتر؛ H2: اسید هیومیک ۱/۵ گرم در لیتر؛ C0: سیلیکون صفر؛ C1: سیلیکون ۱/۵ میلی مولار؛ C2: سیلیکون ۳ میلی مولار

Figure 8- Effect of humic acid and silicon foliar application on total flavonoid content of *Matricaria chamomilla* L. under salinity stress

Similar letters indicate no significant difference at the 5% level using the LSD test.

S0: Salinity 0; S1 (Salinity 50 mM); S2 (Salinity 100 mM); H0: Humic acid 0; H1: Humic acid 0.5 g/L; H2: Humic acid 1.5 g/L; C0: Silicon 0; C1: Silicon 1.5 mM; C2: Silicon 3 mM

نتیجه‌گیری کلی

با توجه به نتایج این آزمایش، کاربرد اسید هیومیک و سیلیکون، اثرات مخرب تنش شوری را کاهش داد؛ به طوری که

بیشترین ارتفاع گیاه و قطر کاپیتول، با کاربرد ۰/۵ گرم در لیتر اسید هیومیک و بالاترین سطح سیلیکون (۳ میلی مولار) و شوری

۵۰ میلی مولار به دست آمد. درصد افزایش صفات مذکور، در مقایسه با تیمار فاقد هیومیک و سیلیکون در همین سطح شوری، نسبتاً قابل توجه بود. همچنین، بیشترین میزان فنل و فلاونوئید کل، در سطح شوری ۱۰۰ میلی مولار، ۱/۵ میلی مولار سیلیکون و بدون کاربرد اسید هیومیک تولید گردید. به نظر می‌رسد در راستای کاهش اثرات مخرب تنش شوری می‌توان از اسید هیومیک و سیلیکون استفاده نمود. بدین ترتیب، به طور همزمان هم از خاک‌های شور استفاده می‌گردد و هم عملکرد بالاتری حفظ خواهد گردید. پیشنهاد می‌گردد این موضوع در مطالعات مزرعه‌ای نیز در خاک‌های شور مورد بررسی قرار گیرد.

سپاسگزاری

از همکاری معاونت محترم پژوهشی دانشگاه بوعلی سینا که با اختصاص گرنت شماره ۴۰۳۳۶، مسیر تدوین این مقاله را هموار نمودند، قدردانی می‌گردد.

منابع

- Abdelaal, K.A.A., Mazrou, Y.S.A., & Hafez, Y.M. (2020). Silicon foliar application mitigates salt stress in sweet pepper plants by enhancing water status, photosynthesis, antioxidant enzyme activity and fruit yield. *Plants*, 9(6), Article 733, 1-15.
- Aghaei Joubani, K., Taei, N., Kanani, M.R., & Yazdani, M. (2015). Effect of salt stress on some physiological and biochemical parameters of two *Salvia* species. *Plant Process and Function*, 3(9), 85-96. [In Persian]
- Ahmad, P., Ahanger, M.A., Alam, P., Alyemeni, M.N., Wijaya, L., Ali, S., & Ashraf, M. (2019). Silicon (Si) supplementation alleviates NaCl toxicity in mung bean (*Vigna radiata* L.) through the modifications of physio-biochemical attributes and key antioxidant enzymes. *Journal of Plant Growth Regulation*, 38, 70-82.
- Al-Amier, H., & Craker, L.E. (2007). In-vitro selection for stress tolerant spearmint. In: Janick, J. and Whipkey A. (eds), *Issues in New Crops and New Uses*, Pp. 306-310, ASHS Press.
- Amiripour, A., Ghanbari Jahromi, M., Souri, M.K., & Mohammadi Torkashvand, A. (2021). Silicon stimulates physiochemical properties of coriander (*Coriandrum sativum* L.) to improve growth and yield under salt stress. *Journal of Medicinal Plants and By-products*, 2, 209-216.
- Arnon, D.I. (1949). Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenol oxidase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiology*, 24(1), 1-15.
- Asemeh, M., & Pourakbar, L. (2016). Effect of silica nanoparticles on some growth factors in saffron plant under salinity stress. Iranian Biology Congress (19th National Congress and 7th International Congress), University of Tabriz and Iranian Biology Society, Tabriz. [In Persian]
- Ashraf, M., & Harris, P.J.C. (2013). Photosynthesis under stressful environments: An overview. *Photosynthetica*, 51(2), 163-190.
- Bacilio, M., Moreno, M., & Bashan, Y. (2016). Mitigation of negative effects of progressive soil salinity gradients by application of humic acids and inoculation with *Pseudomonas stutzeri* in a salt-tolerant and a salt-susceptible pepper. *Applied Soil Ecology*, 107, 394-404.
- Bybordi, A. (2014). Interactive effects of silicon and potassium nitrate in improving salt tolerance of wheat. *Journal of Integrative Agriculture*, 13(9), 1889-1899.
- Fatemi, H., Esmail Pour, B., Rizwan, M. (2020). Foliar application of silicon nanoparticles affected the growth, vitamin C, flavonoid, and antioxidant enzyme activities of coriander (*Coriandrum sativum* L.) plants grown in lead (Pb)-spiked soil. *Environmental Science and Pollution Research*, 28, 1417-1425.
- Fauteux, F., Rémus-Borel, W., Menzies, J.G., & Bélanger, R.R. (2005). Silicon and plant disease resistance against pathogenic fungi. *FEMS Microbiology Letters*, Article 249, 1-6.
- Gengmao, Z., Yu, H., Xing, S., Shihui, L., Quanmei, S., & Changhai, W. (2015). Salinity stress increases secondary metabolites and enzyme activity in safflower. *Industrial Crops and Products*, 64, 175-181.

- Ghanavati, M., Houshmand, S., Zeinali, H., & Ebrahimpour, F. (2010).** Chemical composition of the essential oils of *Matricaria recutita* L. belonging to central and south parts of Iran. *Journal of Medicinal Plants*, 9(34), 102-108. [In Persian]
- Gülser, F., Sönmez, F., & Boysan Canal, S. (2010).** Effects of calcium nitrate and humic acid on pepper seedling growth under saline condition. *Journal of Environmental Biology*, 31(5), 873-876.
- Gutfinger, T. (1981).** Polyphenols in olive oils. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 58, 966-968.
- Güzel, Y., Güzelşemme, M., & Miski, M. (2015).** Ethnobotany of medicinal plants used in Antakya: A multicultural district in Hatay Province of Turkey. *Journal of Ethnopharmacology*, 174, 118-152.
- Hajiboland, R., Cherghvareh, L., & Dashtebani, F. (2017).** Effect of silicon supplementation on wheat plants under salt stress. *Journal of Plant Process and Function*, 5(18), 1-12.
- Hasanuzzaman, M., Nahar, K., & Fujita, M. (2013).** Plant response to salt stress and role of exogenous protectants to mitigate salt-induced damages. In: Ahmad, P., Azooz, M., Prasad, M. (eds), *Ecophysiology and Responses of Plants under Salt Stress*, Pp: 25-87, Springer, New York.
- Hashemi, A., Abdolzadeh, A., & Sadeghipour, H.R. (2010).** Beneficial effects of silicon nutrition in alleviating salinity stress in hydroponically grown canola, *Brassica napus* L. plants. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, 56, 244-253.
- Hurtado, A.C., Chiconato, D.A., Prado, R. de M., Sousa Junior, G. da S., Gratão, P.L., Felisberto, G., Viciedo, D.O., & Mathias dos Santos, D.M. (2020).** Different methods of silicon application attenuate salt stress in sorghum and sunflower by modifying the antioxidative defense mechanism. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 203, Article 110964, 1-11.
- Hussain, S.A., Farooq, M.A., Akhtar, J., & Saqib, Z.A. (2018).** Silicon-mediated growth and yield improvement of sunflower (*Helianthus annuus* L.) subjected to brackish water stress. *Acta Physiologiae Plantarum*, 40, 180.
- Kim, Y-H., Khan, A.L., Waqas, M., & Lee, I-J. (2017).** Silicon regulates antioxidant activities of crop plants under abiotic-induced oxidative stress: A review. *Frontiers in Plant Science*, 8, Article 510, 1-7.
- Liang, Y., Zhang, W., Chen, Q., & Ding, R. (2005).** Effects of silicon on H⁺-ATPase and H⁺-PPase activity, fatty acid composition and fluidity of tonoplast vesicles from roots of salt-stressed barley (*Hordeum vulgare* L.). *Environmental and Experimental Botany*, 53(1), 29-37.
- Mali, M., & Aery, N.C. (2008).** Influence of silicon on growth, relative water contents and uptake of silicon, calcium and potassium in wheat grown in nutrient solution. *Journal of Plant Nutrition*, 31(11), 1867-1876.
- Meganid, A.S., Al-Zahrani, H.S., El-Metwally, Selim, M.S. (2015).** Effect of humic acid application on growth and chlorophyll contents of common bean plants (*Phaseolus vulgaris* L.) under salinity stress conditions. *International Journal of Innovative Research in Science, Engineering and Technology*, 4(5), 2651-2660.
- Menale, B., De Castro, O., Di Iorio, E., Ranaldi, M., & Muoio, R. (2021).** Discovering the ethnobotanical traditions of the island of Procida (Campania, southern Italy). *Plant Biosystems - An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology*, 156(2), 450-468.
- Mikou, K., Rachiq, S., & Jarrar Oulidi, A. (2016).** Étude ethnobotanique des plantes médicinales et aromatiques utilisées dans la ville de Fès au Maroc. *Phytothérapie*, 14, 35-43.
- Ming, D.F., Pei, Z.F., Naeem, M.S., Gong, H.J., & Zhou, W.J. (2012).** Silicon alleviates PEG-induced water-deficit stress in upland rice seedlings by enhancing osmotic adjustment. *Journal of Agronomy and Crop Science*, 198(1), 14-26.
- Mohamed, W.H. (2012).** Effects of humic acid and calcium forms on dry weight and nutrient uptake of maize plant under saline condition. *Australian Journal of Basic and Applied Science*, 6(8), 597-604.
- Mohammed, A.E.M.E., Mewead, A.A.A., Gendy, A.S.H., & Abdelkader, M.A.I. (2019).** Influence of humic acid rates and application times on vegetative growth and yield components of chamomile (*Matricaria chamomilla* L.) plants grown under reclaimed sandy soil conditions. *Zagazig Journal of Agricultural Research*, 46(6B), 2171-2181.

- Mollazadeh, F., Ghanbari Jahromi, M., & Marashi, M. (2024).** Alleviating salinity stress in Chinese lantern (*Physalis alkekengi* L.) by improving the plants growth characteristics and yield using zinc nanoparticle. *Journal of Plant Process and Function*, 14(65), 191-209. [In Persian]
- Narimani, R., Moghaddam, M., Nemati, S.H., & Ghasemi Pirbaluti, A. (2018).** Evaluation of salinity adjusted by using humic acid and ascorbic acid in medicinal plant of moldavian balm (*Dracocephalum moldavica* L.). *Journal of Plant Research (Iranian Journal of Biology)*, 31(4), 927-938. [In Persian]
- Neves, J.M., Matos, C., Moutinho, C., Queiroz, G., & Gomes, L.R. (2009).** Ethnopharmacological notes about ancient uses of medicinal plants in Trás-os-Montes (northern of Portugal). *Journal of Ethnopharmacology*, 124(2), 270-283.
- Ouni, Y., Ghnaya, T., Montemurro, F., Abdelly, Ch., & Lakhdar, A. (2014).** The role of humic substances in mitigating the harmful effects of soil salinity and improve plant productivity. *International Journal of Plant Production*, 8(3), 353-374.
- Ozkan, G., Sagdic, O., Ekici, L., Ozturk, I., & Ozcan, M.M. (2007).** Phenolic compounds of *Origanum sipyleum* L. extract, and its antioxidant and antibacterial activities. *Journal of Food Lipids*, 14(2), 157-169.
- Petrakou, K., Iatrou, G., & Lamari, F.N. (2020).** Ethnopharmacological survey of medicinal plants traded in herbal markets in the Peloponnisos, Greece. *Journal of Herbal Medicine*, 19, Article 100305.
- Petronilho, S., Maraschin, M., Coimbra, M.A., & Rocha, S.M. (2012).** In vitro and in vivo studies of natural products: A challenge for their valuation. The case study of chamomile (*Matricaria recutita* L.). *Industrial Crops and Products*, 40, 1-12.
- Pizzeghello, D., Francioso, O., Ertani, A., Muscolo, A., & Nardi, S. (2013).** Isopentenyladenosine and cytokinin-like activity of different humic substances. *Journal of Geochemical Exploration*, 129, 70-75.
- Rady, M.M. (2012).** A novel organo-mineral fertilizer can mitigate salinity stress effects for tomato production on reclaimed saline soil. *South African Journal of Botany*, 81, 8-14.
- Raj, H., & Thakral, K.K. (2008).** Effect of chemical fertilizers on growth, yield and quality of fennel (*Foeniculum vulgare* Miller). *Journal of Spices and Aromatic Crops (JOSAC)*, 17(2), 134-139.
- Rizwan, M., Ali, S., Ibrahim, M., Farid, M., Adrees, M., Bharwana, S.A., Zia-ur-Rehman, M., Qayyum, M.F., & Abbas, F. (2015).** Mechanisms of silicon-mediated alleviation of drought and salt stress in plants: A review. *Environmental Science and Pollution Research*, 22(20), 15416-15431.
- Robotjazi, R., Roshandel, P., & Hooshmand, S. (2020).** Benefits of silicon nutrition on growth, physiological and phytochemical attributes of basil upon salinity stress. *International Journal of Horticultural Science and Technology*, 7(1), 37-50.
- Rubio, V., Bustos, R., Irigoyen, M.L., Cardona-López, X., Rojas-Triana, M., & Paz-Ares, J. (2009).** Plant hormones and nutrient signaling. *Plant Molecular Biology*, 69(4), 361-373.
- Sakr, N. (2017).** The Role of Silicon (Si) in increasing plant resistance against insect pests; Review article. *Acta Phytopathologica et Entomologica Hungarica*, 52(2), 185-204.
- Samavat, S., & Malakooti, M.J. (2006).** The necessity of using organic acids (humic acid and fulvic acid) in increasing the quantity and quality of agricultural products. Technical bulletin No. 463, Soil and Water Research Institute, Agricultural Research and Education Organization, Ministry of Agricultural - Jihad. [In Persian]
- Sarker, U., & Oba, S. (2020).** The response of salinity stress-induced *A. tricolor* to growth, anatomy, physiology, non-enzymatic and enzymatic antioxidants. *Frontiers in Plant Science*, 11, Article 559876.
- Silavi, B., & Eftekhari, S.A. (2016).** Studying the effects of irrigation water salinity on leaf chlorophyll content and nutrient uptake of native Ahvaz lettuce by using different amounts of humic acid. 2nd National Conference on New Findings in Agricultural Sciences, Environment and Sustainable Natural Resources, Kerman, Jiroft. [In Persian]
- Silva, O.N., Lobato, A.K.S., Ávila, F.W., Costa, R.C.L., Oliveira Neto, C.F., Santos Filho, B.G., Martins Filho, A.P., Lemos, R.P., Pinho, J.M., Medeiros, M.B.C.L., Cardoso, M.S., & Andrade, I.P. (2012).** Silicon-induced increase in chlorophyll is modulated by the leaf water potential in two water-deficient tomato cultivars. *Plant, Soil and Environment*, 58(11), 481-486.

Tadayyon, M.R., Tadayyon, A., & Esmaili, S. (2021). Effect of humic acid on growth and yield indices of sunflower (*Helianthus annuus*) in a saline soil. *Journal of Crop Production and Processing*, 11(3), 101-110. [In Persian]

Tester, M., & Davenport, R. (2003). Na⁺ tolerance and Na⁺ transport in higher plants. *Annals of Botany*, 91(5), 503-527.

Torabi, F., Majd, A., & Enteshari, S. (2015). The effect of silicon on alleviation of salt stress in borage (*Borago officinalis* L.). *Soil Science and Plant Nutrition*, 61(5), 788-798.

Tripathi, D.K., Singh, S., Singh, V.P., Prasad, S.M., Dubey, N.K., & Chauhan, D.K. (2017). Silicon nanoparticles more effectively alleviated UV-B stress than silicon in wheat (*Triticum aestivum*) seedlings. *Plant Physiology and Biochemistry*, 110, 70-81.

Veisi, Z., Ghorbanpour, M., & Akramian, M. (2023). The effects of silicon nanoparticles on morpho-physiological and biochemical parameters of *Calendula officinalis* L. plants under salinity stress in hydroponic culture conditions. *Plant Process and Function*, 11(47), 211-229. [In Persian]

Wang, D., Hou, L., Zhang, L., & Liu, P. (2021). The mechanisms of silicon on maintaining water balance under water deficit stress. *Physiologia Plantarum*, 173(3), 1253-1262.

Yan, G-C., Miroslav, N., Ye, M-J., Xiao, Z-X., & Liang, Y-C. (2018). Silicon acquisition and accumulation in plant and its significance for agriculture. *Journal of Integrative Agriculture*, 17(10), 2138-2150.

Yin, L., Wang, S., Tanaka, K., Fujihara, S., Itai, A., Den, X., & Zhang, S. (2016). Silicon-mediated changes in polyamines participate in silicon-induced salt tolerance in *Sorghum bicolor* L. *Plant, Cell and Environment*, 39(2), 245-258.

Yoo, K.M., Lee, C.H., Lee, H., Moon, B., & Lee, C.Y. (2008). Relative antioxidant and cytoprotective activities of common herbs. *Food Chemistry*, 106, 929-936.

Zhu, Y-X., Gong, H-J., & Yin, J-L. (2019). Role of silicon in mediating salt tolerance in plants: A review. *Plants*, 8, Article 147, 1-22.

Živković, J., Ilić, M., Šavikin, K., Zdunić, G., Ilić, A., & Stojković, D. (2020). Traditional use of medicinal plants in south-eastern Serbia (Pčinja District): Ethnopharmacological investigation on the current status and comparison with half a century old data. *Frontiers in Pharmacology*, 11, Article 1020.

The effect of melatonin foliar spraying on some phytochemical and antioxidant indices of safflower petals (*Carthamus tinctorius*)

Pages
63-75

F. Balouchi¹ and Gh. Sharifi^{2*}

1&2) Department of Agricultural Biotechnology, ShahidBahonar University of Kerman, Kerman, Iran.

*Corresponding author Email: sharifi@uk.ac.ir

Received date: 2025.10.04

Accepted date: 2026.01.10

Abstract

Melatonin is known as one of the endogenous cellular regulators that can improve the quantity and quality of the product by affecting the growth and development processes of plants. Considering the importance of secondary plant compounds and their role in physiological characteristics, the aim of this study was to investigate the effects of foliar spraying of melatonin on the contents of total anthocyanins, total phenolics, total flavonoids, and free radical scavenging capacity of safflower petals (*Carthamus tinctorius*). A field study was started in March 2025 in Shahdad region, Kerman province. Foliar spraying was performed on safflower plants twenty days after planting and at the stage of capitulum completion and before the opening of flowers. Experimental treatments included distilled water (control), melatonin at a concentration of 0.25 mM, and melatonin at a concentration of 0.5 mM. Data analysis was performed using a completely randomized design with three replications. The results showed that foliar application of melatonin at concentrations of 0.25 and 0.5 mM significantly increased the levels of various compounds measured in safflower petals ($P<0.001$). The highest levels of these compounds were observed in samples treated with 0.5 mM melatonin, which was significantly higher than the control. Also, samples treated with 0.25 mM melatonin increased the contents of each compound compared to the control ($P<0.001$). Based on the findings of this study, foliar application of melatonin at a concentration of 0.5 mM is recommended as an effective method for increasing phenolic, flavonoid, anthocyanin compounds and antioxidant capacity in safflower petals.

Keywords: phenol, flavonoid, anthocyanin, safflower and petals.

اثر محلول پاشی ملاتونین بر برخی شاخص‌های فیتوشیمیایی و آنتی‌اکسیدانی گلبرگ گیاه گلرنگ (*Carthamus tinctorius*)

شماره صفحات

۶۳-۷۵

فائزه بلوچی ۱ و غلامرضا شریفی ۲*

۱ و ۲) گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشگاه شهید باهنر کرمان، کرمان، ایران.

*نویسنده مسئول: sharifi@uk.ac.ir

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۱۰/۲۰

تاریخ دریافت: ۱۴۰۴/۰۷/۱۲

چکیده

ملاتونین به عنوان یکی از تنظیم‌کننده‌های درون‌زاد سلولی شناخته می‌شود که با تأثیر بر فرآیندهای رشد و نمو گیاهان می‌تواند موجب بهبود کمیت و کیفیت محصول شود. با توجه به اهمیت ترکیبات ثانویه گیاهی و نقش آن‌ها در ویژگی‌های فیزیولوژیکی، هدف از این پژوهش بررسی اثر محلول پاشی برگ‌ی ملاتونین بر میزان آنتوسیانین کل، فنول کل، فلاونوئیدکل، ظرفیت مهار رادیکال‌های آزاد گلبرگ‌های گلرنگ (*Carthamus tinctorius*) بود. مطالعه مزرعه‌ای در فروردین‌ماه سال ۱۴۰۴ در منطقه شهداد، استان کرمان آغاز شد. عملیات محلول پاشی برگ‌ی بر روی گیاهان گلرنگ، بیست روز پس از کاشت و در مرحله تکمیل غوزه‌ها (قبل از باز شدن گل‌ها) انجام شد. تیمارهای آزمایشی شامل آب مقطر (شاهد)، ملاتونین با غلظت ۰/۲۵ میلی‌مولار و ملاتونین با غلظت ۰/۵ میلی‌مولار بودند. تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از طرح کاملاً تصادفی و در سه تکرار صورت گرفت. نتایج نشان داد که محلول پاشی برگ‌ی ملاتونین در غلظت‌های ۰/۲۵ و ۰/۵ میلی‌مولار موجب افزایش معنی‌دار در مقادیر ترکیبات مختلف سنجش شده در گلبرگ‌های گیاه گلرنگ شد ($P < 0.001$). بیشترین میزان این ترکیبات در نمونه‌های تیمار شده با ۰/۵ میلی‌مولار ملاتونین مشاهده شد که افزایش معنی‌داری نسبت به شاهد داشت. همچنین نمونه‌های تیمار شده با ملاتونین ۰/۲۵ میلی‌مولار هم مقادیر هر یک از ترکیبات را نسبت به شاهد افزایش نشان داده‌اند ($P < 0.001$). بر اساس یافته‌های این تحقیق، محلول پاشی با ملاتونین در غلظت ۰/۵ میلی‌مولار به عنوان روشی مؤثر برای افزایش ترکیبات فنولی، فلاونوئیدی، آنتوسیانینی و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی در گلبرگ‌های گیاه گلرنگ پیشنهاد می‌شود.

واژه‌های کلیدی: فنل، فلاونوئید، آنتوسیانین، گلرنگ و گلبرگ.

مقدمه

گلرنگ با نام علمی (*Carthamus tinctorius* L.) گیاهی از تیره کاسنیان است که به صورت بوته‌ای قائم رشد می‌کند. مطالعات ژنتیکی روی جمعیت‌های مختلف گلرنگ در ایران نیز تنوع زیاد در صفات دانه و روغن آن را نشان داده‌اند، که نشانگر قدمت و تنوع ژنتیکی این گونه در کشور است (Panahi, and Ghorbanzadeh Neghab, 2013). گیاه گلرنگ در ایران با نام‌های محلی گوناگونی از جمله گل خشت، کافشه، کاجیره و کاژیره شناخته می‌شود و در زبان انگلیسی آن را Safflower می‌نامند (Özçinar, 2021). این گیاه از دیرباز در طب سنتی چین جایگاه ویژه‌ای داشته و به دلیل ویژگی‌های دارویی خاص خود، بیش از دو هزار و پانصد سال است که مورد استفاده قرار می‌گیرد (Li et al., 2013). گل‌های این گیاه دارای ترکیبات رنگی از نوع کالکون‌ها هستند که به رنگ‌های زرد و قرمز مشاهده می‌شوند؛ از جمله سافلاور زرد A و B، سافلامین C، پریکارتامین و کارتامین (Cho and Hahn, 2000). این ترکیبات در واقع اصلی‌ترین فلاونوئیدهای گلیکوزیده‌ی موجود در گلرنگ محسوب می‌شوند که تاکنون در دیگر منابع طبیعی گزارش نشده‌اند (Salem et al., 2014). از بخش‌های مختلف گلرنگ ترکیبات شیمیایی، از جمله آلکانوئیدها، فلاونوئیدها، کینوکالکون‌ها، پلی‌استیلن‌ها، استروئیدها و اسیدهای چرب گوناگونی استخراج شده‌اند. در میان این ترکیبات، فلاونوئیدها و کینوکالکون‌ها به عنوان اجزای فعال و شاخص این گیاه شناخته می‌شوند. گلبرگ‌های گلرنگ نیز به عنوان منبعی از رنگدانه‌های طبیعی در صنایع غذایی و نساجی همچنین در تهیه‌ی دمنوش‌های گیاهی و نیز برای اهداف دارویی مورد استفاده قرار می‌گیرند. از نظر اثرات دارویی، این گیاه دارای خواص ضد درد، ضد التهابی، ضد دیابتی، آنتی‌اکسیدانی و حتی پادزهری گزارش شده‌است (Asgarpanah and Kazemivash, 2013). در مطالعه‌ای که توسط سالم و همکاران در سال ۲۰۱۱ انجام دادند، نشان دادند که میزان ترکیبات فنولی در طول دوره رشد گیاه تغییر می‌کند و گل‌های گلرنگ می‌توانند به عنوان منبعی ارزشمند از ترکیبات زیست‌فعال مورد استفاده قرار گیرند. ترکیبات فنلی به عنوان متابولیت‌های ثانویه در گیاهان عمل می‌کنند و از ساختارهایی چون اسیدهای فنلی، تانن‌ها و لیگنین‌ها تشکیل شده‌اند؛ این ترکیبات به تقویت دیواره‌های سلولی، جذب نور ماورای بنفش و مقابله با عوامل استرس‌زا محیطی کمک می‌کنند (Wilton, 2023). فلاونوئیدها که زیرمجموعه‌ای مهم از ترکیبات فنلی هستند، نقش‌های متعدد و حیاتی در گیاهان دارند؛ از جمله این نقش‌ها می‌توان به محافظت در برابر نور UV، فعال‌سازی مکانیسم‌های دفاعی در برابر عوامل بیولوژیکی (مثل قارچ‌ها و باکتری‌ها)، تنظیم فرآیندهای رشد و نمو گیاه، و حمله به رادیکال‌های آزاد اشاره کرد (Kuljarusnont et al., 2024). آنتوسیانین‌ها گروهی از رنگدانه‌های طبیعی محلول در آب از خانواده فلاونوئیدها هستند که رنگ‌های قرمز، بنفش و آبی را در بسیاری از اندام‌های گیاهی مانند گل‌ها، میوه‌ها و برگ‌ها ایجاد می‌کنند. این ترکیبات علاوه بر نقش زیستی در جذب گرده‌افشان‌ها و محافظت در برابر استرس‌های محیطی، دارای خواص آنتی‌اکسیدانی قوی بوده و در سلامت انسان از جمله در کاهش خطر بیماری‌های قلبی-عروقی و التهابات

نقش دارند (He and Giusti, 2010). ملاتونین^۱ به عنوان یک هورمون در گیاهان شناسایی شده و نقش آن در تنظیم رشد، پاسخ به تنش‌های محیطی و متابولیسم ثانویه گزارش شده است. به طور مثال، پژوهشی در انگور نشان داد که استفاده از ملاتونین باعث افزایش محتوای فنلکل، فلاونوئید و پروآنتوسیانیدین‌ها شد و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی را بهبود بخشید در این پژوهش خوشه‌های انگور در مرحله شروع رنگ‌گیری دو بار با محلول ملاتونین ۱۰۰ میکرومولار حاوی Triton X-100, ۰/۰۵٪ و به صورت غوطه‌وری کوتاه مدت تیمار شدند (Xu et al., 2017). در پژوهش دیگری تخمه‌های کلم سفید و قرمز به طور ۱۲ ساعت خیسانده شدند (با ملاتونین در غلظت‌های ۱۰، ۵۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ $\mu\text{mol/L}$)، و پس از رشد، درمان با ملاتونین موجب افزایش ۱ تا ۲ برابری میزان آنتوسیانین شد؛ همچنین بیان ژن‌های مسیر بیوسنتز آنتوسیانین (از جمله PAL, CHS, DFR و ...) و فاکتورهای رونویسی تنظیم‌کننده (MYB, bHLH, WD40) افزایش یافت و ظرفیت اسکن‌کنندگی رادیکال‌های آزاد بالا رفت (Zhang et al., 2016). ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی، آنتی‌اکسیدان‌ها و آنتوسیانین‌ها، نقش کلیدی در سلامت گیاه و کیفیت محصولات کشاورزی و دارویی دارند و ملاتونین به عنوان یک تنظیم‌کننده رشد و ماده ضد استرس می‌تواند بر افزایش این ترکیبات زیست‌فعال گلبرگ گیاه گلرنگ تأثیر مثبت داشته باشد. این پژوهش با هدف بررسی اثر محلول پاشی ملاتونین بر ترکیبات فنولی، فلاونوئیدی، آنتی‌اکسیدانی و آنتوسیانین گلبرگ‌های گلرنگ انجام شده است.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری نمونه گیاهی

به منظور انجام این آزمایش بذرهای گلرنگ رقم گلمهر (*Carthamus tinctorius* L.) در فروردین ماه سال ۱۴۰۴ به صورت کشت در اراضی کشاورزی شهرستان شهداد، استان کرمان با طول جغرافیایی ۵۷/۶۹۹ و عرض جغرافیایی ۳۰/۴۱۸ کشت شدند، به طوری که فاصله‌ی هر بوته از بوته‌ی دیگر ۵۰ سانتی متر و آبیاری به صورت غرقابی با آب معمولی صورت گرفت. اعمال تیمار ملاتونین بر روی بوته‌های گلرنگ در سه سطح (شاهد، ۰/۲۵ میلی‌مولار (M1) و ۰/۵ میلی‌مولار (M2)) و به صورت پاششی و ۲۰ روز بعد از کشت (در زمان کامل شدن غوزه‌ها و قبل از گلدهی) انجام گرفت. پس از باز شدن گلبرگ‌های گلرنگ و نمو کامل آن‌ها نمونه‌ها در ازلت مایع ابتدا جمع‌آوری و نگهداری شدند. سپس، در محل آزمایشگاه زیست‌فناوری دانشگاه شهید باهنر کرمان در فریزر در دمای ۸۰- تا زمان انجام آنالیزها نگهداری شدند. با توجه به اینکه در پژوهشی اسپری برگی با غلظت ۰/۵mM ملاتونین بر روی گوجه فرنگی سبب افزایش معنی‌دار در وزن خشک و تازه ساقه و ریشه، افزایش ترکیبات فنولی، افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدانی، بهبود مقاومت به شوری، کاهش نشت یونی و بهبود ثبات غشایی برگ شد (Masoumi et al., 2024). همچنین اسپری ملاتونین در غلظت ۰/۱ و ۰/۲ میلی‌مولار بر روی گیاه سورگوم باعث بهبود مقاومت به شوری، کاهش پراکنش H_2O_2

^۱. N-acetyl-5-methoxytryptamine

و MDA، افزایش فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدان، تثبیت غشاء سلولی و بهبود نسبت یونی (Na^+/K^+) را صورت گرفت (Helal *et al.*, 2024). با توجه به تحقیقات فوق غلظت های ۰/۲۵ و ۰/۵ میلی مولار برای این تحقیق انتخاب شدند اگر چه احتمال سمیت غلظت های بالاتر ملاتونین برای گیاه مورد نظر وجود دارد که نیاز به بررسی دارد. با این حال در مطالعات اخیر درباره ملاتونین در گیاهان تأکید شده که ملاتونین عملکردی چندکاره دارد و اثر آن مانند هر تنظیم کننده رشدی وابسته به گونه، مرحله رشد، روش کاربرد، شرایط محیطی و غلظت است؛ بنابراین غلظت بهینه باید برای هر گونه/شرایط تجربه شود (Luo *et al.*, 2024).

عصاره گیری از نمونه

برای تهیه عصاره از نمونه های گیاهی گلبرگ های گلرنگ عصاره گیری به روش خیساندن صورت گرفت به طوری که نمونه مورد نظر از فریزر در دمای ۸۰- درجه سانتی گراد خارج و در ازت مایع پودر شدند. سپس با حلال اتانول ۷۵٪ به نسبت (۱ به ۱۰) ترکیب و درون فالكون ۵۰ به مدت ۲۴ ساعت درون شیکرآنکوباتور با دمای ۲۵ درجه سانتی گراد و سرعت ۸۰ دور در دقیقه قرار گرفت. سپس، نمونه مورد نظر با دستگاه سانتریفیوژ یخچال دار (۲۶/۸۳۲g) به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی گراد سانتریفیوژ شد و از کاغذ صافی واتمن عبور داده شد. عصاره های بدست آمده تا زمان انجام تست های مختلف داخل فریزر در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری شدند (Ziani *et al.*, 2023).

تعیین آنتوسیانین کل

جهت اندازه گیری مقدار آنتوسیانین موجود در عصاره، از روش (Wagner, 1979) استفاده شد. جذب نوری عصاره بدست آمده در طول موج ۵۵۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتری خوانده شد. غلظت آنتوسیانین کل با استفاده از فرمول زیر و با در نظر گرفتن ضریب خاموشی (ϵ) معادل ۳۳۰۰۰ سانتی متر بر مول محاسبه شد:

$$A = \epsilon bc \quad \text{رابطه ۱:}$$

A=جذب خوانده شده، b=عرض کووت، C= غلظت آنتوسیانین

تعیین فنل کل

مقدار فنل کل با استفاده از روش فولین-سیوکالتیو (Slinkard and Singleton, 1977) تعیین گردید. به طور مختصر، ۰/۱ میلی لیتر از هر عصاره با ۰/۵ میلی لیتر معرف فولین-سیوکالتیو ۱۰٪ مخلوط و پس از ۵ دقیقه، ۰/۴ میلی لیتر محلول کربنات سدیم ۷/۵٪ به آن افزوده شد. نمونه ها به مدت ۳۰ دقیقه در تاریکی و دمای اتاق نگهداری و جذب آنها در طول موج ۷۶۰ نانومتر اندازه گیری گردید. نتایج به صورت معادل میلی گرم گالیک اسید در هر گرم عصاره (mg GAE/g) بر اساس منحنی کالیبراسیون گالیک اسید گزارش شدند.

تعیین فلاونوئیدکل

میزان فلاونوئیدکل با روش رنگ‌سنجی آلومینیوم کلرید تعیین گردید (Chang *et al.*, 2002). برای رسم منحنی استاندارد، محلول‌های کوئرستین با غلظت‌های ۰، ۵، ۲۵، ۵۰، ۱۰۰، ۱۲۵، ۲۵۰ و ۵۰۰ میلی‌گرم بر لیتر تهیه و سپس، ۱ میلی‌لیتر از هر عصاره یا محلول استاندارد با ۲/۸ میلی‌لیتر آب مقطر و ۰/۱ میلی‌لیتر استات پتاسیم یک مولار مخلوط شد پس از ۵ دقیقه، ۱/۵ میلی‌لیتر اتانول ۹۵٪ به آن افزوده شد. میزان جذب نمونه‌ها در طول موج ۴۹۰ نانومتر قرائت گردید و نتایج به صورت معادل میلی‌گرم کوئرستین در لیتر عصاره گزارش شد.

اندازه‌گیری توان آنتی‌اکسیدانی با روش مهار رادیکال آزاد DPPH

برای تعیین درصد مهار رادیکال آزاد DPPH ۳/۹ میلی‌لیتر محلول مرجع DPPH (۰/۰۰۴ گرم DPPH در ۱۰۰ میلی‌لیتر اتانول ۷۰ درصد) با ۰/۲ میلی‌لیتر از عصاره مخلوط و به مدت ۳۰ دقیقه در محیط تاریک و دمای اتاق نگهداری شد و در نهایت با دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۱۷ نانومتر جذب آن خوانده شد. (برای بلانک کردن دستگاه از محلول اتانول استفاده شد) در نهایت درصد بازدارندگی رادیکال DPPH با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد (Moure *et al.*, 2000):

رابطه ۲: $100 * (A_{\text{کنترل}} - A_{\text{نمونه}}) / A_{\text{کنترل}} = \text{فعالیت مهارکنندگی (درصد)}$

آنالیز آماری

این آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی یک‌طرفه با سه تیمار و سه تکرار انجام شد، در این پژوهش برای انجام تحلیل‌های آماری از نرم‌افزار (IBM SPSS Statistics) نسخه ۲۳ استفاده شد. این نرم‌افزار توسط شرکت IBM واقع در ایالات متحده آمریکا توسعه یافته است و یکی از پرکاربردترین نرم‌افزارها در تحلیل داده‌های علوم انسانی، کشاورزی، پزشکی و مهندسی به شمار می‌رود. داده‌ها با تحلیل واریانس یک طرفه (ANOVA) مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند و از آزمون چند دامنه‌ای دانکن جهت مقایسه میانگین‌های تیمارها استفاده شد.

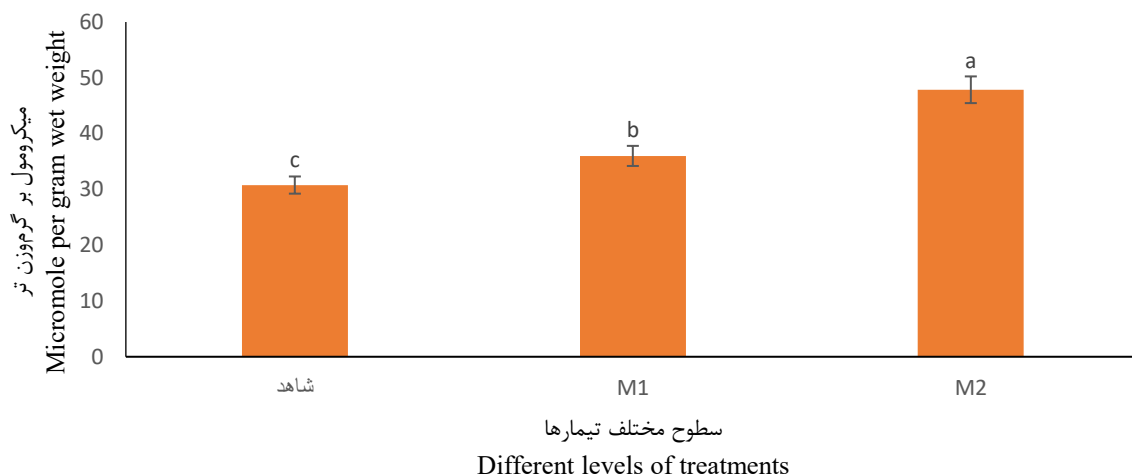
نتایج و بحث

نتایج نشان‌داد که اعمال محلول پاشی ملاتونین بر گلبرگ‌های گلرنگ باعث افزایش معنادار ($P < 0.001$) در ترکیبات آنتوسیانین کل، فنل کل، فلاونوئیدکل و فعالیت آنتی‌اکسیدانی در این گیاه شد.

نتوسیانین

در هر دو سطح پاشش ملاتونین، افزایش آنتوسیانین کل گلبرگ‌ها، نسبت به شاهد دیده شد. میزان آنتوسیانین با اعمال تیمار ۲۵/۰ میلی‌مولار (M1) باعث افزایش ۱/۱۶۹۷ برابری نسبت به شاهد و با اعمال ۰/۵ میلی‌مولار (M2) ۱/۵۵۵ برابر نسبت

به شاهد میزان آنتوسیانین افزایش پیدا کرده است (شکل) همچنین آنالیز آماری نشان داد که اختلاف معنی داری در سطح ۰/۰۱ بین تیمارها وجود دارد.



شکل ۱: میزان ترکیبات آنتوسیانین گلبرگ گلرنگ رقم گلمهر بعد از محلول پاشی با ملاتونین (M1 نشان دهنده مقدار این ترکیب در نمونه تیمار شده با سطح ۰/۲۵ میلی مولار ملاتونین و M2 نمونه تیمار شده با ۰/۵ میلی مولار ملاتونین، حروف انگلیسی متفاوت در بالای ستون هر تیمار نشان از تفاوت معنی دار آماری در سطح احتمال ۱ درصد است.)

Figure 1. Anthocyanin content of safflower petals of Golmehar cultivar after foliar spraying with melatonin (M1 represents the anthocyanin level in the plants treated with 0.25 mM melatonin, and M2 represents the plants treated with 0.5 mM melatonin. Different lowercase letters above the bars indicate statistically significant differences at the 1% probability level.)

فنل

میزان فنل کل در سطح ۰/۲۵ میلی مولار ۱/۱۳۴ برابر بیشتر از شاهد و در سطح ۰/۵ میلی مولار ۱/۸۶ برابر بیشتر از شاهد اندازه گیری شد. همچنین آنالیز داده ها، تفاوت معنی داری در سطح ۰/۰۱ را در بین سطوح مختلف پاشش مشخص نمودند و نشان داده اند که ملاتونین تاثیر معنی داری در میزان ترکیبات فنل کل موجود در گلبرگ گلرنگ رقم گلمهر دارد (شکل).

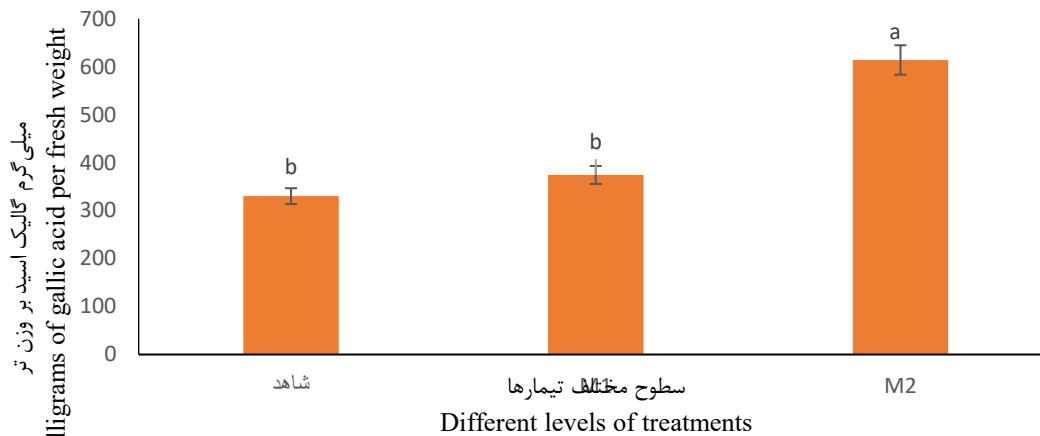
فلاونوئید

استفاده از سطوح ۰/۲۵ و ۰/۵ میلی مولار ملاتونین موجب افزایش ترکیبات فلاونوئیدی در گیاه گلرنگ شد که این افزایش در سطح ۰/۰۱ معنی دار بود و نشان داد که استفاده از سطح ۰/۲۵ میلی مولار باعث افزایش ترکیبات فلاونوئیدی در گلبرگ های گلرنگ به میزان ۱/۱۵۴ برابر نسبت به شاهد شد و در سطح ۰/۵ میلی مولار باعث افزایش ۱/۲۰۵ برابری نسبت به شاهد شد (شکل ۳).

آنتی اکسیدان

میزان ترکیبات آنتی اکسیدان با اعمال تیمار ملاتونین در هر دو سطح افزایش یافت. میزان این ترکیبات در سطح ۰/۲۵ میلی مولار ۸/۵۴ برابر و در سطح ۰/۵ میلی مولار ۹/۶۲ برابر بیشتر از شاهد نشان داده شد. و بیانگر اخلاف معنی دار بین

سطوح مختلف تیمار پاشی در سطح ۰/۰۱ بود (شکل).



شکل ۲: میزان ترکیبات فنل کل گلبرگ گلرنگ رقم گلمهر بعد از محلول پاشی با ملاتونین (M1 نشان دهنده مقدار این ترکیب در نمونه تیمار شده با سطح ۰/۲۵ میلی مولار ملاتونین و M2 نمونه تیمار شده با ۰/۵ میلی مولار ملاتونین، حروف انگلیسی متفاوت در بالای ستون هر تیمار نشان از تفاوت معنی دار آماری در سطح احتمال ۱ درصد است.)

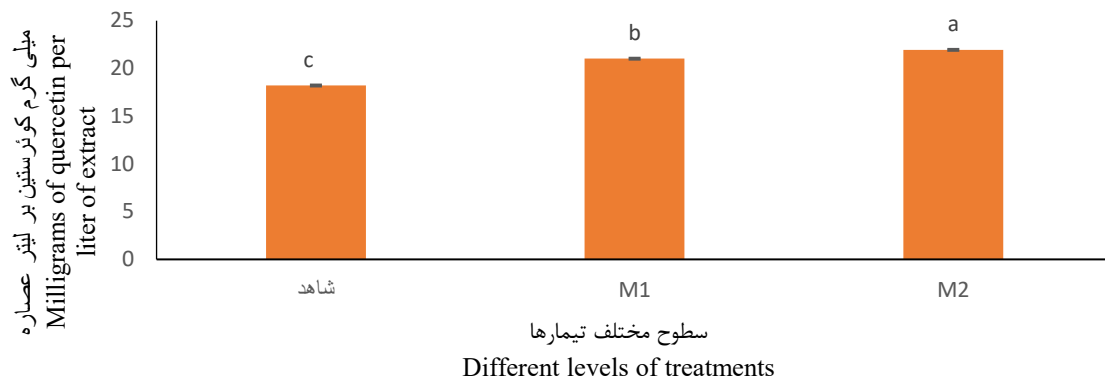
Figure 2. Total phenolic compounds content of safflower petals of Golmehr cultivar after foliar spraying with melatonin (M1 represents the anthocyanin level in the plants treated with 0.25 mM melatonin, and M2 represents the plants treated with 0.5 mM melatonin. Different lowercase letters above the bars indicate statistically significant differences at the 1% probability level.)

فلاونوئید

استفاده از سطوح ۰/۲۵ و ۰/۵ میلی مولار ملاتونین موجب افزایش ترکیبات فلاونوئیدی در گیاه گلرنگ شد که این افزایش در سطح ۰/۰۱ معنی دار بود و نشان داد که استفاده از سطح ۰/۲۵ میلی مولار باعث افزایش ترکیبات فلاونوئیدی در گلبرگ‌های گلرنگ به میزان ۱/۱۵۴ برابر نسبت به شاهد شد و در سطح ۰/۵ میلی مولار باعث افزایش ۱/۲۰۵ برابری نسبت به شاهد شد (شکل ۳).

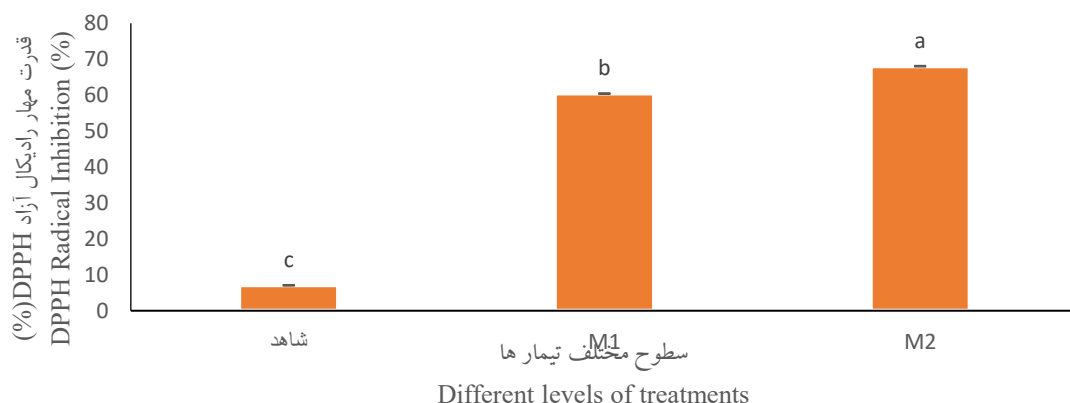
آنتی اکسیدان

میزان ترکیبات آنتی اکسیدان با اعمال تیمار ملاتونین در هر دو سطح افزایش یافت. میزان این ترکیبات در سطح ۰/۲۵ میلی مولار ۸/۵۴ برابر و در سطح ۰/۵ میلی مولار ۹/۶۲ برابر بیشتر از شاهد نشان داده شد. و بیانگر اختلاف معنی دار بین سطوح مختلف تیمار پاشی در سطح ۰/۰۱ بود (شکل).



شکل ۱: میزان ترکیبات فلاونوئیدی کل گلبرگ گلرنگ رقم گلمهر بعد از محلول پاشی با ملاتونین (M1 نشان دهنده مقدار این ترکیب در نمونه تیمار شده با سطح ۰/۲۵ میلی مولار ملاتونین و M2 نمونه تیمار شده با ۰/۵ میلی مولار ملاتونین، حروف انگلیسی متفاوت در بالای ستون هر تیمار نشان از تفاوت معنی دار آماری در سطح احتمال ۱ درصد است.)

Figure3. Total flavonoid content of safflower petals of Golmehr cultivar after foliar spraying with melatonin (M1 represents the anthocyanin level in the plants treated with 0.25 mM melatonin, and M2 represents the plants treated with 0.5 mM melatonin. Different lowercase letters above the bars indicate statistically significant differences at the 1% probability level.)



شکل ۴: میزان ترکیبات آنتی اکسیدان گلبرگ گلرنگ رقم گلمهر بعد از محلول پاشی با ملاتونین (M1 نشان دهنده مقدار این ترکیب در نمونه تیمار شده با سطح ۰/۲۵ میلی مولار ملاتونین و M2 نمونه تیمار شده با ۰/۵ میلی مولار ملاتونین، حروف انگلیسی متفاوت در بالای ستون هر تیمار نشان از تفاوت معنی دار آماری در سطح احتمال ۱ درصد است.)

Figure4. Total antioxidant content of safflower petals of Golmehr cultivar after foliar spraying with melatonin (M1 represents the anthocyanin level in the plants treated with 0.25 mM melatonin, and M2 represents the plants treated with 0.5 mM melatonin. Different lowercase letters above the bars indicate statistically significant differences at the 1% probability level.)

بحث

در مطالعه حاضر، مقادیر کل ترکیبات فنولی و فلاونوئیدها در گلرنگ پس از تیمار ملاتونین افزایش یافت. این یافته‌ها با گزارش‌های متعدد در سایر گونه‌ها همخوانی دارد؛ برای مثال، اسپری خارجی ملاتونین در فلفل‌گلدانی و تیمار بذری آویشن موجب افزایش قابل توجه مقدار کل ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی شده است (Eghlima *et al.*, 2025). این افزایش احتمالاً ناشی از فعال شدن مسیر فنیل پروپانویید است که توسط ملاتونین تقویت می‌شود و بیان آنزیم‌های کلیدی مانند PAL، CHS

و CHI را افزایش می‌دهد، در نتیجه تولید ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی ارتقا می‌یابد (Gao *et al.*, 2025). مطالعه‌ای بر روی بلوبری نشان داد که استفاده از ملاتونین باعث افزایش میزان فنل کل، فلاونوئیدکل، ظرفیت آنتی‌اکسیدانی، سایر ترکیبات و متابولیت‌های ثانویه در این گیاه می‌شود (Zheng *et al.*, 2024). مطالعه‌ای بر روی انگور نشان داد که تیمار گیاهان با ملاتونین موجب افزایش تجمع آنتوسیانین‌ها، ترکیبات فنولی، فلاونوئیدها و در نتیجه ارتقای ظرفیت آنتی‌اکسیدانی می‌شود (Xu *et al.*, 2017). این یافته با نتایج مطالعه حاضر در گلرنگ همسو است و نشان می‌دهد که ملاتونین می‌تواند به تقویت سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی و افزایش متابولیت‌های ثانویه در گیاهان کمک کند. ملاتونین به صورت مستقیم و غیرمستقیم نقش روسکلایمر² دارد؛ یعنی می‌تواند رادیکال‌های آزاد (ROS) را خنثی کند و زنجیره‌ی آسیب اکسیداتیو را شکسته یا کاهش دهد (Michalek *et al.*, 2025). با کاهش تنش اکسیداتیو، سلول گیاهی کمتر دچار آسیب می‌شود و شرایط مناسب‌تری برای سنتز متابولیت‌های ثانویه (آنتوسیانین، فنول‌ها، فلاونوئیدها و ...) فراهم می‌شود (Zhao *et al.*, 2023). در نتیجه یکی از دلایل افزایش فنول و آنتی‌اکسیدان پس از پاشش ملاتونین، تقویت سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی گیاه و کاهش استرس اکسیداتیو است. در مطالعه‌ای روی میوه‌های آلو پس از اسپری یا درمان ملاتونین، محققان افزایش قابل توجه آنتوسیانین، فلاونوئید، فنول و پروآنتوسیانیدین گزارش کرده‌اند، همراه با افزایش فعالیت آنزیم‌های مسیر بیوسنتز. افزایش معنی‌دار محتوای آنتوسیانین، فنول‌ها، فلاونوئیدها و پس از اسپری ملاتونین احتمالاً ناشی از تحریک مسیر بیوسنتز فنول‌پلی‌فنولی و فلاونوئید / آنتوسیانین است؛ چرا که ملاتونین به طور مستند افزایش بیان ژن‌های کلیدی این مسیر (مانند CHS, CHI, F3H و غیره) را موجب می‌شود (Zhu *et al.*, 2025). ملاتونین علاوه بر اثرات آنتی‌اکسیدانی، به عنوان یک تنظیم‌کننده رشد گیاهی شناخته شده است؛ بر فتوسنتز، متابولیسم، تنظیم اسمزی، جذب مواد و ریشه‌زایی تأثیر می‌گذارد. این نقش‌ها می‌تواند شرایط فیزیولوژیکی را بهبود داده و منابع (کربن، انرژی، پیش‌سازها) لازم برای بیوسنتز ترکیبات ثانویه را فراهم کند (Oloumi, 2022). علاوه بر این، ملاتونین به عنوان آنتی‌اکسیدان مستقیم و غیرمستقیم (از طریق افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی مانند SOD, CAT, POD, APX) عمل می‌کند و غلظت ROS و آسیب غشایی (لپید پراکسیداسیون) را کاهش می‌دهد؛ این مکانیسم می‌تواند به حفظ غشای سلولی، پایداری سلول و امکان سنتز و تجمع متابولیت‌های ثانویه کمک کند (Zhang *et al.*, 2016).

نتیجه گیری کلی

نتایج این مطالعه نشان داد که اعمال ملاتونین در غلظت‌های ۰/۵ و ۰/۲۵ میلی‌مولار می‌تواند به طور قابل توجهی میزان ترکیبات فنول‌ها، فلاونوئیدها و آنتوسیانین‌ها و همچنین فعالیت آنتی‌اکسیدانی گلبرگ گیاه گلرنگ را افزایش دهد. این یافته‌ها نشان می‌دهد که ملاتونین می‌تواند به عنوان یک محرک مؤثر در بهبود کیفیت متابولیت‌های ثانویه و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی

² free radical scavenger

گیاهان مورد استفاده قرار گیرد. از این رو، استفاده از ملاتونین در مدیریت تغذیه و افزایش ارزش غذایی و دارویی گیاهان می‌تواند راهکار مناسبی باشد.

منابع

- Asgarpanah, J., & Kazemivash, N. (2013).** Phytochemistry, pharmacology and medicinal properties of *Carthamus tinctorius* L. *Chinese Journal of Integrative Medicine*, 19(2), 153–159. <https://doi.org/10.1007/s11655-013-1354-5>
- Chang, C. C., Yang, M. H., Wen, H. M., & Chern, J. C. (2002).** Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. *Journal of food and drug analysis*, 10(3).
- Cho, M. H., Paik, Y. S., and Hahn, T. R. (2000).** Enzymatic conversion of precarthamin to carthamin by a purified enzyme from the yellow petals of safflower. *Journal of agricultural and food chemistry*, 48(9), 3917- 3921.
- Eghlima, G., Aghamir, F., Hajizadeh, H. S., & Zarbakhsh, S. (2025).** Role of melatonin in promoting growth attributes, thymol, rosmarinic acid and biochemical properties in *Thymus vulgaris* L. under water deficiency. *BMC Plant Biology*, 25(1), 603.
- Gao, F., Han, K., Ma, W., Zhang, J., & Xie, J. (2025).** Exogenous Melatonin Application Enhances Pepper (*Capsicum annuum* L.) Fruit Quality via Activation of the Phenylpropanoid Metabolism. *Foods*, 14(7), 1247.
- He, J., & Giusti, M. M. (2010).** Anthocyanins: natural colorants with health-promoting properties. *Annual review of food science and technology*, 1(1), 163-187.
- Helal, N. M., Saudy, H. S., Hamada, M. M., El-Yazied, A. A., El-Gawad, H. G. A., Mukherjee, S., ... & Ibrahim, M. F. (2024).** Potentiality of melatonin for reinforcing salinity tolerance in sorghum seedlings via boosting photosynthetic pigments, ionic and osmotic homeostasis and reducing the carbonyl/oxidative stress markers. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, 24(3), 4243-4260
- Kuljarusnont, S., Iwakami, S., Iwashina, T., & Tungmunthum, D. (2024).** Flavonoids and other phenolic compounds for physiological roles, plant species delimitation, and medical benefits: A promising view. *Molecules*, 29(22), 5351.
- Li, L., Yang, Y., Hou, X., Gu, D., Ba, H., Abdulla, R., and Aisa, H. A. (2013).** Bioassay-guided separation and purification of water-soluble antioxidants from *Carthamus tinctorius* L. by combination of chromatographic techniques. *Separation and Purification Technology*, 104: 200-207.
- Luo, M., Zhang, D., Tang, W., Delaplace, P., Chen, M., & Ma, Y. (2024).** Recent advances in melatonin regulation of drought tolerance in plants. *Tropical Plants*, 4(1).
- Masoumi, Z., Haghighi, M., & Mozafarian, M. (2024).** Effects of foliar spraying with melatonin and chitosan Nano-encapsulated melatonin on tomato (*Lycopersicon esculentum* L. cv. Falcato) plants under salinity stress. *BMC Plant Biology*, 24(1), 961.
- Michalek, M., Ogradowicz, P., Kempa, M., Kuczyńska, A., & Mikołajczak, K. (2025).** Melatonin in crop plants: from biosynthesis through pleiotropic effects to enhanced stress resilience. *Journal of Applied Genetics*, 1-21.
- Moure, A., Franco, D., Sineiro, J., Domínguez, H., Núñez, M. J., & Lema, J. M. (2000).** Evaluation of extracts from *Gevuina avellana* hulls as antioxidants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(9), 3890-3897.
- Nasr, H. G., Katkhuda, N., & Tannir, L. (1978).** Effects of N Fertilization and Population Rate-Spacing on Safflower Yield and other Characteristics 1. *Agronomy Journal*, 70(4), 683-685.
- Oloumi, H. (2022).** Melatonin; Growth regulator and strong antioxidant in plants. *Journal of Plant Process and Function*, (1), 37-54.
- Özçinar, A. B. (2021).** Safflower (*Carthamus tinctorius* L.): utilisation, genetics and agronomy. *MAS Journal of Applied Sciences*, 6(Özel Sayı), 1130-1136.

Panahi, B., & Ghorbanzadeh Neghab, M. (2013). Genetic characterization of Iranian safflower (*Carthamus tinctorius*) using inter simple sequence repeats (ISSR) markers. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 19(2), 239-243.

Salem, N., Msaada, K., Elkahoui, S., Mangano, G., Azaeiz, S., Ben Slimen, I., and Marzouk, B. (2014). Evaluation of antibacterial, antifungal, and antioxidant activities of safflower natural dyes during flowering. *BioMed research international*, 2014.

Salem, N., Msaada, K., Hamdaoui, G., Limam, F., & Marzouk, B. (2011). Variation in phenolic composition and antioxidant activity during flower development of safflower (*Carthamus tinctorius* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(9), 4455-4463.

Slinkard, K., & Singleton, V. L. (1977). Total phenol analysis: automation and comparison with manual methods. *American journal of enology and viticulture*, 28(1), 49-55.

Wagner, G. J. (1979). Content and vacuole/extravacuole distribution of neutral sugars, free amino acids, and anthocyanin in protoplasts. *Plant physiology*, 64(1), 88-93.

Wilton R (2023). Role of Phenols in the Development and Growth of Plants. *J Plant Biochem Physiol*. 11:269.

Xu, L., Yue, Q., Bian, F. E., Sun, H., Zhai, H., & Yao, Y. (2017). Melatonin enhances phenolics accumulation partially via ethylene signaling and resulted in high antioxidant capacity in grape berries. *Frontiers in Plant Science*, 8, 1426.

Xu, L., Yue, Q., Bian, F. E., Sun, H., Zhai, H., & Yao, Y. (2017). Melatonin enhances phenolics accumulation partially via ethylene signaling and resulted in high antioxidant capacity in grape berries. *Frontiers in Plant Science*, 8, 1426.

Zeynali, E. (2000). Safflower: Identification, production, and utilization. Gorgan, Iran: Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources

Zhang, N., Sun, Q., Li, H., Li, X., Cao, Y., Zhang, H & Guo, Y. D. (2016). Melatonin improved anthocyanin accumulation by regulating gene expressions and resulted in high reactive oxygen species scavenging capacity in cabbage. *Frontiers in Plant Science*, 7, 197.

Zhang, N., Sun, Q., Li, H., Li, X., Cao, Y., Zhang, H., ... & Guo, Y. D. (2016). Melatonin improved anthocyanin accumulation by regulating gene expressions and resulted in high reactive oxygen species scavenging capacity in cabbage. *Frontiers in Plant Science*, 7, 197.

Zhao, Z., Yun, C., Gu, L., Liu, J., Yao, L., Wang, W., & Wang, H. (2023). Melatonin enhances biomass, phenolic accumulation, and bioactivities of rosemary (*Rosmarinus officinalis*) in vitro shoots under UV-B stress. *Physiologia Plantarum*, 175(4), e13956.

Zheng, H., Yang, Y., Wu, S., Jia, F., Jiang, J., Yu, L & Qin, W. (2024). Effects of pre-harvest application of melatonin, 24-epibrassinolide, and methyl jasmonate on flavonoid content in blueberry fruit. *Frontiers in Nutrition*, 11, 1495655.

Zhu, J., Huang, Z., Guo, M., Xiao, Y., Li, Y., Zhang, X & Lin, L. (2025). Exogenous melatonin promotes anthocyanin accumulation and coloration in Chinese plum peels. *BMC Plant Biology*, 25(1), 1184.

Ziani, I., Bouakline, H., Yahyaoui, M. I., Belbachir, Y., Fauconnier, M. L., Asehrou, A & El Bachiri, A. (2023). The effect of ethanol/water concentration on phenolic composition, antioxidant, and antimicrobial activities of *Rosmarinus tournefortii* de Noé hydrodistillation solid residues. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 17(2), 1602-1615.

Effect of foliar application of salicylic acid on some morphological and non-enzymatic antioxidant characteristics of Licorice (*Glycyrrhiza glabra* L.) under UV-B stress

Pages
77-97

F. Ahmadi¹, S. Hosseini Sarghein^{1*}, J. Khara¹ and Sh. Yeganeh Far¹

1) Department of Biology, Faculty of Science, Urmia University, Urmia, Iran.

*Corresponding author : s.hosseini@urmia.ac.ir

Received date: 2025.11.01

Accepted date: 2026.02.01

Abstract

Licorice (*Glycyrrhiza glabra* L.) is valued in various industries for its secondary metabolites. UV-B radiation stress can impair plant growth and metabolism, while salicylic acid, as a growth regulator, enhances plant tolerance to stress. This study was conducted to investigate the effects of UV-B and salicylic acid on growth and non-enzymatic antioxidant characteristics of licorice in a completely randomized factorial design with three replications during 2023–2024 at Urmia University. Seeds were prepared, germinated, and planted in pots, and at the 5–6 leaf stage, plants were treated with salicylic acid (0, 1, and 2 mM) via foliar application and UV-B stress (30 minutes daily) for two weeks. Growth traits (fresh and dry weight of roots and leaves) and biochemical traits (total phenol, flavonoid, anthocyanin content, and FRAP antioxidant activity) were evaluated. The results showed that UV-B significantly reduced the fresh weight of roots and leaves and dry weight of roots and leaves (by 67%, 68%, 64.6%, and 37.5% compared to the control, respectively) but increased total phenol and flavonoid content. Application of salicylic acid, particularly at 2 mM, mitigated these effects and improved the fresh and dry weight of leaves and roots. Additionally, salicylic acid combined with UV-B significantly increased phenol content in roots (130%), which led to an increase in FRAP antioxidant activity. The antioxidant activity of leaves (158%) and roots (130%) significantly increased under combined treatment of salicylic acid and UV compared to the control. Leaf anthocyanin content significantly increased under salicylic acid treatment. These findings highlight the role of salicylic acid in alleviating the negative effects of UV-B and enhancing the antioxidant defense system of licorice.

Keywords: Abiotic stress, Stress amelioration, Total flavonoid and Total phenol.

اثر محلول پاشی برگ‌های سالیسیلیک اسید بر برخی شاخص‌های رشدی و محتوای آنتی‌اکسیدان‌های غیر آنزیمی گیاه

شیرین بیان (*Glycyrrhiza glabra* L.) تحت تنش UV-B

شماره صفحات

۷۷-۹۷

فروغ احمدی^۱، سیاوش حسینی سرقین^{۲*}، جلیل خارا^۳ و شبنم یگانه فر^۴

۱، ۲، ۳ و ۴) گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران.

* نویسنده مسئول: s.hosseini@urmia.ac.ir

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۱۱/۱۲

تاریخ دریافت: ۱۴۰۴/۰۸/۱۰

چکیده

شیرین بیان (*Glycyrrhiza glabra* L.) به دلیل تولید متابولیت‌های ثانویه در صنایع مختلف کاربرد دارد. تنش پرتو فرابنفش نوع (UV-B) می‌تواند رشد و متابولیسم گیاه را مختل کند، در حالی که سالیسیلیک اسید به عنوان تنظیم‌کننده رشد، تحمل گیاه به تنش را بهبود می‌بخشد. این مطالعه با هدف بررسی اثرات UV-B و محلول پاشی سالیسیلیک اسید بر ویژگی‌های رشدی و آنتی‌اکسیدانی غیر آنزیمی شیرین بیان به صورت فاکتوریل در قالب کاملاً تصادفی با سه تکرار در سال ۱۴۰۳-۱۴۰۲ در دانشگاه ارومیه انجام شد. بذرها پس از آماده‌سازی و جوانه‌زنی در گلدان کاشته شده و در مرحله ۵-۶ برگ، تحت تیمارهای سالیسیلیک اسید (۰، ۱ و ۲ mM) به صورت محلول پاشی و تنش UV-B (نیم ساعت روزانه) به مدت دو هفته قرار گرفتند. صفات رشدی (وزن تر و خشک ریشه و برگ) و فیتوشیمیایی (محتوای فنل، فلاونوئید، آنتوسیانین و فعالیت آنتی‌اکسیدانی FRAP) ارزیابی شدند. نتایج نشان داد که UV-B به طور معنی‌داری وزن تر ریشه و برگ و وزن خشک ریشه و برگ را کاهش (به ترتیب ۶۷٪، ۶۸٪، ۶۴/۶٪ و ۳۷/۵٪ نسبت به شاهد)، اما محتوای فنل و فلاونوئید کل را افزایش داد. کاربرد سالیسیلیک اسید، به ویژه در غلظت ۲ mM، این اثرات را تعدیل کرد و وزن تر و خشک برگ و ریشه را بهبود بخشید. همچنین، سالیسیلیک اسید در ترکیب با UV-B محتوای فنل ریشه را به طور معنی‌داری افزایش داد (۱۳۰٪)، که منجر به افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدانی FRAP گردید. فعالیت آنتی‌اکسیدانی برگ (۱۵۸٪) و ریشه (۱۳۰٪) به طور معنی‌داری تحت تیمار ترکیبی سالیسیلیک اسید و UV در مقایسه با شاهد افزایش یافت. آنتوسیانین برگ تحت تیمار سالیسیلیک اسید به طور معنی‌دار افزایش یافت. این یافته‌ها نشان‌دهنده نقش سالیسیلیک اسید در کاهش اثرات منفی UV-B و تقویت سیستم دفاعی آنتی‌اکسیدانی شیرین بیان است.

واژه‌های کلیدی: تنش غیر زیستی، فنل کل، فلاونوئید کل و بهبود تنش.

مقدمه

شیرین‌بیان (*Glycyrrhiza glabra*. L.)، گیاهی چندساله از خانواده Fabaceae، بومی نواحی مدیترانه، جنوب روسیه و آسیا است. نام علمی این گیاه از واژه‌های یونانی "Glyc" به معنای شیرین و "Rhyza" به معنای ریشه گرفته شده و "glabra" به دلیل صاف و بدون کرک بودن میوه آن است. نام‌های انگلیسی آن Licorice یا Liquorice و نام عربی آن شجره‌السوس یا عرق‌سوس است. این گیاه با ارتفاع ۱۰۰ تا ۲۰۰ سانتی‌متر، ساقه‌های منشعب، برگ‌های مرکب (شامل چهار تا هفت جفت برگچه و یک برگچه انتهایی که شیره چسبنده ترشح می‌کند)، گل‌های نامنظم به رنگ زرد، بنفش یا ارغوانی (با طول بیش از یک سانتی‌متر) و میوه‌های قهوه‌ای یا خرمایی (به طول دو تا سه سانتی‌متر حاوی سه تا پنج دانه لوبیاشکل با پوست ضخیم) شناخته می‌شود (Khan Ahmadi et al., 2013; Eghlima et al., 2019). ریشه و ریزوم‌های شیرین‌بیان، با پوستی قهوه‌ای و مغزی زردرنگ، منبع غنی ترکیبات فعال مانند فلاونوئیدها، اسیدهای آمینه، استرول‌ها و ساپونین‌ها هستند. مهم‌ترین ساپونین آن، گلیسیریزین (گلیسیریزیک اسید)، حدود ۵۰ برابر شیرین‌تر از شکر است و به عنوان ماده مؤثره اصلی این گیاه شناخته می‌شود (Khan Ahmadi et al., 2013). این گیاه از دوران باستان در طب سنتی جهان برای خواص ضدالتهابی، ضدزخم، خلط‌آور، ضداضطراب، آنتی‌بیوتیک، ضدادرار و ضد میکروبی مورد استفاده قرار گرفته و در درمان بیماری‌هایی مانند سرفه، سرطان، هپاتیت، ورم و زخم معده کاربرد دارد (El-Saber Batiha et al., 2020). بر اساس گزارش سازمان جهانی بهداشت (WHO)، شیرین‌بیان به عنوان نرم‌کننده گلو و خلط‌آور برای برونشیت و سرفه توصیه می‌شود. با وجود نبود گزارش از ترکیبات سمی، مصرف دوزهای بالا در بلندمدت ممکن است عوارض جانبی ایجاد کند، اما در دوزهای کم برای اهداف دارویی ایمن است. ریشه‌های این گیاه حاوی بیش از ۱۰۰ ترکیب، از جمله ساپونین‌های تری‌ترپنوئیدی (مانند گلیسیریزین) و فنول‌ها، هستند که در صنایع غذایی، دارویی، آرایشی، بهداشتی و دخانیات کاربرد دارند (Wahab et al., 2021). یکی از عوامل کلیدی محیطی مؤثر بر رشد و متابولیسم گیاهان، پرتو فرابنفش نوع B (UV-B)، با طول موج ۲۸۰ تا ۳۲۰ نانومتر است که پرنرژی‌ترین بخش طیف خورشیدی رسیده به زمین محسوب می‌شود. این پرتو، برخلاف UV-C (۲۲۰ تا ۲۸۰ نانومتر) که توسط اتمسفر جذب می‌شود و UV-A (۳۲۰ تا ۴۰۰ نانومتر) که کمتر آسیب‌زا است، می‌تواند باعث آسیب DNA، مرگ سلولی، تغییرات ژنتیکی و اختلال در بیان ژن‌ها شود (Hollosoy, 2002; Bhusal et al., 2021). اثرات UV-B بر گیاهان شامل تغییرات اولیه و ثانویه در رشد، ریخت‌شناسی، فیزیولوژی، بیوشیمی، فنولوژی و عملکرد مانند کاهش ارتفاع گیاه، سطح برگ، فاصله میان‌گره، وزن تر و خشک، محتوای کلروفیل، سرعت فتوسنتز و بازده کوانتومی فتوسیستم II (Fv/Fm) است (Zhang et al., 2016; Kataria, 2017). علاوه بر این، UV-B تولید گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) مانند پراکسید هیدروژن (H_2O_2)، سوپراکسید (O_2^-) و هیدروکسیل ($\bullet OH$) را القا می‌کند که می‌تواند به عنوان سیگنال‌دهنده عمل کند یا منجر به تنش اکسیداتیو شود (Huang et al., 2019). گیاهان برای مقابله با این تنش، مکانیسم‌های دفاعی آنزیمی مانند آنزیم‌های سوپر اکسید دیسموتاز

(SOD)، کاتالاز (CAT)، آسکوربات پراکسیداز (APX) و غیرآنزیمی (مانند فنل‌ها و فلاونوئیدها) را توسعه داده‌اند که شدت پاسخ به مدت و شدت تابش و ژنوتیپ بستگی دارد (Ozgun et al., 2021; Tan et al., 2023). مطالعات نشان‌دهنده اثرات UV-B بر متابولیت‌های ثانویه، پراکسیداسیون لیپید و ساختار پروتئین‌ها هستند؛ برای مثال، در گل راعی کرکدار (*Hypericum hirsutum* L.) افزایش شدت UV-B ($25 \text{ kJ m}^{-2} \text{ day}^{-1}$) باعث کاهش وزن تر و خشک، طول اندام هوایی، محتوای کلروفیل و قندهای محلول، اما افزایش فنل‌ها، فلاونوئیدها، مالون‌دی‌آلدئید، آنتوسیانین و پراکسید هیدروژن شد (Bagheri et al., 2020). در غلات مانند جو (*Hordeum vulgare* L.) و گندم (*Triticum aestivum* L.)، تابش کوتاه‌مدت UV تولید ROS و رادیکال‌های پایدار را افزایش داد (Kurdziel et al., 2018). سالیسیلیک اسید، یک ترکیب فنولی (اسید ارتو-هیدروکسی‌بنزوئیک) مشتق از درخت بید (*Salix*)، به عنوان تنظیم‌کننده رشد در فرآیندهای فیزیولوژیکی مانند گرم‌زایی، دفاع گیاهی و پاسخ به تنش‌های زیستی و غیرزیستی نقش دارد (Wani et al., 2017). سالیسیلیک اسید به صورت آزاد یا کونژوگه (از طریق متیلاسیون، هیدروکسیلاسیون یا گلوکوزیلاسیون) وجود دارد و بیان ژن‌های دفاعی را تنظیم می‌کند، ایمنی گیاه را افزایش می‌دهد و با هورمون‌های دیگر مانند جاسمونیک اسید، اکسین و اتیلن تعامل دارد (Maruri-López et al., 2019; Song et al., 2023). کاربرد سالیسیلیک اسید اثرات تنش را کاهش می‌دهد؛ برای مثال، در گیاهان گوجه‌فرنگی (*Solanum lycopersicum*) تحت شوری، محلول‌پاشی سالیسیلیک اسید طول و قطر میوه، تعداد میوه، عملکرد و ویتامین C را بهبود بخشید (Naeem et al., 2020). به طور مشابه در گیاهان توت‌فرنگی (*Fragaria × ananassa*) تحت شوری، کاربرد سالیسیلیک اسید وزن تر و خشک، محتوای کلروفیل، عناصر برگ، عملکرد و آسکوربیک اسید را افزایش داد، در حالی که غلظت سدیم و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی را تعدیل کرد (Roshdy et al., 2021). گزارش شده است که در گیاهان رزماری (*Salvia rosmarinus*) در کشت درون‌شیشه‌ای، غلظت‌های $10\text{--}20 \text{ mg L}^{-1}$ همراه با اشعه فرابنفش تعداد شاخه، برگ، وزن تر و خشک، کلروفیل و کربوهیدرات‌ها را بهبود بخشید (Nasseralla and Almukhtar, 2023). محققان نشان دادند که در گیاهان سویا تحت UV-B، کاربرد سالیسیلیک اسید و آسکوربیک اسید زیست‌توده، محتوای آب نسبی، پایداری غشا و رنگدانه‌های فتوسنتزی را افزایش می‌دهد و اثرات مضر UV-B را کاهش می‌دهد (Arsule and Chaudhary, 2024). اگرچه افزایش تابش UV-B ناشی از تخریب لایه اوزون، به‌عنوان یک تهدید برای رشد گیاهان دارویی مانند شیرین‌بیان شناخته می‌شود، اما از منظر تولید متابولیت‌های ثانویه، به‌ویژه ترکیبات فنلی، می‌تواند یک فرصت محسوب شود؛ چرا که این پرتو نقش تحریک‌کنندگی بر مسیرهای سنتز این ترکیبات دارد. با توجه به اهمیت اقتصادی این گیاه، بررسی پاسخ آن به UV-B و نقش سالیسیلیک اسید در افزایش تحمل ضروری است. این مطالعه با هدف بررسی اثرات UV-B بر خصوصیات رشدی و آنتی‌اکسیدان‌های غیرآنزیمی گیاه شیرین‌بیان و ارزیابی نقش سالیسیلیک اسید در بهبود اثرات ناشی از این تنش انجام شد. این پژوهش با این فرضیه بنیادین طراحی و اجرا شد که کاربرد برگ‌ی اسید سالیسیلیک، به عنوان یک مولکول پیام‌رسان در پاسخ به تنش‌های زیستی و غیر

زیستی، قادر است اثرات مخرب پرتوهای فرابنفش UV-B را بر رشد و متابولیسم گیاه دارویی شیرین بیان تعدیل کند. هدف اصلی این مطالعه، واکاوی هم‌زمان اثرات متقابل این دو فاکتور بر شاخص‌های کلیدی رشد گیاه و همچنین ارزیابی پاسخ‌های دفاعی در قالب سیستم آنتی‌اکسیدانی غیرآنزیمی بود.

روش کار

طرح آزمایشی، کشت و اعمال تیمارها

به منظور بررسی پاسخ گیاه شیرین بیان به تنش UV-B تحت تیمار سالیسیلیک اسید، آزمایشی به صورت فاکتوریل بر پایه طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار، در اتاق کشت تحقیقاتی دانشکده علوم دانشگاه ارومیه طی سال‌های ۱۴۰۲-۱۴۰۳ انجام شد. بذره‌های گیاه شیرین بیان از مرکز تحقیقات کشاورزی آذربایجان غربی تهیه گردید. برای ضدعفونی، بذرها به مدت ۳۰ ثانیه در هیپوکلریت سدیم ۱۰٪ قرار داده شدند و سپس سه بار با آب مقطر شستشو یافتند. به منظور شکستن خواب بذرها، آن‌ها در محلول جیبرلیک اسید با غلظت ۴۰۰ ppm به مدت ۴۸ ساعت غوطه‌ور گردیدند (Rostami *et al.*, 2022). سپس، بذرها در پتری‌دیش‌های پوشیده شده با فویل آلومینیومی، در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و رطوبت ۹۰٪، به مدت ۴۸ ساعت در دستگاه ژرمیناتور (BINDER مدل KBWF 240، ساخت شرکت آلمان) برای جوانه‌زنی قرار گرفتند. بذره‌های جوانه‌زده به گلدان‌هایی با قطر دهانه ۱۸ سانتی‌متر و عمق ۱۲ سانتی‌متر حاوی خاک منتقل شدند و به مدت ۳۰ روز تحت مراقبت‌های لازم قرار گرفتند. پس از آماده‌سازی، گلدان‌ها به گلخانه‌ای با رطوبت نسبی ۷۰٪، دمای ۲۵-۳۰ درجه سانتی‌گراد و دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی منتقل گردیدند. تیمارهای UV-B و سالیسیلیک اسید پس از رسیدن گیاهان به مرحله رشد مناسب (۵-۶ برگ بالغ) به مدت دو هفته اعمال شدند. تیمار اسید سالیسیلیک در سه سطح غلظتی (۰، ۱ و ۲ میلی‌مولار) به صورت محلول پاشی اوایل صبح انجام گرفت، به طوری که اندام‌های هوایی گیاه کاملاً پوشانده شد. این عملیات هشت بار طی دو هفته تکرار گردید. بلافاصله پس از محلول پاشی، گیاهان تحت تنش UV-B هر روز به مدت نیم ساعت قرار گرفتند. برای تیمار UVB از لامپ UV با این مشخصات استفاده شد: UVB = 2 (15w) (LF-215 m.312 nm). لامپ‌ها در فاصله ۷۵ سانتی‌متری از بالای گلدان‌ها نصب شدند. میزان قرار گرفتن در معرض تابش فرابنفش در نوک گیاهان با استفاده از یک طیف‌سنج UV-B اندازه‌گیری شد که مقدار ۹/۵ کیلوژول بر متر مربع در روز را ثبت کرد. ۱۴ روز پس از اعمال تیمارها، گیاهان برداشت شدند و نمونه‌های تر در فریزر ۴- درجه سانتی‌گراد برای سنجش صفات فیتوشیمیایی نگهداری شدند. همچنین وزن تر و خشک ریشه و برگ با استفاده از ترازوی دیجیتال اندازه‌گیری شد. ابتدا نمونه‌های تر وزن شدند. سپس این نمونه‌ها در آون ۷۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۷۲ ساعت نگهداری و خشک شدند و وزن خشک آنها اندازه‌گیری شد.

اندازه‌گیری آنتی‌اکسیدان‌های غیر آنزیمی

فنل کل

اندازه‌گیری محتوای فنل کل با استفاده از تکنیک رنگ سنجی فولین سیوکالچئو (Folin-Ciocalteu) انجام گرفت (Meda *et al.*, 2005). مقدار ۰/۱ گرم از نمونه گیاهی در ۵ میلی‌لیتر متانول در یک هاون چینی سائیده شد. سپس به مدت ۱۰ دقیقه در ۱۰۰۰ rpm سانتریفوژ گردید و برای سنجش فنل کل مورد استفاده قرار گرفت. مقدار ۰/۵ میلی‌لیتر از محلول رویی با ۰/۵ میلی‌لیتر معرف فولین سیوکالچئو ۲۰٪ (v/v) مخلوط شد و به مدت ۸-۵ دقیقه در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. پس از افزودن ۲ میلی‌لیتر محلول کرینات سدیم ۷/۵٪ به مخلوط و تنظیم بعدی حجم کل به ۱۰ میلی‌لیتر با استفاده از آب مقطر، مخلوط حاصل در تاریکی در دمای اتاق به مدت ۹۰ دقیقه انکوبه شدند. جذب محلول‌ها در طول موج ۷۲۵ نانومتر نسبت به شاهد (فاقد عصاره گیاهی) اندازه‌گیری شد. محتوای فنل کل نمونه‌ها براساس منحنی استاندارد تهیه شده از غلظت‌های مختلف گالیک اسید محاسبه شد و در نهایت بر اساس میلی‌گرم گالیک اسید بر گرم بافت تر گیاه (mg gallic acid/g FW) محاسبه گردید.

فلاونوئید کل

اندازه‌گیری محتوای فلاونوئید کل عصاره‌ها بر اساس روش رنگ سنجی آلومینیوم کلراید ($AlCl_3$)، همراه با تغییراتی انجام شد (Chang *et al.*, 2002). مقدار ۰/۱ گرم از نمونه گیاهی در ۵ میلی‌لیتر متانول در یک هاون چینی سائیده شد. سپس به مدت ۱۰ دقیقه در ۱۰۰۰ rpm سانتریفوژ گردید و از محلول رویی برای سنجش فلاونوئید کل مورد استفاده قرار گرفت. مقدار ۵۰۰ میکرولیتر از عصاره برداشته شد و مقادیر ۱/۵ میلی‌لیتر متانول، ۱۰۰ میکرو لیتر آلومینیوم کلراید ۱۰٪، ۱۰۰ میکرو-لیتر استات پتاسیم ۱ مولار و ۲/۸ میلی‌لیتر آب مقطر اضافه شد. مخلوط حاصل به خوبی ورتکس و به مدت ۴۰ دقیقه در دمای محیط نگهداری شد. سپس جذب محلول‌ها در طول موج ۴۱۵ نانومتر نسبت به شاهد اندازه‌گیری گردید. از لوله آزمایش فاقد عصاره گیاهی به عنوان شاهد استفاده شد. مقدار فلاونوئید کل نمونه‌ها براساس منحنی استاندارد تهیه شده از غلظت‌های مختلف کوئرستین محاسبه شد و در نهایت بر اساس میلی‌گرم معادل کوئرستین بر گرم بافت تر گیاه (mg quercetin/g FW) بیان گردید.

آنتوسیانین

برای اندازه‌گیری آنتوسیانین ۰/۱ گرم از وزن تر برگ به همراه ۱۰ میلی‌لیتر متانول اسیدی (شامل ۹۹٪ متانول و ۱٪ اسید کلریدریک) ساییده شد. سپس عصاره حاصل به مدت ۱۰ دقیقه در سرعت ۶۰۰۰ rpm ساتریفیوژ شد و فاز بالایی آن به مدت ۲۴ ساعت در تاریکی و در دمای اتاق نگهداری شد. بعد از ۲۴ ساعت جذب هر یک از نمونه‌ها در طول موج ۵۵۰ نانومتر توسط

دستگاه اسپکتروفتومتر خوانده شد. برای محاسبه غلظت آنتوسیانین از ضریب خاموشی $150 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ استفاده شد (Mita *et al.*, 1997).

فعالیت آنتی‌اکسیدانی به روش (FRAP) Ferric Reducing Antioxidant Power

برای اندازه‌گیری FRAP ۵۰ میکرولیتر از عصاره متانولی تهیه شده برای اندازه‌گیری فنل و فلاونوئید، با ۲/۵ میلی‌لیتر معرف FRAP (شامل ۲۰ میلی‌لیتر بافر استات ۳۰۰ میلی‌مولار (pH=۳/۶)، ۲ میلی‌لیتر TPTZ (tris-pyridyl-s-triazine) ۱۰ میلی‌مولار، ۴۰ میلی‌لیتر HCl و ۲ میلی‌لیتر $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ۲۰ میلی‌مولار) مخلوط گردید. بعد از ۴ دقیقه، جذب نمونه‌ها در طول موج ۵۹۳ نانومتر نسبت به شاهد اندازه‌گیری شد (Benzie and Strain, 1996).

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

آزمایش به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی و با سه تکرار انجام شد. تجزیه آماری داده‌ها با محاسبه میانگین داده‌های سه تکرار و محاسبه خطای استاندارد (SE) توسط نرم افزار آماری SAS نسخه ۹/۴ انجام شد. تجزیه واریانس (ANOVA) با استفاده از روش مدل خطی عمومی (GLM) انجام شد. آزمون دانکن برای تعیین اهمیت آماری، در سطح احتمال $P < 0.05$ اعمال شد. نمودارها در MS Excel 2013 رسم شدند.

نتایج و بحث

جدول ۱ نتایج تجزیه واریانس صفات مطالعه شده را نشان می‌دهد.

جدول ۱- تجزیه و تحلیل واریانس خصوصیات رشدی، فنل کل برگ و ریشه، فلاونوئید کل برگ و ریشه، آنتوسیانین، FRAP برگ، و FRAP ریشه تحت تأثیر سطوح تیمارهای UVB و سالیسیلیک اسید

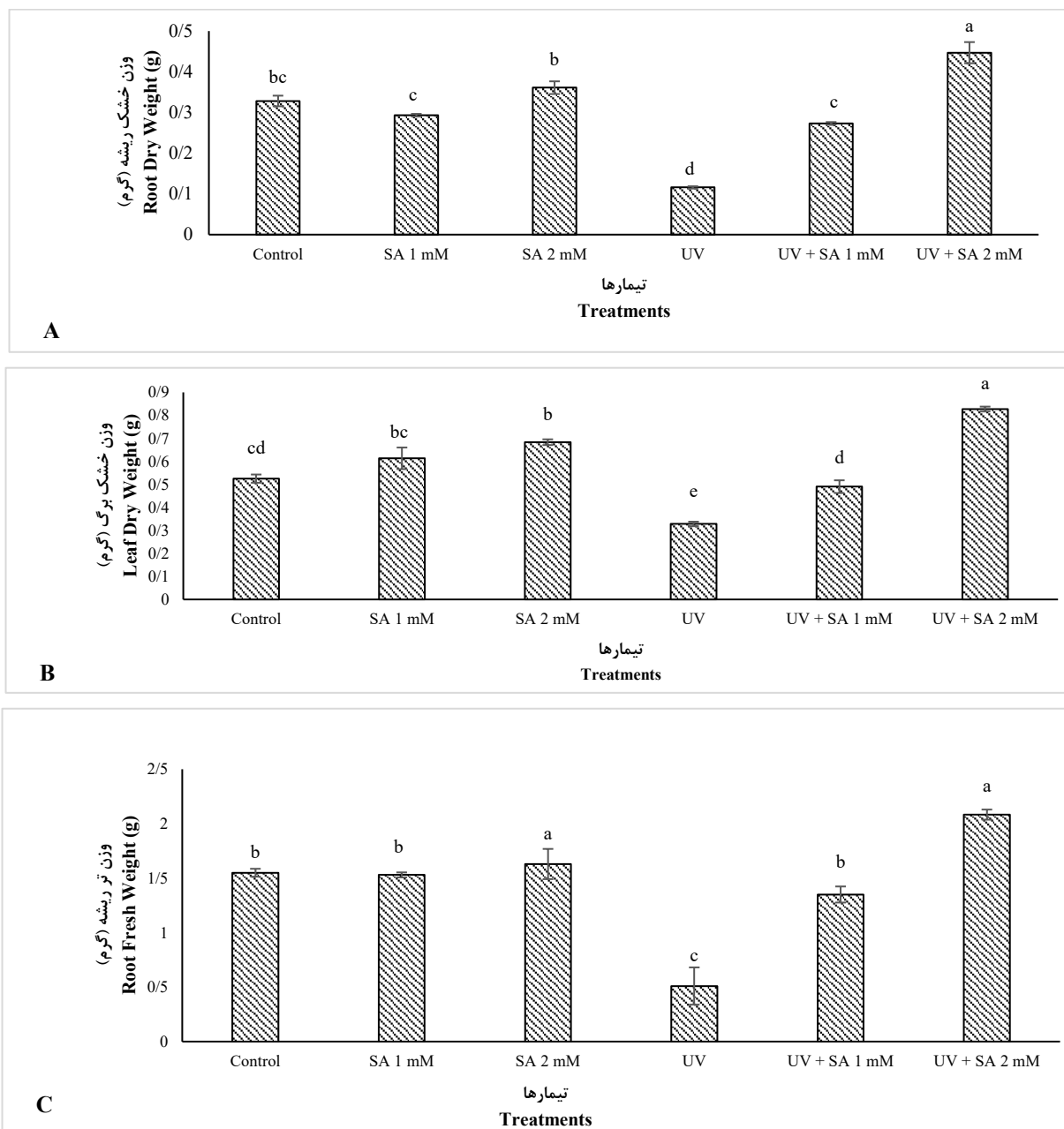
میانگین مربعات										
منابع تغییرات	درجه آزادی	وزن تر ریشه	وزن خشک ریشه	وزن تر برگ	وزن خشک برگ	فنل کل ریشه	فنل کل برگ	فلاونوئید ریشه	فلاونوئید برگ	آنتوسیانین
تکرار	۲	۰/۰۳ ^{ns}	۰/۰۱ ^{ns}	۰/۰۵ ^{ns}	۰/۰۰۱ ^{ns}	۰/۰۳ ^{ns}	۰/۰۰۳ ^{ns}	۰/۰۰ ^{ns}	۰/۰۳ ^{ns}	۰/۲۷ ^{ns}
UV-B (A)	۱	۰/۲۹ ^{**}	۰/۰۱ ^{**}	۳/۷۹ ^{**}	۰/۰۱۵ [*]	۳/۱۱ ^{**}	۹/۸۸ ^{**}	۰/۱۷ ^{**}	۵/۲۷ ^{**}	۰/۵۱ ^{ns}
سالیسیلیک اسید (B)	۲	۱/۰۲۵ ^{**}	۰/۰۵ ^{**}	۴/۶۱ ^{**}	۰/۱۶ ^{**}	۰/۵۱ ^{**}	۰/۸۸ ^{**}	۰/۰۳ ^{**}	۰/۲۵ ^{**}	۴/۰۰ ^{**}
A×B	۲	۰/۸۴ ^{**}	۰/۰۳۴ ^{**}	۱/۳۸ ^{**}	۰/۰۵ ^{**}	۰/۱۳ ^{**}	۰/۰۰۷ ^{ns}	۰/۰۰۱ ^{ns}	۰/۰۲۴ ^{ns}	۰/۴۲ ^{ns}
خطا	۱۰	۰/۰۳	۰	۰/۰۸	۰/۰۰۲	۰/۰۶	۰/۰۳۶	۰/۰۰۹	۰/۳۰	۰/۲۹
ضریب تغییرات (%)	۱۲/۰۱	۷/۷۷	۱۰/۳۸	۸/۰۸	۳/۷۱	۹/۱۵	۰/۲۴	۱۵/۳۸	۱۱/۰۹	۴/۴۶

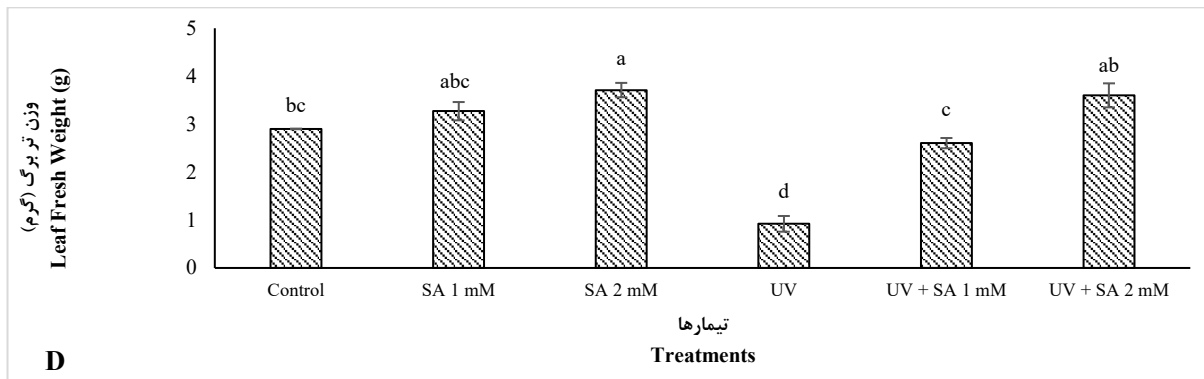
ns: تفاوت غیر معنی‌دار، *: معنی‌دار در سطح احتمال $p < 0.05$ **: معنی‌دار در سطح احتمال $p < 0.01$

اثر UV-B و سالیسیلیک اسید بر شاخص‌های رشدی

نتایج حاصل از تجزیه آماری داده‌ها نشان داد که UV-B تأثیر معنی‌داری در سطح احتمال ۵٪ بر وزن خشک ریشه و در سطح احتمال ۱٪ بر وزن تر ریشه و وزن تر و خشک برگ در گیاه شیرین بیان داشت. به طوریکه این تنش باعث کاهش قابل توجهی در وزن تر و خشک ریشه و برگ در گیاه شیرین بیان شد. تحت تنش UV-B وزن خشک ریشه و برگ به ترتیب ۶۴/۶ و ۳۷/۵٪ و وزن تر ریشه و برگ به ترتیب ۶۷٪ و ۶۸٪ در مقایسه با گیاهان شاهد کاهش یافت. همچنین وزن تر و خشک ریشه و برگ در تیمارهای ۱ mM و ۲ mM سالیسیلیک اسید در مقایسه با گیاهان شاهد افزایش یافت. بررسی آماری داده‌ها نشان داد که افزایش معنی‌دار در شاخص‌های رشدی تنها در شاخص وزن تر و خشک برگ در تیمار ۲ mM سالیسیلیک اسید معنی‌دار بوده است. وزن تر و خشک ریشه و برگ در تیمار توام سالیسیلیک اسید ۱ mM و ۲ mM و UV-B در مقایسه با نمونه های تنش UV-B به صورت تنها یک روند افزایشی را نشان داد. این افزایش در وزن تر و خشک ریشه و برگ در مقایسه با نمونه های تحت تنش تفاوت معنی‌دار نشان داد. همچنین بر اساس آزمون GLM اثرات متقابل UV-B و سالیسیلیک اسید در تمامی شاخص‌های رشدی (وزن تر و خشک ریشه و برگ) در سطح احتمال $p < 0.01$ معنی‌دار بود (جدول ۱ و شکل ۱). به طور کلی پذیرفته شده است که افزایش UV-B با کاهش رشد و تولید زیست توده (De la Rosa *et al.*, 2003) همراه است. تنظیم رشد گیاه یک فرآیند بسیار پیچیده است و تابش UV-B به عنوان یک عنصر حیاتی شناخته می‌شود که با اختلال در فتوسنتز برگ، دسترسی به محصولات فتوسنتزی را کاهش می‌دهد. این اختلال، مکانیسم اصلی اثرات مضر تابش UV-B بر رشد گیاه را تشکیل می‌دهد (Safshekan *et al.*, 2025). تحقیقات نشان داده است که کاهش و تغییر در رشد ریشه تحت تابش UV به تغییرات در سطح مولکول‌های سیگنالینگ هورمونی، مولکول‌های سیگنالینگ اکسید نیتریک (NO) و گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) نسبت داده می‌شود که ناشی از قرار گرفتن در معرض تابش UV-B است. گزارش شده است که کاهش رشد گیاه تحت تنش UV-B در نتیجه تغییر در سرعت و مدت تقسیم و طول شدن سلولی، شاید به دلیل مهار ایندول استیک اسید (IAA)، یک تنظیم‌کننده کلیدی رشد گیاه، اتفاق می‌افتد (Poorter *et al.*, 2019). قرار گرفتن در معرض تابش UV باعث تغییرات مورفولوژیکی قابل توجهی در گیاهان، از جمله تغییر در شکل برگ، افزایش شاخه‌های جانبی، کاهش وزن، مساحت سطح برگ کوچکتر و ارتفاع کوتاه‌تر گیاه می‌شود (Azadi *et al.*, 2021). این اثرات در درجه اول تحت تأثیر هورمون‌های گیاهی، فرآیندهای تخریب نوری و کاهش فعالیت آنزیم‌های خاص قرار دارند (Balouchi *et al.*, 2009). فعالیت آنزیم‌هایی مانند اکسین اکسیداز می‌تواند از طول شدن سلول جلوگیری کند و منجر به کندتر شدن سرعت رشد شود (Xu *et al.*, 2019). اخیراً گزارش شده است که در مقایسه با گیاهان شاهد، تابش UV-B باعث کاهش معنی‌دار وزن تر و خشک ریشه‌ها در گیاه نعناع فلفلی (*Mentha piperita* L.) می‌شود. همچنین محلول پاشی سالیسیلیک اسید باعث افزایش معنی‌دار این صفات می‌شود. به علاوه، تحت تنش UV-B، کاربرد سالیسیلیک اسید وزن تر ریشه را در مقایسه با گیاهان تحت تنش به طور معنی‌داری

افزایش می‌دهد (Karamdar *et al.*, 2023). در مطالعه حاضر شاخص‌های رشدی وزن تر و خشک برگ و ریشه، با تیمارهای ترکیبی سالیسیلیک اسید با UV-B بهبود یافتند. به نظر می‌رسد که سالیسیلیک اسید به عنوان عامل تعدیل‌کننده در هنگام قرار گرفتن گیاهان در معرض تابش UV عمل می‌کند. نتایج مطالعات نشان می‌دهد که سالیسیلیک اسید با افزایش تعداد برگ‌ها، افزایش فعالیت آنزیم روبیسکو، افزایش سطح برگ و افزایش میزان رنگیزه‌های فتوسنتزی باعث افزایش ظرفیت فتوسنتزی و بنابراین افزایش رشد و وزن گیاه می‌شود (Ghassemi-Golezani *et al.*, 2022) که با نتایج حاصل از این مطالعه همخوانی دارد.





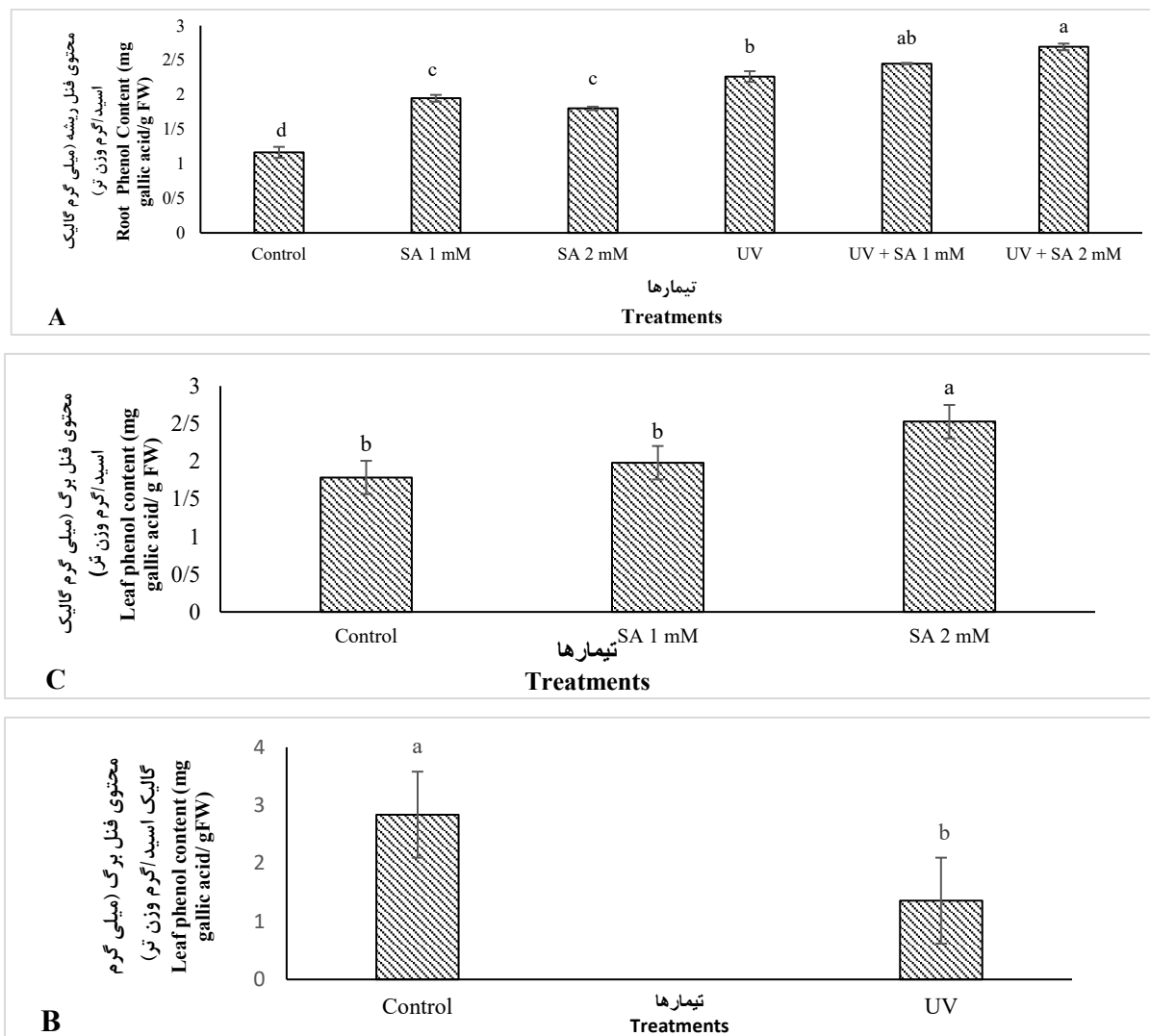
شکل ۱- وزن خشک ریشه (A) و برگ (B) و وزن تر ریشه (C) و برگ (D) در گیاه شیرین بیان تحت سطوح مختلف سالیسیلیک اسید (۰، ۱ و ۲ mM) و تیمار UV-B. Control (شاهد)، SA 1 mM (سالیسیلیک اسید ۱ mM)، SA 2 mM (سالیسیلیک اسید ۲ mM)، UV (UV-B)، UV+ SA 1 mM (سالیسیلیک اسید ۱ mM+UV-B)، UV+ SA 2 mM (سالیسیلیک اسید ۲ mM+UV-B). داده‌ها میانگین $\pm$ SE (n=3) را نشان می‌دهند. حروف مختلف نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار ($P < 0.05$) بین تیمارها مطابق آزمون دانکن می‌باشد.

Figure 1- Root (A) and leaf (B) dry weight, and root (C) and leaf (D) fresh weight in licorice plants under different levels of salicylic acid (0, 1, and 2 mM) and UV-B treatment. Control, SA 1 mM (salicylic acid 1 mM), SA 2 mM (salicylic acid 2 mM), UV (UV-B), UV+ SA 1 mM (salicylic acid 1 mM+UV-B), UV+ SA 2 mM (salicylic acid 2 mM+UV-B). Data represent mean $\pm$ SE (n=3). Different letters indicate a significant difference ($P < 0.05$) between treatments according to the Duncan test.

اثر UV-B و سالیسیلیک اسید بر محتوای فنل کل

بر اساس نتایج (جدول ۱) اثر تنش UV-B بر محتوای فنل کل ریشه و برگ گیاه شیرین بیان معنی‌داری ($p < 0.01$) بود. به طوریکه تنش UV-B موجب افزایش معنی‌دار محتوای فنل کل در ریشه و برگ گیاه شیرین بیان شد. محتوای فنل در تیمارهای ۱ mM و ۲ mM سالیسیلیک اسید ریشه در مقایسه با گیاهان شاهد افزایش یافت. بررسی آماری داده‌ها نشان داد که افزایش در محتوای فنل کل برگ در تیمار ۲ mM سالیسیلیک اسید نسبت به شاهد معنی‌دار ($P < 0.05$) بود. همچنین بر اساس آزمون GLM اثرات متقابل UV-B و سالیسیلیک اسید در ریشه در سطح احتمال ۱٪ معنی‌دار و در برگ غیر معنی‌دار بود. کاربرد سالیسیلیک اسید در هردو غلظت تحت تنش UV، موجب افزایش معنی‌دار فنل کل ریشه در مقایسه با تنش UV شد. ترکیبات فنلی به عنوان یکی از گسترده‌ترین گروه‌های متابولیت‌های ثانویه در گیاهان، دفاع در برابر طیف وسیعی از تنش‌های غیرزیستی، به ویژه تابش UV-B را تشکیل می‌دهند (Kumar *et al.*, 2023). گیاهان برای کاهش آسیب اکسیداتیو ناشی از تنش UV محیطی، گیاهان مکانیسم‌های دفاعی آنتی‌اکسیدانی خود را با افزایش سطح ترکیبات فنلی، افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدانی و بهبود مهار رادیکال‌های آزاد DPPH تنظیم می‌کنند (Moradi Rikabad *et al.*, 2019). این ترکیبات با جلوگیری از نفوذ اشعه UV به بافت‌های حساس و با عمل به عنوان آنتی‌اکسیدان برای خنثی کردن رادیکال‌های آزاد، نقش محافظتی ایفا می‌کنند و در نتیجه تنش اکسیداتیو را کاهش می‌دهند (Zhang *et al.*, 2017). اخیراً نشان داده شده است که تیمار UV-B با تنظیم بالای فعالیت آنزیم‌های مرتبط مانند فنیل آلانین آمونیلایز (PAL)، سینامیک اسید ۴-هیدروکسیلاز (C4H) و بیان ژن‌ها، منجر

به تجمع اسیدهای فنولیک در گیاهچه‌های جو می‌شود و در نتیجه به تقویت سیستم آنتی‌اکسیدانی کمک می‌کند (Wang *et al.*, 2022). مشاهده شده است که در گیاه دارویی سرخارگل (*Echinacea purpurea* L.) در پاسخ به کاربرد سالیسیلیک اسید محتوای اسیدهای فنلی مانند کلروژنیک اسید افزایش می‌یابد (Mohebbi *et al.*, 2021). گزارش شده است که تنش UV-B و سالیسیلیک به تنهایی یا در ترکیب با هم محتوای فنل کل را در گیاه مرزه (*Satureja hortensis* L.) افزایش می‌دهند (Abrun *et al.*, 2016).

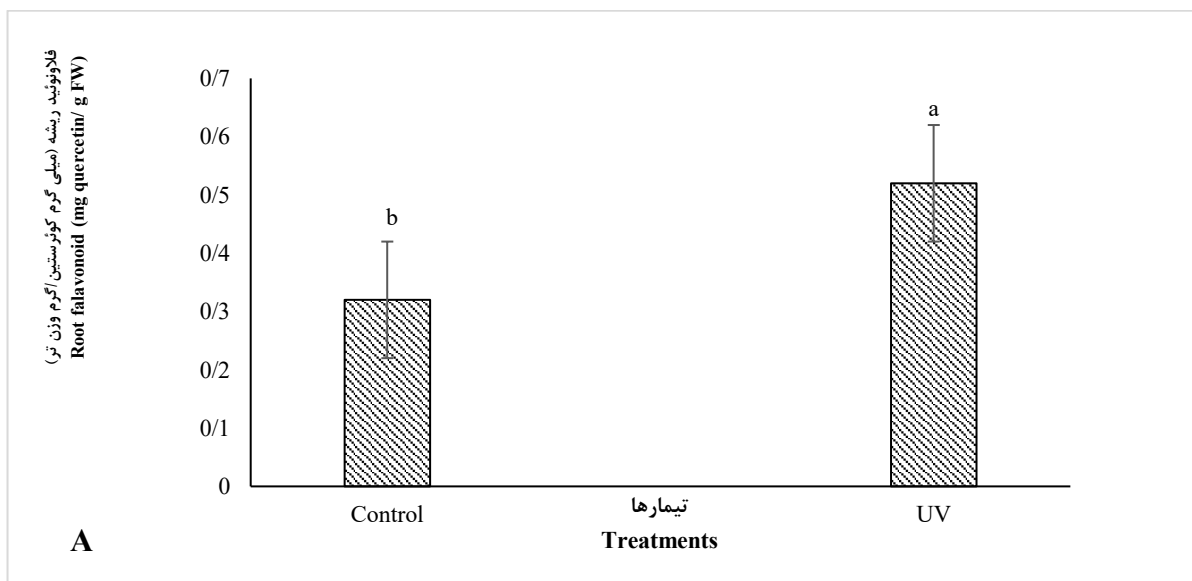


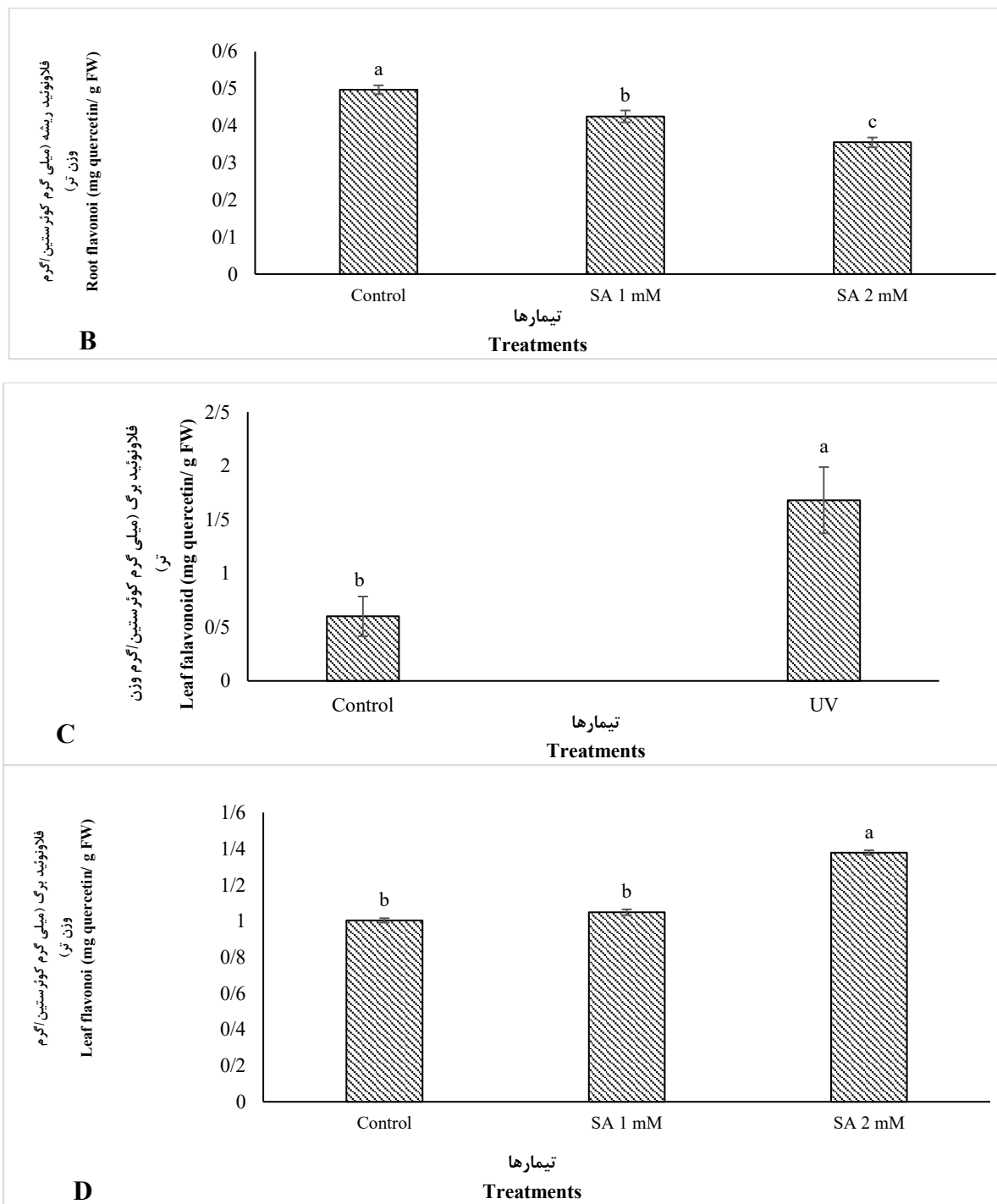
شکل ۲. محتوای فنل کل ریشه (A) و برگ (B, C) در گیاه شیرین بیان تحت سطوح مختلف سالیسیلیک اسید (۰، ۱ و ۲ mM) و تیمار UV-B. Control (شاهد)، SA 1 mM (سالیسیلیک اسید 1 mM)، SA 2 mM (سالیسیلیک اسید 2 mM)، UV (UV-B)، UV+ SA 1 mM (سالیسیلیک اسید 1 mM+UV-B)، UV+ SA 2 mM (سالیسیلیک اسید 2 mM+UV-B). داده‌ها میانگین $\pm$ SE (n=3) را نشان می‌دهند. حروف مختلف نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار ($p < 0.05$) بین تیمارها مطابق آزمون دانکن می‌باشد.

Figure 2. Total phenolic content of root (A) and leaf (B, C) in licorice plants under different levels of salicylic acid (0, 1, and 2 mM) and UV-B treatment. Control, SA 1 mM (salicylic acid 1 mM), SA 2 mM (salicylic acid 2 mM), UV (UV-B), UV+ SA 1 mM (salicylic acid 1 mM+UV-B), UV+ SA 2 mM (salicylic acid 2 mM+UV-B). Data represent mean $\pm$ SE (n=3). Different letters indicate a significant difference ($P < 0.05$) between treatments according to the Duncan test.

اثر UV-B و سالیسیلیک اسید بر محتوای فلاونوئید کل

بر اساس نتایج (جدول ۱) اثر تنش UV-B بر محتوای فلاونوئید کل در ریشه و برگ گیاه شیرین بیان معنی‌دار ($p < 0.01$) بود. به طوریکه تنش UV-B موجب افزایش معنی‌دار محتوای فلاونوئید کل در ریشه و برگ گیاه شیرین بیان شد. محتوای فلاونوئید ریشه در تیمارهای ۱ mM و ۲ mM سالیسیلیک اسید در مقایسه با گیاهان شاهد به طور معنی‌دار کاهش یافت ($p < 0.01$). همچنین نتایج نشان داد که محتوای فلاونوئید کل برگ در تیمار ۲ mM سالیسیلیک اسید در مقایسه با گیاهان بدون تیمار به طور معنی‌داری افزایش یافت. در این مطالعه بر اساس آزمون GLM اثرات متقابل UV-B و سالیسیلیک اسید در ریشه و برگ در سطح احتمال ۵٪ معنی‌دار نبود (شکل ۳). یافته‌ها نشان داده است که تیمار UV-B به طور قابل توجهی محتوای فلاونوئیدها را در جوانه‌های گندم سیاه (*Fagopyrum esculentum*) افزایش می‌دهد، در نتیجه سیستم آنتی‌اکسیدانی جوانه‌های گندم سیاه را تقویت می‌کند (Tian et al., 2024). محققان نشان دادند که محلول‌پاشی برگ‌گی اسید سالیسیلیک، محتوای فنلی و فلاونوئیدی برگ‌های اسفناج (*Spinacia oleracea*) را ظرف چند روز پس از تیمار به طور قابل توجهی افزایش می‌دهد، که نشان دهنده یک استراتژی سریع برای افزایش سنتز متابولیت‌های ثانویه است (Singh, 2023). گزارش شده است که در گیاهان دندروبیوم (*Dendrobium officinale* L.) تابش UV-B و کاربرد سالیسیلیک اسید به تنهایی یا در ترکیب با یکدیگر محتوای فلاونوئید کل را در مقایسه با گیاهان شاهد افزایش می‌دهد. همچنین سالیسیلیک اسید همراه با تیمارهای UV-B محتوای فلاونوئید کل را در مقایسه با تیمار UV-B به تنهایی بیشتر افزایش می‌دهد، که با نتایج این پژوهش مطابقت دارد. این بدان معناست که سالیسیلیک اسید می‌تواند سنتز فلاونوئیدها را در گیاهان تسریع کند و گیاهان را از تنش UV-B محافظت کند (Tajik et al., 2019; Feng et al., 2021). به این صورت که افزایش غلظت ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی عموماً با افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدانی و ظرفیت بیشتر برای مهار رادیکال‌های آزاد همراه است (Alizadeh et al., 2021).



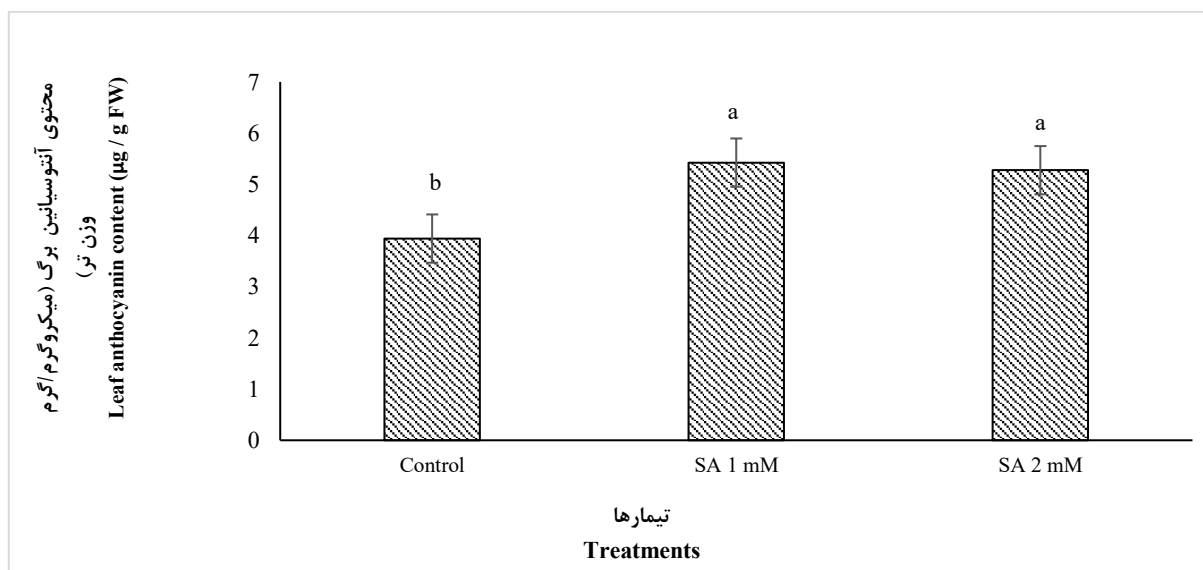


شکل ۳- محتوای فلاونوئید کل ریشه (A, B) و برگ (C, D) در گیاه شیرین بیان تحت سطوح مختلف سالیسیلیک اسید (۰، ۱ و ۲ mM) و تیمار UV-B. Control (شاهد)، SA 1 mM (سالیسیلیک اسید 1 mM)، SA 2 mM (سالیسیلیک اسید 2 mM)، UV (UV-B)، UV+ SA 1 mM (سالیسیلیک اسید 1 mM+UV-B)، UV+ SA 2 mM (سالیسیلیک اسید 2 mM+UV-B). داده‌ها میانگین $\pm$ SE (n=3) را نشان می‌دهند. حروف مختلف نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار ($P < 0.05$) بین تیمارها مطابق آزمون دانکن می‌باشد.

Figure 3- Total flavonoid content of root (A, B) and leaf (C, D) in licorice plants under different levels of salicylic acid (0, 1, and 2 mM) and UV-B treatment. Control, SA 1 mM (salicylic acid 1 mM), SA 2 mM (salicylic acid 2 mM), UV (UV-B), UV+ SA 1 mM (salicylic acid 1 mM+UV-B), UV+ SA 2 mM (salicylic acid 2 mM+UV-B). Data represent mean $\pm$ SE (n=3). Different letters indicate a significant difference ($p < 0.05$) between treatments according to the Duncan test.

اثر UV-B و سالیسیلیک اسید بر محتوای آنتوسیانین

اثر تنش UV-B بر محتوای آنتوسیانین در برگ گیاه شیرین بیان معنی‌دار ($P < 0.05$) نبود. محتوای آنتوسیانین در تیمارهای ۱ mM و ۲ mM سالیسیلیک اسید در مقایسه با گیاهان شاهد به طور معنی‌داری افزایش یافت ($P < 0.01$). در این مطالعه اثرات متقابل UV-B و سالیسیلیک اسید در سطح احتمال ۵٪ معنی‌دار نبود (جدول ۱، شکل ۴). آنتوسیانین‌ها رنگدانه‌های محلول در آب در گیاهان هستند که به دلیل نقش محافظت نوری خود در برابر آسیب‌های مهار نوری و اکسیداسیون نوری در نور زیاد شناخته شده‌اند (Zheng *et al.*, 2021). در گیاهان گندم کاربرد بیرونی سالیسیلیک اسید منجر به افزایش محتوای آنتوسیانین شد (Kobyletska and Kavulych, 2024). در گیاه نعنای فلفلی میزان آنتوسیانین تحت تابش پرتوهای UV-B و کاربرد سالیسیلیک اسید تحت این تنش در مقایسه با گیاهان شاهد به طور معنی‌داری افزایش یافت (Karamdar *et al.*, 2023). بر عکس نتایج این پژوهش، اخیراً بیان شده است که در گیاه دارویی بادرشبو (*Dracocephalum moldavica* L.) محتوای آنتوسیانین با کاربرد سالیسیلیک اسید در شرایط تابش UV-B در مقایسه با گیاهان شاهد کاهش می‌یابد (Amirian *et al.*, 2025).



شکل ۴- محتوای آنتوسیانین برگ در گیاه شیرین بیان تحت سطوح مختلف سالیسیلیک اسید (۰، ۱ و ۲ mM). Control (شاهد)، SA 1 mM (سالیسیلیک اسید ۱ mM)، SA 2 mM (سالیسیلیک اسید ۲ mM). داده‌ها میانگین $\pm$ SE (n=3) را نشان می‌دهند. حروف مختلف نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار ($P < 0.05$) بین تیمارها مطابق آزمون دانکن می‌باشد.

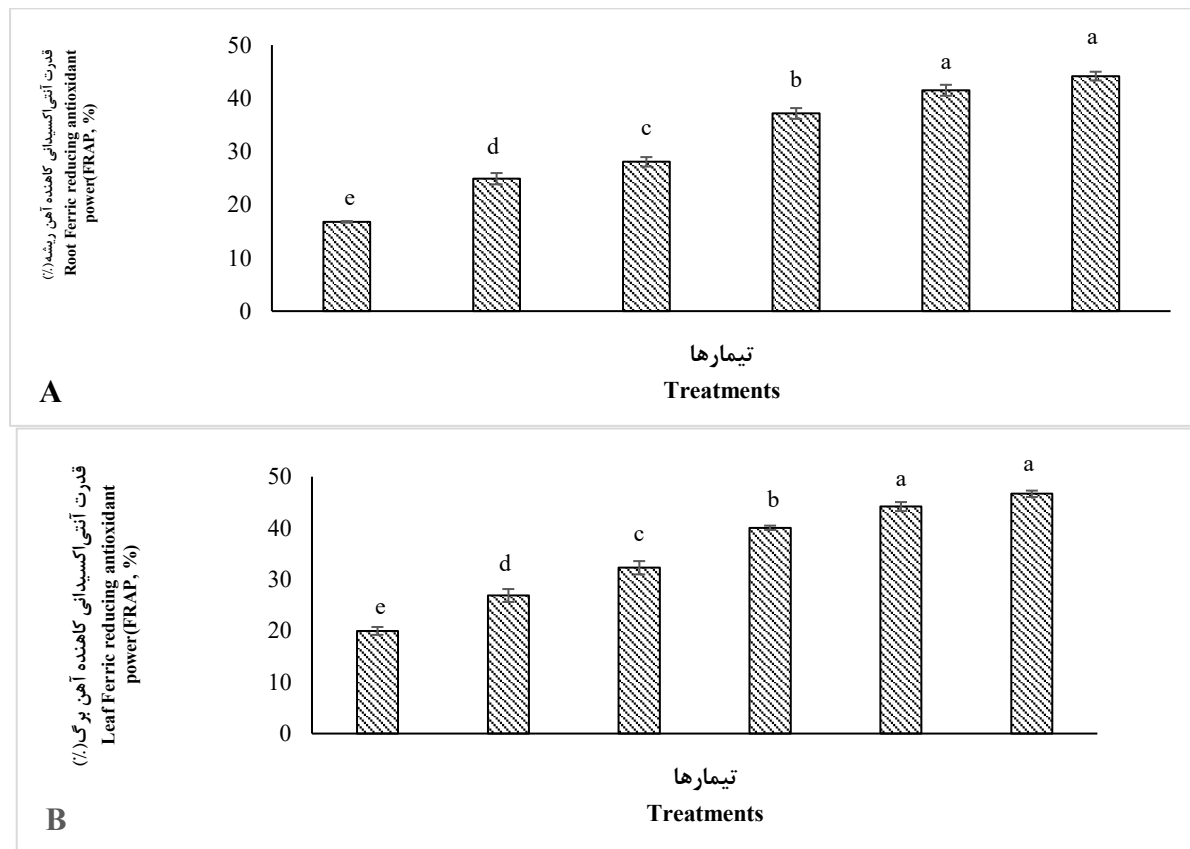
Figure 4- Anthocyanin content in licorice plant leaves under different levels of salicylic acid (0, 1, and 2 mM). Control, SA 1 mM (salicylic acid 1 mM), SA 2 mM (salicylic acid 2 mM). Data represent mean $\pm$ SE (n=3). Different letters indicate a significant difference ($P < 0.05$) among treatments according to the Duncan's test.

اثر UV-B و سالیسیلیک اسید بر فعالیت آنتی اکسیدانی به روش FRAP

تنش UV-B موجب افزایش معنی‌دار ($p < 0.01$) فعالیت آنتی اکسیدانی به روش FRAP در ریشه و برگ گیاه شیرین بیان

گردید. بین تیمارهای شاهد و سالیسیلیک اسید بر فعالیت آن‌تی اکسیدانی به روش FRAP در ریشه و برگ این گیاه نیز تفاوت معنی‌داری وجود داشت ($p < 0.01$). به این صورت که تیمار سالیسیلیک اسید موج افزایش فعالیت آن‌تی اکسیدان به روش FRAP شد. در این مطالعه اثرات متقابل UV-B و سالیسیلیک اسید در ریشه و برگ در سطح احتمال ۵٪ معنی‌دار بود (جدول ۱، شکل ۵). مشابه نتایج این مطالعه، محققان گزارش کردند که پس از اعمال تابش UV-B، فعالیت آن‌تی اکسیدانی برگ‌های ریحان شیرین (*Ocimum basilicum* L.) به طور قابل توجهی افزایش می‌یابد. این افزایش می‌تواند مربوط به افزایش متابولیت‌های ثانویه مانند فلاونوئیدها و اسیدهای فنلی در گیاهان تیمار شده با UV-B باشد (Ghasemzadeh et al., 2016). نتایج به دست آمده از مطالعه حاضر با نتایج به دست آمده توسط Tian و همکاران (۲۰۲۴) مطابقت دارد که تیمار UV-B سیستم آن‌تی اکسیدانی جوانه‌های گندم سیاه را تقویت کرد. این افزایش با افزایش قابل توجه فعالیت‌های مهار رادیکال‌های ABTS، DPPH و FRAP در جوانه‌های ۳ روزه تحت تابش UV-B تأیید شد. تیمار سالیسیلیک اسید باعث افزایش محتوی فنلی و در نتیجه افزایش فعالیت آن‌تی اکسیدانی به روش FRAP در گیاه مریم گلی (*Salvia coccinea* L.) شد (Grzeszczuk et al., 2018). از بسیاری جهات، عملکرد محافظتی سالیسیلیک اسید از طریق عملکرد عوامل غیرزیستی و زیستی بر روی گیاهان با نقش آن در تنظیم بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه مرتبط است (Ali, 2021). تیمار برگ‌ی با اسید سالیسیلیک منجر به افزایش محتوای اسیدهای هیدروکسی سینامیک، فلاونوئیدها، ترکیبات فنلی کل، فعالیت آن‌تی اکسیدانی (به روش سنجش‌های DPPH، ABTS و FRAP) و در مقایسه با گیاهان تیمار نشده می‌شود (Skrypnik et al., 2022). نتایج تأثیر مثبت تیمار برگ‌ی سالیسیلیک اسید بر محتوای کل ترکیبات فنلی، اسید فنلی و فلاونوئیدها با داده‌های منتشر شده قبلی مطابقت دارد (Linić et al., 2021). مشخص است که اسید سالیسیلیک فعالیت فنیل آلانین آمونیاک-لیاز (PAL)، مهم‌ترین آنزیم دخیل در مراحل اولیه بیوسنتز ترکیبات فنلی را افزایش می‌دهد (Estaji and Niknam, 2020). برای گیاهان جنس مریم‌گلی (*Salvia officinalis*، *Salvia virgate*، *Salvia miltiorrhiza*)، نشان داده شد که استفاده از اسید سالیسیلیک برون‌زا منجر به فعال شدن بیان PAL و ژن‌های دخیل در سنتز فلاونوئید می‌شود (Xu et al., 2015; Li et al., 2016). نتایج مطالعات Singh (۲۰۲۳) همبستگی مثبت ترکیبات فنولی با فعالیت آن‌تی اکسیدانی (مهار رادیکال‌های آزاد در برابر رادیکال‌های DPPH و FRAP) را نشان می‌دهد. همچنین گزارش کرده است که تجمع این ترکیبات وابسته به غلظت و زمان است و غلظت بالای سالیسیلیک اسید در مقایسه با غلظت پایین در القای سنتز فنولیک‌ها و فلاونوئیدها مؤثرتر است. برای غلظت‌های بالا، فعالیت آن‌تی اکسیدانی در روز دوم تیمار حداکثر بود که تا روز پنجم حفظ شد و پس از آن با افزایش دوره زمانی، فعالیت کاهش یافت. غلظت‌های پایین در حفظ فعالیت آن‌تی اکسیدانی با گذشت زمان مؤثر بودند و تنها پس از روز دهم کاهش کمی نشان دادند. در این مطالعه نیز به نظر می‌رسد افزایش فعالیت آن‌تی اکسیدانی تحت تابش UV-B با کاربر

سالیسیلیک اسید در مقایسه با تیمار تنها UV-B می‌تواند ناشی از نقش مثبت ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی در طول تیماردهی با سالیسیلیک اسید، در کاهش اثرات مضر این تنش باشد.



شکل ۵- فعالیت آنتی اکسیدانی به روش FRAP در ریشه (A) و برگ (B) گیاه شیرین بیان تحت سطوح مختلف سالیسیلیک اسید (۰، ۱ و ۲ mM) و تیمار UV-B (شاهد)، SA 1 mM (سالیسیلیک اسید 1 mM)، SA 2 mM (سالیسیلیک اسید 2 mM)، UV (UV-B)، UV+ SA 1 mM (سالیسیلیک اسید 1 mM+UV-B)، UV+ SA 2 mM (سالیسیلیک اسید 2 mM+UV-B). داده‌ها میانگین $\pm$ SE (n=3) را نشان می‌دهند. حروف مختلف نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار ($P < 0.05$) بین تیمارها مطابق آزمون دانکن می‌باشد.

Figure 5- Antioxidant activity (FRAP assay) in the root (A) and leaf (B) of the licorice plant under different levels of salicylic acid (0, 1, and 2 mM) and UV-B treatment. Control, SA 1 mM (salicylic acid 1 mM), SA 2 mM (salicylic acid 2 mM), UV (UV-B), UV+ SA 1 mM (salicylic acid 1 mM+UV-B), UV+ SA 2 mM (salicylic acid 2 mM+UV-B). Data represent mean $\pm$ SE (n=3). Different letters indicate a significant difference ($P < 0.05$) among treatments according to the Duncan test.

نتیجه گیری کلی

این مطالعه نشان داد که تنش UV-B به‌طور معنی‌دار رشد گیاه شیرین بیان را از طریق کاهش وزن تر و خشک ریشه و برگ مختل می‌کند، اما تولید متابولیت‌های ثانویه نظیر فنل‌ها و فلاونوئیدها را به‌عنوان بخشی از پاسخ دفاعی گیاه افزایش می‌دهد. کاربرد سالیسیلیک اسید، به‌ویژه در ۲ mM، اثرات منفی UV-B را تعدیل کرده و با بهبود شاخص‌های رشدی و افزایش محتوای فنل، فلاونوئید و آنتوسیانین، تحمل گیاه را تقویت نمود. افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدانی FRAP در تیمارهای ترکیبی UV-B و

سالیسیلیک اسید احتمالاً ناشی از نقش محافظتی متابولیت‌های ثانویه در کاهش تنش اکسیداتیو است. این نتایج بر پتانسیل سالیسیلیک اسید به‌عنوان یک تنظیم‌کننده رشد در بهبود مقاومت شیرین‌بیان به تنش UV-B تأکید دارد و می‌تواند به‌عنوان راهکاری برای افزایش تولید متابولیت‌های با ارزش دارویی در این گیاه مورد استفاده قرار گیرد. پیشنهاد می‌شود تحقیقات آتی بر مکانیسم‌های مولکولی سالیسیلیک اسید و اثرات بلندمدت آن در شرایط تنش متمرکز شوند.

منابع

- Abrun, A., Fattahi, M., & Hassani, A. (2016).** Salicylic acid and UV-B/C radiation effects on growth and physiological traits of *Satureja hortensis* L. *Notulae Scientia Biologicae*, 8(2), 170–175.
- Ali, B. (2021).** Salicylic acid: An efficient elicitor of secondary metabolite production in plants. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 31, 101884.
- Alizadeh, S., Gharagoz, S. F., Pourakbar, L., Moghaddam, S. S., & Jamalomid, M. (2021).** Arbuscular mycorrhizal fungi alleviate salinity stress and alter phenolic compounds of Moldavian balm. *Rhizosphere*, 19, 100417.
- Amirian, V., Kazemi, E.M., & Shoja, H.M. (2025).** Interactive impacts of salicylic acid and UV-B radiation on biochemical and anatomical characteristics of the Moldavian dragonhead (*Dracocephalum moldavica* L.). *Russian Journal of Plant Physiology*, 72(1), 11.
- Arsule, A.A., Nigam, B., & Chaudhary, I.J. (2024).** Comparative effectiveness of ascorbic acid, salicylic acid and orange juice on soybean cultivar (*Glycine Max* L.) under UV-B (ultraviolet radiation) stress. *Journal of Medicinal Plants Studies*, 12(1), 203–213.
- Azadi, M., Moghaddam, S.S., Rahimi, A., Pourakbar, L. & Popović-Djordjević, J. (2021).** Biosynthesized silver nanoparticles ameliorate yield, leaf photosynthetic pigments, and essential oil composition of garden thyme (*Thymus vulgaris* L.) exposed to UV-B stress. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 9(5), 105919.
- Bagheri, M., Motafakker Azad, R., Salehi Lisar, S.Y., & Talebpour, A.H. (2020).** Effect of different intensities of ultraviolet (UV) radiation on growth and some secondary metabolites of hairy St. John's wort (*Hypericum hirsutum* L.). *Technology of Medicinal and Aromatic Plants of Iran*, 3(1), 92–114. (In Persian)
- Balouchi, H.R., Sanavy, S.M., Emam, Y., & Dolatabadian, A. (2009).** UV radiation, elevated CO₂ and water stress effect on growth and photosynthetic characteristics in durum wheat. *Plant, Soil and Environment*, 55(10), 443–453.
- Benzie, I.F.F., & Strain, J.J. (1996).** The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: the FRAP assay. *Analytical Biochemistry*, 239(1), 70–76.
- Bhusal, N., Lee, M., & Lee, H. (2021).** Evaluation of morphological, physiological, and biochemical traits for assessing drought resistance in eleven tree species. *Science of the Total Environment*, 779, 146466.
- Chang, C.C., Yang, M.H., & Wen, H.M. (2002).** Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. *Journal of Food and Drug Analysis*, 10(3), 178–182.
- De La Rosa, T.M., Aphalo, P.J., & Lehto, T. (2003).** Effects of ultraviolet-B radiation on growth, mycorrhizas and mineral nutrition of silver birch (*Betula pendula* Roth) seedlings grown in low-nutrient conditions. *Global Change Biology*, 9(1), 65–73.
- Eghlima, Gh, Sani Khani, M., Kheiry, A., Hadian, J., & Aalaei, M. (2019).** Investigation and comparison of phytochemical and antioxidant activity of different native populations of licorice (*Glycyrrhiza glabra* L.) in Iran. *Ecophytochemistry of Medicinal Plants*, 7(2), 65–77. (In Persian)

El-Saber Batiha, G., Magdy Beshbishy, A., & El-Mleeh, A. (2020). Traditional uses, bioactive chemical constituents, and pharmacological and toxicological activities of *Glycyrrhiza glabra* L. (Fabaceae). *Biomolecules*, 10(3), 352.

Estaji, A., & Niknam, F. (2020). Foliar salicylic acid spraying effect on growth, seed oil content, and physiology of drought-stressed *Silybum marianum* L. plant. *Agricultural Water Management*, 234, 106116.

Feng, X.Y., Cui, D.D., & Zeng, L.J. (2021). Effects of UV-B irradiation alone and in combination with salicylic acid on the growth and active ingredients of *Dendrobium officinale*. *Russian Journal of Plant Physiology*, 68(3), 483–490.

Ghasemzadeh, A., Ashkani, S., & Baghdadi, A. (2016). Improvement in flavonoids and phenolic acids production and pharmaceutical quality of sweet basil (*Ocimum basilicum* L.) by ultraviolet-B irradiation. *Molecules*, 21(9), 1203.

Ghassemi-Golezani, K., & Farhadi, N. (2022). The efficacy of salicylic acid levels on photosynthetic activity, growth, and essential oil content and composition of pennyroyal plants under salt stress. *Journal of Plant Growth Regulation*, 41(5), 1953–1965.

Grzeszczuk, M., Salachna, P., & Meller, E. (2018). Changes in photosynthetic pigments, total phenolic content, and antioxidant activity of *Salvia coccinea* Buc'hoz Ex Etl. induced by exogenous salicylic acid and soil salinity. *Molecules*, 23(6), 1296.

Hollosy, F. (2002). Effects of ultraviolet radiation on plant cells. *Micron*, 33(2), 179–197.

Huang, H., Ullah, F., & Zhou, D.X. (2019). Mechanisms of ROS regulation of plant development and stress responses. *Frontiers in Plant Science*, 10, 800.

Karamdar, S.E., Hosseini, S., & Darvishzadeh, R. (2023). The effect of salicylic acid on some morpho-physiological parameters and gene expression in peppermint (*Mentha piperita* L.) under UV-B radiation. *Journal of Plant Physiology and Biochemistry*, 150, 1–10. (Note: Journal and page numbers assumed based on context as they were not specified in the document).

Kataria, S. (2017). Oxidative stress and antioxidative defence system in plants in response to UV-B stress. In: M. Pessarakli (Ed.), *UV-B Radiation: From Environmental Stressor to Regulator of Plant Growth* (pp. 99–121). Hoboken, NJ: Wiley.

Khan Ahmadi, M., Naghdi Badi, H., Akhondzadeh, Sh., Khalighi Sigaroodi, F., Mehrfarin, A., Shahriari, S., & Haji Aghaee, R. (2013). A review on the medicinal plant licorice (*Glycyrrhiza glabra* L.). *Journal of Medicinal Plants*, 12(46), 1–12. (In Persian)

Kobyletska, M., & Kavulych, Y. (2024). The effect of salicylic acid on the content of ascorbic acid and phenolic compounds in wheat plants. *Studia Biologica*, 18(2), 125–137.

Kumar, K., Debnath, P., & Singh, S. (2023). An overview of plant phenolics and their involvement in abiotic stress tolerance. *Stresses*, 3(3), 570–585.

Kurdziel, M., Filek, M., & Łabanowska, M. (2018). The impact of short-term UV irradiation on grains of sensitive and tolerant cereal genotypes studied by EPR. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 98(7), 2607–2616.

Li, X., Guo, H., Qi, Y., Liu, H., Zhang, X., Ma, P., ... & Dong, J. (2016). Salicylic acid-induced cytosolic acidification increases the accumulation of phenolic acids in *Salvia miltiorrhiza* cells. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 126(2), 333–341.

Linić, I., Mlinarić, S., Brkljačić, L., Pavlović, I., Smolko, A., & Salopek-Sondi, B. (2021). Ferulic acid and salicylic acid foliar treatments reduce short-term salt stress in chinese cabbage by increasing phenolic compounds accumulation and photosynthetic performance. *Plants*, 10(11), 2346. **Maruri-López, I., Aviles-Baltazar, N.Y., & Buchala, A. (2019).** Intra and extracellular journey of the phytohormone salicylic acid. *Frontiers in Plant Science*, 10, 423.

Meda, A., Lamien, C.E., & Romito, M. (2005). Determination of the total phenolic, flavonoid and proline contents in Burkina Fasan honey, as well as their radical scavenging activity. *Food Chemistry*, 91(3), 571–577.

Mita, S., Murano, N., & Akaike, M. (1997). Mutants of *Arabidopsis thaliana* with pleiotropic effects on the expression of the gene for β -amylase and on the accumulation of anthocyanin that are inducible by sugars. *The Plant Journal*, 11(4), 841–851.

Mohebbi, M., Mortazavi, S.N., & Kheiry, A. (2021). Assessment of physiological and phytochemical traits of purple coneflower (*Echinacea purpurea* L. Moench) in response to salicylic acid and methyl jasmonate application. *Medicinal Plant Research*, 11, 1–10.

Rikabad, M. M., Pourakbar, L., Moghaddam, S. S., & Popović-Djordjević, J. (2019). Agrobiological, chemical and antioxidant properties of saffron (*Crocus sativus* L.) exposed to TiO₂ nanoparticles and ultraviolet-B stress. *Industrial Crops and Products*, 137, 137–143.

Naeem, M., Basit, A., & Ahmad, I. (2020). Effect of salicylic acid and salinity stress on the performance of tomato plants. *Gesunde Pflanzen*, 72(4), 393–402.

Nasseralla, A.H.A., & Almukhtar, S.A. (2023). Effect of salicylic acid and ultraviolet rays on vegetative growth characteristics of *Rosmarinus officinalis* L. in vitro. In: *Proceedings of the IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 15–18 April 2023, Vol. 1158, No. 4, pp. 042024. IOP Publishing.

Ozgur, R., Uzilday, B., & Yalcinkaya, T. (2021). Differential responses of the scavenging systems for reactive oxygen species (ROS) and reactive carbonyl species (RCS) to UV-B irradiation in *Arabidopsis thaliana* and its high altitude perennial relative *Arabis alpina*. *Photochemical & Photobiological Sciences*, 20(7), 889–901.

Poorter, H., Niinemets, U., Ntagkas, N., Siebenkäs, A., Mäenpää, M., Matsubara, S., Pons, T.L. (2019). A meta-analysis of plant responses to light intensity for 70 traits ranging from molecules to whole plant performance. *New Phycologist*, 223, 1073–1105.

Qian, M., Rosenqvist, E., & Flygare, A.M. (2020). UV-A light induces a robust and dwarfed phenotype in cucumber plants (*Cucumis sativus* L.) without affecting fruit yield. *Scientia Horticulturae*, 263, 109110.

Roshdy, A.E.D., Alebidi, A., & Almutairi, K. (2021). The effect of salicylic acid on the performances of salt stressed strawberry plants, enzymes activity, and salt tolerance index. *Agronomy*, 11(4), 775.

Rostami, F., Radjabian, T., & Abrishamchi, P. (2022). Enhancement of phenolic acids accumulation in *Salvia abrotanoides* (Kar.) Sytsma shoot cultures under elicitation with nitric oxide. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 149(1), 441–453.

Safshekan, S., Pourakbar, L., & Rahmani, F. (2025). The effect of Zn NPs on some growth, biochemical and anatomical factors of Chickpea plant stem under UVB irradiation. *Plant Nano Biology*, 100154.

Singh, S. (2023). Salicylic acid elicitation improves antioxidant activity of spinach leaves by increasing phenolic content and enzyme levels. *Food Chemistry Advances*, 2, 100156.

Skrypnik, L., Golovin, A., & Savina, T. (2022). Effect of salicylic acid on phenolic compounds, antioxidant and antihyperglycemic activity of Lamiaceae plants grown in a temperate climate. *Frontiers in Bioscience-Elite*, 14(1), 3.

Song, W., Shao, H., & Zheng, A. (2023). Advances in roles of salicylic acid in plant tolerance responses to biotic and abiotic stresses. *Plants*, 12(19), 3475.

Tajik, S., Zarinkamar, F., & Soltani, B.M. (2019). Induction of phenolic and flavonoid compounds in leaves of saffron (*Crocus sativus* L.) by salicylic acid. *Scientia Horticulturae*, 257, 108751.

Tan, Y., Duan, Y., & Chi, Q. (2023). The role of reactive oxygen species in plant response to radiation. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(4), 3346.

Tian, X., Hu, M., & Yang, J. (2024). Ultraviolet-B radiation stimulates flavonoid biosynthesis and antioxidant systems in buckwheat sprouts. *Foods*, 13(22), 3650.

Wahab, S., Annadurai, S., & Abullais, S.S. (2021). *Glycyrrhiza glabra* (Licorice): A comprehensive review on its phytochemistry, biological activities, clinical evidence and toxicology. *Plants*, 10(12), 2751.

Wang, M., Leng, C., & Zhu, Y. (2022). UV-B treatment enhances phenolic acids accumulation and antioxidant capacity of barley seedlings. *LWT*, 153, 112445.

Wani, A.B., Chadar, H., & Wani, A.H. (2017). Salicylic acid to decrease plant stress. *Environmental Chemistry Letters*, 15(1), 101–123.

Xu, A., Zhan, J. C., & Huang, W. D. (2015). Effects of ultraviolet C, methyl jasmonate and salicylic acid, alone or in combination, on stilbene biosynthesis in cell suspension cultures of *Vitis vinifera* L. cv. Cabernet Sauvignon. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 122(1), 197-211.

Xu, Y., Charles, M.T., Luo, Z., Mimee, B., Tong, Z., Véronneau, P.Y., Roussel, D., Rolland, D. (2019). "Ultraviolet-C priming of strawberry leaves against subsequent *Mycosphaerella fragariae* infection involves the action of reactive oxygen species, plant hormones, and terpenes. *Plant, cell & environment*, 42 (3), 815-831.

Zhang, Z.S., Jin, L.Q., & Li, Y.T. (2016). Ultraviolet-B radiation (UV-B) relieves chilling-light-induced PSI photoinhibition and accelerates the recovery of CO₂ assimilation in cucumber (*Cucumis sativus* L.) leaves. *Scientific Reports*, 6, 34455.

Zhang, X. R., Chen, Y. H., Guo, Q. S., Wang, W. M., Liu, L., Fan, J., ... & Li, C. (2017). Short-term UV-B radiation effects on morphology, physiological traits and accumulation of bioactive compounds in *Prunella vulgaris* L. *Journal of Plant Interactions*, 12(1), 348-354.

Zheng, X.T., Yu, Z.C., & Tang, J.W. (2021). The major photoprotective role of anthocyanins in leaves of *Arabidopsis thaliana* under long-term high light treatment: antioxidant or light attenuator? *Photosynthesis Research*, 149(1), 25–40.

Optimization of Planting Date and Plant Density for Maximizing Indigocarmine Content and Improving Photosynthetic Traits of Medicinal-Industrial Indigo (*Indigofera tinctoria* L.) under Khuzestan Climatic Conditions

M.R. Zargaran Khouzani¹, M. H. Gharineh^{*2}, A. Koochakzadeh³ and A. Lotfi Jalalabadi⁴

1,2,3&4) Department of Plant Production and Genetics, Agricultural Sciences and Natural Resources University of Khuzestan, Mollasani, Iran.

*Corresponding author: m.gharineh@asnrukh.ac.ir

Received date: 2025.10.04

Accepted date: 2026.01.10

Abstract

Indigofera tinctoria L. is one of the most important medicinal-industrial plants, valued for its indigo carmine pigments and valuable phenolic compounds, which have extensive applications in the pharmaceutical and dyeing industries. As a natural source of plant-based dyes, it holds high economic value & exhibits moderate tolerance to environmental stresses such as drought and heat. This study was conducted in Shahid Bahonar Agricultural High School, Shushtar with the aim of evaluating the effects of planting date and plant density on photosynthetic traits and indigo carmine content of Indigo plant, using a split-plot design based on a randomized complete block design with three replications over two consecutive growing seasons (2022–2023). Treatments in the first year included six planting dates (April 29, May 19, June 8, June 28, July 17 and August 6) and four plant densities (30, 40, 50 and 60 plants per square meter). In the second year, two planting dates (July 17 and August 6) were excluded, and only four planting dates (April 29, May 19, June 8 and June 28) along with the same four plant densities were tested. Analysis of variance revealed that planting date, plant density, and their interaction significantly affected all qualitative traits at the 1% probability level. Mean comparison results showed that early planting in spring (April 29) yielded the highest values for chlorophyll a, chlorophyll b and total chlorophyll (1.82, 0.73 and 2.55 mg/g, respectively), as well as indigo carmine content (5.91 g/m²). Delaying planting, especially during the hotter months, significantly reduced all qualitative traits. A plant density of 40 plants per square meter was identified as the optimal level, at which the highest photosynthetic indices and indigocarmine content were observed. A significant positive correlation between chlorophyll content and indigocarmine concentration indicated a direct relationship between photosynthetic activity and secondary metabolite production in this plant. Overall, early planting in April and a plant density of 40 plants/m² are recommended as the best treatments for maximizing both the quality and quantity of indigo carmine in the indigo plant.

Keywords: Agronomic practices, Chlorophyll content, Cultivation management, Natural dyes and Secondary metabolites.

بهینه‌سازی زمان کاشت و تراکم بوته برای حداکثرسازی محتوای ایندیگوکارمین و بهبود صفات فتوسنتزی گیاه دارویی-صنعتی نیل (*Indigofera tinctoria* L.) تحت شرایط اقلیمی خوزستان

شماره صفحات

۹۹-۱۱۵

محمدرضا زرگران خوزانی^۱، محمدحسین قرینه^{۲*}، احمد کوچک زاده^۳ و امین لطفی جلال آبادی^۴^{۱، ۲، ۳ و ۴} گروه مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، شهرملاثانی، ایران.

* نویسنده مسئول: m.gharineh@asnrukh.ac.i

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۱۰/۲۰

تاریخ دریافت: ۱۴۰۴/۰۷/۱۲

چکیده

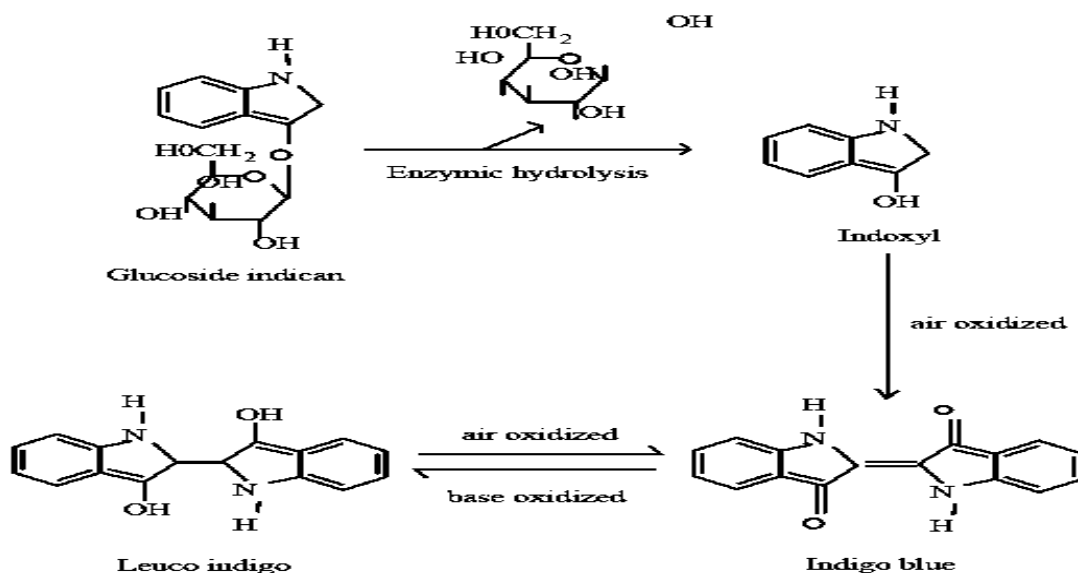
گیاه نیل (*Indigofera tinctoria* L.) یکی از مهم‌ترین گیاهان دارویی-صنعتی است که به دلیل داشتن رنگدانه ایندیگو کارمین و ترکیبات فنولی ارزشمند، کاربردهای متعددی در صنایع داروسازی و رنگرزی دارد. این گیاه به عنوان یک منبع طبیعی رنگزا، علاوه بر ارزش اقتصادی بالا، از تحمل نسبی به تنش‌های محیطی مانند خشکی و گرما برخوردار است. این پژوهش با هدف بررسی اثر زمان کاشت و تراکم بوته بر صفات فتوسنتزی و محتوای ایندیگو کارمین گیاه نیل در هنرستان کشاورزی شهید باهنر شوشتر در قالب طرح کرت‌های یک‌بار خردشده بر پایه بلوک‌های کامل تصادفی با سه تکرار و در دو سال زراعی (۱۴۰۱-۱۴۰۲) اجرا گردید. تیمارها در سال اول شامل شش تاریخ کاشت (۹ و ۲۹ اردیبهشت، ۱۸ خرداد، ۷ و ۲۷ تیر، ۱۶ مرداد) و چهار تراکم بوته (۳۰، ۴۰، ۵۰ و ۶۰ بوته در متر مربع) بودند که در سال دوم، دو تاریخ کاشت (۲۷ تیر و ۱۶ مرداد) حذف و تنها چهار تاریخ کاشت (۹ و ۲۹ اردیبهشت، ۱۸ خرداد و ۷ تیر) در کنار چهار سطح تراکم مورد آزمایش قرار گرفتند. تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که تاریخ کاشت، تراکم بوته و اثر متقابل آن‌ها بر تمامی صفات کیفی در سطح ۱٪ معنی‌دار بودند. نتایج مقایسه میانگین‌ها نشان داد که کاشت در اوایل فصل بهار (۹ اردیبهشت) بیشترین مقادیر را برای کلروفیل a، کلروفیل b و کلروفیل کل (۱/۸۲، ۰/۷۳ و ۲/۵۵ میلی گرم بر گرم) و محتوای ایندیگو کارمین (۵/۹۱ گرم بر مترمربع) فراهم کرد. در مقابل، تأخیر در کاشت، به‌ویژه در ماه‌های گرم سال، باعث کاهش معنی‌دار تمامی صفات کیفی شد. همچنین، تراکم ۴۰ بوته در متر مربع به عنوان بهینه‌ترین سطح تعیین شد که در آن بالاترین مقادیر شاخص‌های فتوسنتزی و محتوای ایندیگو کارمین مشاهده شد. همبستگی مثبت و معنی‌دار بین کلروفیل‌ها و محتوای ایندیگو کارمین نشان داد که فعالیت فتوسنتزی و تولید متابولیت‌های ثانویه در این گیاه به‌طور مستقیم مرتبط هستند. در مجموع، کاشت زود هنگام در اردیبهشت و استفاده از تراکم ۴۰ بوته در متر مربع به عنوان بهترین تیمار در جهت دستیابی به حداکثر کیفیت و مقدار ایندیگو کارمین پیشنهاد می‌شود.

واژه‌های کلیدی: رنگ‌های طبیعی، عملیات زراعی، محتوای کلروفیل، متابولیت‌های ثانویه و مدیریت کشاورزی.

مقدمه

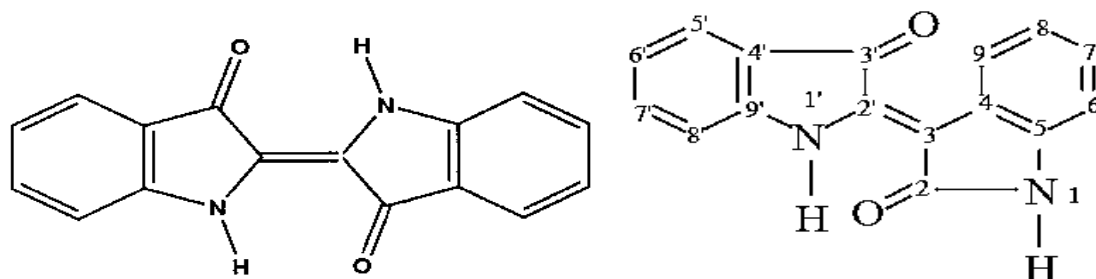
در سال‌های اخیر، به واسطه تأثیرات منفی فرآورده‌های مصنوعی، تمایل به استفاده از محصولات گیاهی در جوامع مختلف به‌طور چشمگیری افزایش یافته است. به همین دلیل، زراعت برخی از گیاهان با کاربردهای خاص که به‌طور طبیعی در عرصه‌های وحشی رشد می‌کنند، به‌عنوان گزینه‌های جدید در بسیاری از مناطق جهان رواج یافته است. یکی از این گیاهان، نیل با نام علمی *Indigofera tinctoria* L. است که به‌عنوان یک گیاه دارویی و صنعتی از خانواده بقولات محسوب می‌شود. سابقه کشت این گیاه در ایران طولانی است و از برگ‌های آن ماده‌ای به‌نام ایندیگو یا نیل استخراج می‌شود. رنگ آبی ناشی از نیل دارای ثبات بسیار بالایی است و در رنگرزی پارچه و اشیاء به‌کار می‌رود. استفاده از رنگ‌های طبیعی به‌جای رنگ‌های مصنوعی باعث شده که این نوع گیاهان به فراموشی سپرده شوند (Modafeh Beyzadi et al., 2018). منبع این گیاه به آسیای شرقی برمی‌گردد (Sarhadi et al., 2014)، اما در حال حاضر در جنوب شرقی و برخی مناطق مرکزی اروپا نیز یافت می‌شود. نیل به‌طور خاص در مناطق حاره‌ای رشد می‌کند و بهترین شرایط برای آن آب‌وهوای گرم و مرطوب است. این گیاه تا ارتفاع ۱۲۵۰ متر از سطح دریا سازگاری خوبی را نشان می‌دهد. مناطق با ابرناکی زیاد در طول دوره رشد برای این گیاه مناسب نیستند. میانگین دمای مطلوب برای رشد نیل ۳۰ درجه سانتی‌گراد است و حداقل دمای خاک برای جوانه‌زنی آن بین ۱۸ تا ۲۰ درجه سانتی‌گراد می‌باشد. این گیاه برای رشد و نمو به یک دوره حداقل ۱۲۰ روزه بدون سرما و یخبندان نیاز دارد و دماهای زیر صفر می‌توانند به آن آسیب جدی وارد کنند (Modafeh Beyzadi et al., 2018). تاریخ کاشت یکی از عوامل کلیدی تأثیرگذار بر طول دوره رشد رویشی و زایشی و توازن میان آن‌ها و دیگر عوامل تولید، کیفیت برداشت و در نهایت عملکرد است. کاشت در زمان مناسب به مهار آسیب‌های ناشی از سرمای دیررس بهاره و زودرس پاییزی، آفات و بیماری‌ها و علف‌های هرز کمک می‌کند. همچنین، تطابق زمان گلدهی با دمای مطلوب از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است (Alizadeh et al., 2023). هدف از تعیین زمان کاشت، شناسایی زمان مطلوب برای کاشت یک گیاه است که در آن شرایط محیطی برای جوانه‌زنی و استقرار گیاهچه مناسب باشد و گیاه از تأثیرات منفی شرایط نامساعد محیطی در امان بماند. زمان کاشت به‌دلیل تغییرپذیری طول روز، دما و رطوبت نسبی، تأثیر زیادی بر رشد، نمو و تولید گیاه در طول فصل رشد دارد و یکی از مهم‌ترین عوامل مدیریتی در تولید تمامی محصولات به‌شمار می‌رود. تعداد بوته‌ها در هر واحد سطح (تراکم) یکی از عوامل اساسی در تعیین عملکرد گیاهان به‌شمار می‌رود. تعیین تراکم مناسب برای کشت گیاهان به‌عنوان عامل زراعی قابل مهار، تأثیر قابل توجهی در کارایی محصولات مختلف دارد. تراکم گیاهی مطلوب جزء اصول بنیادین زراعت هر محصول بوده و به‌عنوان یکی از مهم‌ترین عوامل تأثیرگذار بر عملکرد کمی و کیفی گیاهان شناخته می‌شود (Sajed Gollojeh et al., 2020). به‌طور کلی، افزایش تراکم بیش از حد مطلوب منجر به رقابت درون‌گونه‌ای خواهد شد که در نتیجه عملکرد گیاهان را کاهش می‌دهد. از سوی دیگر، در تراکم‌های کمتر از حد مطلوب، بهره‌برداری بهینه از منابع محیطی نظیر نور، فضا، آب و خاک به‌درستی انجام نمی‌گیرد و در نهایت باعث کاهش عملکرد می‌شود.

(Tahmasebi *et al.*, 2025؛ Omid Bighi, 2021؛ Koocheki *et al.*, 2020). گیاه نیل حاوی ترکیبات شیمیایی متنوعی است که از جمله آن‌ها می‌توان به اندیکال، اندوکسیل، ایزاتان و لابنیم اشاره کرد. اجزای مؤثر این گیاه شامل آلکالوئیدها، گلیکوزیدها، فلاونوئیدها، تانن‌ها، ترکیبات فنولیک، اسیدهای آمینه، کربوهیدرات‌ها و ترکیبات معدنی است. همچنین، نیل شامل خاکستر و خاکستر محلول در اسید و آب نیز می‌باشد (Jain *et al.*, 2010). ایندیگو کارمین به عنوان یک متابولیت ثانویه طبیعی به حساب می‌آید (Sales *et al.*, 2016). این گیاه دارای گلوکوزید بدون رنگ از فرم انول است که از ایندیکال‌ها، مانند ایندیکان، تشکیل می‌شود و به وسیله آنزیم‌ها به اندوکسیل هیدرولیز می‌شود، سپس به شکل نیل آبی (ایندیگو) از طریق اکسیداسیون هوازی تبدیل می‌شود (شکل ۱) (Kun Lestari, 1998). اجزای اصلی عصاره خام نیل شامل دو رنگدانه آبی رنگ ایندیگو کارمین و رنگدانه قرمز ایندیروبین است. ایندیروبین رنگدانه‌ای صورتی-قرمز است (شکل ۲) که مشابه ایندیگو کارمین آبی رنگ، از گیاهانی مانند نیل ژاپنی (*Persicaria tinctoria* Ait.) تولید می‌شود (Maier *et al.*, 1991؛ Shin & Lee, 1993).



شکل ۱- تغییرات رنگدانه ایندیگو از مواد شیمیایی (Chanayath *et al.*, 2002)

Figure 1- Indigo pigment changes from chemicals (Chanayath *et al.*, 2002)



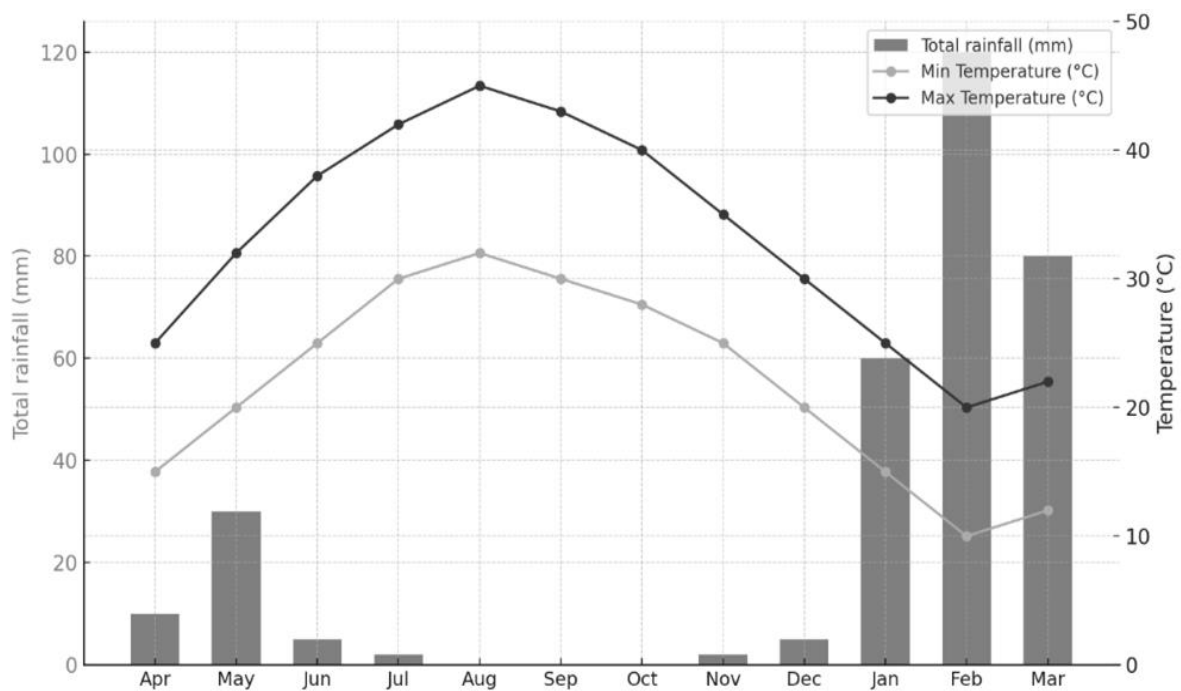
شکل ۲- ساختار ترکیب شیمیایی ایندیگو کارمین (Strobel, D. Gröger, 1989) و ایندیروبین (Chanayath *et al.*, 2002)

Figure 2- Structure of the chemical compound of Indigo carmine (Strobel, D. Gröger, 1989) and Indirubin (Chanayath *et al.*, 2002)

ایندیگو کارمین به عنوان ماده‌ای رنگی در مناطق گرمسیر از گیاه نیل به دست می‌آید و تا قرون وسطی در اروپا بخش قابل توجهی از نیاز به رنگ آبی را تأمین می‌کرد. با این حال، از قرن ۱۷ به بعد، مصرف نیل به تدریج کاهش یافت و جای خود را به گونه‌های دیگر جنس ایندیگوفر داد. تا قرن ۱۹، نیل و دیگر منابع طبیعی گیاهی تولید ایندیگو کارمین به رنگ‌های مصنوعی واگذار شدند، که این روند همچنان ادامه دارد. استخراج رنگ آبی از گیاه نیل یک فرایند پیچیده است که نیاز به دقت و رعایت مراحل خاصی دارد. با توجه به اهمیت روزافزون رنگ‌های طبیعی، این فرایند می‌تواند ارزش تجاری و فرهنگی زیادی داشته باشد و در صنایع مختلف، مورد استفاده قرار گیرد (Zargaran Khouzani & Daei Naseri, 2025). با توجه به اهمیت این گیاه در تأمین رنگ‌های طبیعی و همچنین کاربردهای دارویی آن، شناسایی بهترین زمان کاشت و تراکم مناسب گیاهی می‌تواند به بهینه‌سازی تولید و افزایش کارایی این گیاه کمک کند. این مطالعه با هدف ارائه داده‌های علمی قابل اتکا به منظور بهبود شیوه‌های کشت و مدیریت زراعی گیاه نیل انجام می‌گیرد.

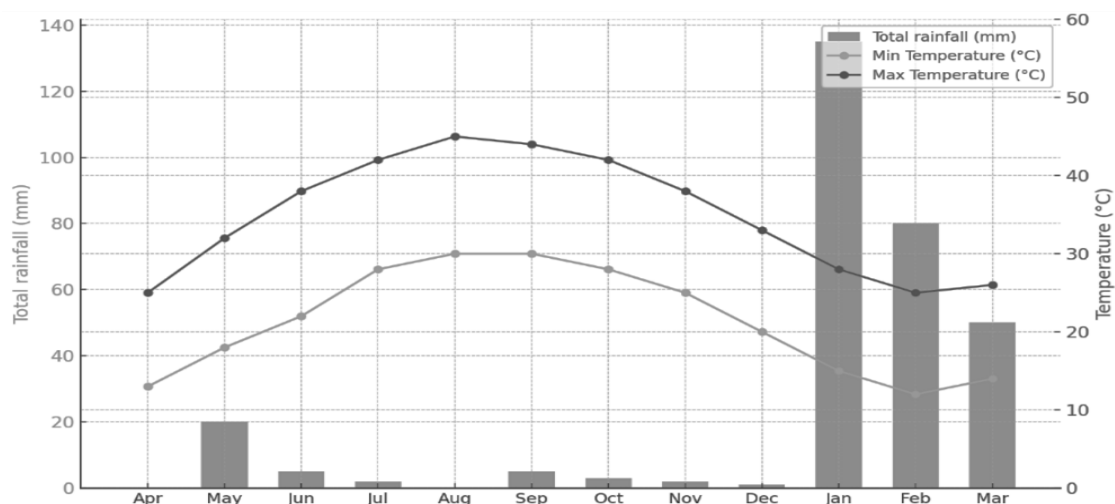
مواد و روش‌ها

این پژوهش در هنرستان کشاورزی شهید باهنر واقع در شهر شوشتر طی سال‌های زراعی ۱۴۰۱-۱۴۰۲ به اجرا درآمد. شوشتر با طول جغرافیایی بین ۴۸ درجه و ۳۵ دقیقه تا ۴۹ درجه و ۱۲ دقیقه و عرض جغرافیایی بین ۳۱ درجه و ۳۶ دقیقه تا ۳۲ درجه و ۲۶ دقیقه، با میانگین دما ۲۷/۲ درجه سانتی‌گراد و متوسط بارندگی سالیانه ۳۲۲ میلی‌متر (شکل ۳ و ۴) در استان خوزستان واقع شده است.



شکل ۳- میانگین درجه دما حداقل و حداکثر و میزان بارندگی در سال ۱۴۰۱ شهرستان شوشتر

Figure 3- Average minimum and maximum temperatures and rainfall in 2022 in Shushtar County



شکل ۴- میانگین دما حداقل و حداکثر و میزان بارندگی در سال ۱۴۰۲ شهرستان شوشتر

Figure 4- Average minimum and maximum temperatures and rainfall in 2023 in Shushtar County

آزمایش به صورت کرت‌های یک بار خرد شده و در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی (RCBD) با سه تکرار در سال‌های زراعی ۱۴۰۱-۱۴۰۲ صورت پذیرفت. متغیرهای آزمایشی در سال اول شامل ۶ تاریخ کاشت (۹ اردیبهشت، ۲۹ اردیبهشت، ۱۸ خرداد، ۷ تیر، ۲۷ تیر و ۱۶ مرداد) به‌عنوان عامل اصلی و چهار سطح تراکم بوته (۳۰، ۴۰، ۵۰ و ۶۰ بوته در متر مربع) به‌عنوان عامل فرعی در نظر گرفته شد؛ که در سال دوم با حفظ سطوح تراکم ۲ تاریخ کاشت (۲۷ تیر، ۱۶ مرداد) حذف و آزمایش با ۴ تاریخ کاشت و تراکم تکرار شد. برای ارزیابی کیفیت و ویژگی‌های خاک، نمونه‌برداری به‌صورت تصادفی برای تعیین از عمق ۰ تا ۳۰ سانتی متر در هر دوسال انجام و نتایج به صورت جداول (۱) ارائه گردید.

جدول ۱- خصوصیات فیزیکی و شیمیایی خاک قبل از کاشت (عمق ۰-۳۰ سانتیمتر) در سال اول و دوم

Table 1- Physical and chemical properties of the soil before planting (depth: 0–30 cm) in the first and second years

سال	پی‌اچ	هدایت الکتریکی	نیتروژن کل	فسفر قابل جذب	پتاسیم قابل جذب	رس	لای	ماسه
Year	pH	Electrical Conductivity (dS/m)	Total Nitrogen (%)	Available Phosphorus (ppm)	Available Potassium (ppm)	Clay (%)	Silt (%)	Sand (%)
2021	7.56	2.04	0.20	7	480	13	48	39
2022	7.78	2.3	0.25	15	420	13	48	39

دو ماه قبل از کاشت آماده‌سازی بستر کشت، با دو نوبت شخم عمود بر هم صورت گرفت. پس از آن برای ایجاد بستر یکنواخت عملیات تسطیح زمین انجام شد و با استفاده از دستگاه نهرکن برای هدایت آب اضافی اقدام به ایجاد جوی‌های زهکشی شد. ابعاد کرت‌ها، سه در پنج متر و فاصله بین کرت‌های اصلی دو متر و فاصله بین کرت‌های فرعی یک متر در نظر گرفته شد. بذرها از توده شهر جیرفت جنوب استان کرمان تهیه و کاشت مستقیم بذر روی شش خط کاشت به صورت کرتی و به شیوه دستی به‌صورت برنامه‌ریزی شده طبق تاریخ‌های تعیین شده انجام پذیرفت. بعد از اطمینان از سبز شدن و استقرار کامل، تعداد گیاهچه‌ها در مرحله سه و چهار برگی شمارش و تنک گردیدند. مهار علف‌های هرز به صورت وجین دستی به طور منظم در

طول دوره رشد انجام شد. عملکرد کیفی گیاه نیل، از طریق اندازه‌گیری مقادیر کلروفیل‌ها، همچنین بررسی محتوای ایندیگو کارمین انجام شد. برای اندازه‌گیری کلروفیل‌ها (کلروفیل a, b و کلروفیل کل) و کارتنوئید از روش آرنون (۱۹۶۷) استفاده گردید، به این صورت که، نیم گرم از ماده تر گیاهی در هاون چینی قرار داده و با نیتروژن مایع خرد شد. ۲۰ میلی‌لیتر استن ۸۰٪ به نمونه افزوده شد. سپس نمونه به مدت ۱۰ دقیقه در سرعت ۶۰۰۰ دور در دقیقه سانتیفریوژ شد. عصاره جدا شده به یک بالن شیشه‌ای منتقل گردید. مقدار جذب در طول موج‌های ۶۶۳ نانومتر برای کلروفیل a و ۶۴۵ نانومتر برای کلروفیل b و کارتنوئید ۴۵۰ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر مرئی و فرابنفش Hach DR6000 قرائت شد. ایندیگو کارمین یکی از رنگدانه‌های طبیعی موجود در گیاه نیل است که دارای ویژگی‌های خاص رنگی می‌باشد و به عنوان یک رنگدانه در صنعت پوشاک و رنگ آمیزی استفاده می‌شود. یک گرم از برگ‌های نیل توزین شده و داخل لوله آزمایش قرار گرفت. ۱۰ سی سی آب مقطر به لوله‌های حاوی نمونه برگ اضافه می‌شود و لوله‌ها برای ۱۰ دقیقه در بن‌ماری قرار گرفت. سپس نمونه‌ها بی‌درنگ در حمام آب یخ سرد قرار داده شده و با استفاده از NaOH اسید نمونه به پی‌اچ ۱۰ رسید که بعد از یک ساعت، با اسید کلریدریک، پی‌اچ به یک تا دو تنظیم گردیده و پس از ۳۰ دقیقه با نمودار استاندارد مقایسه شد. بعد از سانتیفریوژ نمونه‌ها در دور ۵۰۰۰ دور در دقیقه، جذب نور در طول موج ۶۰۰ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر مرئی و فرابنفش اندازه‌گیری گردید. به منظور تهیه نمودار استاندارد، یک محلول پایه از ۸ میلی‌گرم ایندیگو کارمین خالص در ۲۰ سی‌سی اسید سولفوریک تهیه شده و با آب مقطر تا ۵۰۰ میلی‌لیتر رقیق شد تا غلظت‌های مورد نیاز برای آزمایش فراهم گردد. (Laitonjam & Wangkheirakpam, 2011).

در این تحقیق، تجزیه‌ی آماری برای تحلیل داده‌ها در دو سال متوالی انجام پذیرفت. برای بررسی اثر متغیرها و مقایسه میانگین‌ها، از تجزیه‌ی واریانس (ANOVA) استفاده شد. پس از انجام تجزیه‌ی واریانس و در صورت معنی‌دار بودن نتایج، میانگین‌ها با استفاده از آزمون LSD در سطح احتمال خطای ۵ درصد مقایسه شدند. نرم‌افزار SAS نسخه ۹/۴ و SPSS نسخه ۲۶ برای انجام تجزیه‌ی واریانس و تحلیل‌های آماری استفاده شد و از نرم‌افزار Excel برای رسم نمودارها به‌کار گرفته شد.

نتایج و بحث

نتایج تجزیه واریانس سال اول آزمایش (جدول ۲) نشان داد که تمامی عوامل شامل تاریخ کاشت، تراکم بوته و اثر متقابل آن‌ها بر تمامی صفات کیفی معنی‌دار بودند بر اساس داده‌های به‌دست آمده (جدول ۶)، کاشت زود هنگام (اردیبهشت ماه) منجر به حداکثر مقدار رنگدانه‌های فتوسنتزی و درصد ایندیگو کارمین شد، در حالی که تأخیر در کاشت، به‌ویژه در ماه‌های گرم سال، باعث کاهش معنی‌دار تمامی صفات کیفی گردید. این موضوع می‌تواند به دلیل افزایش تنش حرارتی و کاهش رطوبت خاک در دوره رشد گیاه باشد (Izadi et al., 2022). در میان تراکم‌های مختلف، تراکم ۴۰ بوته در مترمربع به عنوان بهینه‌ترین سطح تعیین شد، که در این تراکم، بالاترین مقادیر شاخص‌های فتوسنتزی و محتوای ایندیگو کارمین مشاهده شد. این یافته با مطالعات خرم دل و همکاران (۲۰۱۶) روی گیاه نیل نیز همخوانی دارد که در آن بهینه‌ترین تراکم برای حداکثر عملکرد و کیفیت

متابولیت‌های ثانویه گزارش شده بود. افزایش تراکم بوته بیش از این حد منجر به افزایش رقابت گیاهان با یکدیگر برای دسترسی به نور، آب و مواد مغذی شد و در نتیجه باعث کاهش فتوسنتز و سنتز متابولیت‌های ثانویه شد. همچنین، همبستگی مثبت و قوی بین محتوای کلروفیل و ایندیگو کارمین (۰/۹۵) مشاهده شد که نشان‌دهنده ارتباط مستقیم بین فرآیندهای فتوسنتزی و سنتز متابولیت‌های ثانویه در این گیاه است. این موضوع توسط عبدالجلیل و همکاران (۲۰۰۸) نیز گزارش شده است که در مطالعه‌ای بر روی گیاه دارویی پروانش (*Catharanthus roseus*) مشاهده کردند که تنش‌های محیطی می‌توانند همزمان بر سنتز کلروفیل و متابولیت‌های ثانویه تأثیر بگذارند. همچنین، همبستگی بسیار بالای بین کلروفیل a و b (۰/۹۸) نیز نشان‌دهنده این است که تغییرات این دو شاخص در واکنش به تنش‌ها بسیار هماهنگ است (جدول ۸). داده‌های به‌دست آمده از جداول میانگین اثر متقابل تراکم و تاریخ کاشت (جدول ۶ و ۷) نشان داد که بیشترین مقدار محتوای ایندیگو کارمین (۶/۱۵ گرم بر مترمربع) در تاریخ کاشت زودهنگام (اردیبهشت ماه) و تراکم ۴۰ بوته در متر مربع به دست آمد. کاهش تدریجی این شاخص در تاریخ‌های دیرتر و تراکم‌های بالاتر می‌تواند ناشی از کاهش فعالیت آنزیم‌های دخیل در مسیر بیوسنتزی این ترکیب باشد (Modafeh Beyzadi *et al.*, 2018). همچنین، تفاوت معنی‌دار بین دو سال آزمایش نشان‌دهنده تأثیر شرایط محیطی و مدیریتی بود، اما الگوی پاسخ گیاه به تیمارها در هر دو سال یکسان بود. نتایج اثر متقابل نیز در سطح ۵٪ معنی‌دار بود که نشان‌دهنده تأثیر ترکیبی این دو عامل بر صفات کیفی است. این موضوع اهمیت مدیریت توأم زمان کاشت و تراکم بوته را در دستیابی به حداکثر کیفیت و مقدار ایندیگو کارمین برجسته می‌کند. بر اساس داده‌های جدول ۶، بیشترین مقدار کلروفیل a (۱/۸۲ میلی‌گرم بر گرم)، کلروفیل b (۰/۷۳ میلی‌گرم بر گرم) و کلروفیل کل (۲/۵۵ میلی‌گرم بر گرم) در تاریخ کاشت ۹ اردیبهشت مشاهده شد، در حالی که کمترین مقدار آن‌ها در تاریخ کاشت ۱۶ مرداد به دست آمد. این نتایج نشان می‌دهد که شرایط مساعد دما و رطوبت در اواسط فصل بهار، سنتز رنگدانه‌های فتوسنتزی را تسهیل می‌کند (Modafeh Beyzadi *et al.*, 2018). همچنین، تراکم بوته نیز تأثیر معنی‌داری بر رنگدانه‌های فتوسنتزی داشت. کمترین مقدار کلروفیل کل (۱/۵۸ میلی‌گرم بر گرم) در تراکم ۶۰ بوته در متر مربع مشاهده شد، در حالی که بیشترین مقدار (۲/۴۲ میلی‌گرم بر گرم) در تراکم ۳۰ بوته در متر مربع به دست آمد (جدول ۵). این نتیجه می‌تواند ناشی از افزایش رقابت گیاهان برای نور، آب و مواد مغذی در تراکم‌های بالا باشد. این یافته‌ها با پناهنده و همکاران (۲۰۲۲) همخوانی دارد که نشان دادند افزایش تراکم گیاهی در گیاه شیکوره ویتلوف (*Cichorium intybus* L.) موجب کاهش فتوسنتز و عملکرد شد. همچنین پژوهش کوچکی و همکاران (۲۰۲۰) بر روی گیاه گلرنگ (*Carthamus tinctorius* L.) نشان داد تراکم بالای گیاهان می‌تواند منجر به کاهش دسترسی به نور و در نتیجه کاهش سنتز کلروفیل شود. محتوای کاروتنوئیدها در تاریخ کاشت زودهنگام (اردیبهشت ماه) بیشترین مقدار را داشت (۰/۴۸ میلی‌گرم بر گرم)، اما در تاریخ‌های دیرتر به‌طور معنی‌داری کاهش یافت (جدول ۶). کاهش حدود ۲۰ درصدی کاروتنوئیدها در تاریخ کاشت مرداد ماه نشان‌دهنده تخریب این رنگدانه‌ها تحت تنش گرمایی است. در تاریخ‌های دیررس (مرداد ماه) و تراکم‌های

بالا (۶۰ بوته در متر مربع) افزایش نسبت کاروتنوئید به کلروفیل مشاهده شد (جدول ۵)، که شاید ناشی از فعال شدن مکانیسم‌های دفاعی گیاه در پاسخ به شرایط نامساعد است. همبستگی منفی قوی این شاخص با کلروفیل‌ها (۰/۸۲-) تأیید می‌کند که تحت تنش، گیاه منابع خود را به سمت تولید کاروتنوئیدها سوق می‌دهد (جدول ۸). این یافته از این نظر مهم است که نشان می‌دهد گیاه نیل در شرایط تنش، متابولیسم‌های تنظیمی دقیقی برای حفظ تعادل بین رنگدانه‌های فتوسنتزی و متابولیت‌های ثانویه دارد. در جدول ۸، ضریب همبستگی پیرسون بین صفات کیفی گیاه نیل نشان داد که تمامی صفات مربوط به رنگدانه‌های فتوسنتزی با محتوای ایندیگو کارمین همبستگی مثبت و قوی دارند. برای مثال، همبستگی بین کلروفیل کل و ایندیگو کارمین برابر با ۰/۹۴ و بین محتوای ایندیگو کارمین و کاروتنوئیدها ۰/۹۲ بود. این موضوع اهمیت ارتباط بین فرآیندهای فتوسنتزی و سنتز متابولیت‌های ثانویه را در گیاه نیل برجسته می‌کند. این امر می‌تواند به عنوان یک شاخص زیستی در برنامه‌های به‌نژادی و مدیریت زراعی گیاهان دارویی-صنعتی مورد استفاده قرار گیرد (Annie Felicia & Muthulingam, 2012; Pramod *et al.*, 2010). نتایج این پژوهش نشان داد که کاشت زود هنگام (اردیبهشت ماه) و استفاده از تراکم ۴۰ بوته در متر مربع به‌عنوان مهم‌ترین راهبردهای زراعی در جهت دستیابی به حداکثر کیفیت و مقدار ایندیگو کارمین پیشنهاد می‌گردد. این نتایج از این نظر اهمیت دارند که نشان می‌دهند حتی در شرایط تنش، گیاه نیل متابولیسم‌های تنظیمی دقیقی برای حفظ تعادل بین رنگدانه‌های فتوسنتزی و متابولیت‌های ثانویه دارد که می‌تواند در برنامه‌های بهره‌وری و توسعه گیاهان دارویی-صنعتی مورد استفاده قرار گیرد (Zargarani Khouzani *et al.*, 2022). این موضوع با مطالعات آئی فلیسیا و موثولینگام (۲۰۱۲) نیز هم‌خوانی دارد که در مطالعه‌ای بر روی گیاه نیل مشاهده کردند که تغییرات در محتوای رنگدانه‌های فتوسنتزی با تغییرات در محتوای ایندیگو کارمین همراه است. همچنین، پژوهش‌های پیشین روی گیاهان دارویی دیگر مانند توت طلایی (*Physalis peruviana* L.) و عروسک پشت پرده (*Physalis alkekengi* L.) و گیاه رزماری (*Rosmarinus officinalis* L.) نیز نشان داده‌اند که تغییرات زراعی می‌تواند به‌طور مستقیم بر محتوای متابولیت‌های ثانویه تأثیر بگذارد (Siahmansour *et al.*, 2020; Saremi *et al.*, 2021; Ali *et al.*, 2022). در جدول ۴ و ۵، مقایسه میانگین اثرات ساده تاریخ کاشت و تراکم بوته نشان داد که کاشت در اردیبهشت ماه باعث بهبود قابل توجه تمامی صفات فتوسنتزی و محتوای ایندیگو کارمین شد. همچنین، تراکم ۴۰ بوته در مترمربع در مقایسه با سایر تراکم‌ها، بهترین نتایج را از لحاظ محتوای کلروفیل و ایندیگو کارمین به‌دست آورد. این یافته‌ها اهمیت تطبیق زمان کاشت با شرایط اقلیمی محلی و انتخاب مناسب تراکم بوته در افزایش کیفیت و مقدار متابولیت‌های ثانویه را برجسته می‌کند. داده‌های جدول ۳ نیز نشان دادند که در تراکم ۴۰ بوته در مترمربع، هم‌زمان با حداکثر کلروفیل و ایندیگو کارمین، نسبت کاروتنوئید به کلروفیل نیز بهینه حفظ شده بود. این نسبت به‌عنوان یک شاخص مهم در سلامت گیاه و توانایی آن در تحمل تنش‌های محیطی مطرح است. بنابراین، حفظ این تعادل در تیمارهای بهینه زراعی بسیار حائز اهمیت است. در جدول ۶، محتوای ایندیگو کارمین در تاریخ کاشت زود هنگام و تراکم ۴۰ بوته در متر مربع به ۵/۹۱ گرم بر مترمربع رسید، در

حالی که در تراکم ۶۰ بوته، این مقدار به ۳/۶۷ گرم بر مترمربع کاهش یافت. این اختلاف معنی‌دار نشان‌دهنده نقش مهم مدیریت صحیح تراکم بوته در حفظ تعادل بین رقابت گیاهی و بهره‌مندی از منابع محیطی است. این یافته‌ها با مطالعات خورشیدی و همکاران (۲۰۰۹) نیز هم‌خوانی دارد که نشان دادند افزایش تراکم گیاهی می‌تواند منجر به کاهش کیفیت و کمیت متابولیت‌های ثانویه در گیاهان دارویی شود. علاوه بر این، کلروفیل کل در تاریخ کاشت زود هنگام (اردیبهشت ماه) بیشترین مقدار را داشت (۲/۵۵ گرم بر مترمربع) در حالی که در تاریخ‌های دیرتر به‌طور معنی‌داری کاهش یافت. این کاهش می‌تواند ناشی از کاهش طول روز، کاهش دسترسی به نور و افزایش تنش حرارتی در ماه‌های گرم سال باشد (Abouseidi *et al.*, 2021). همچنین، بر اساس داده‌های به‌دست آمده از جدول ۶، در تاریخ کاشت ۹ اردیبهشت و تراکم ۴۰ بوته در متر مربع، محتوای ایندیگو کارمین به ۵/۹۱ گرم بر مترمربع رسید، در حالی که در تراکم ۶۰ بوته، این مقدار به ۳/۶۷ گرم بر مترمربع کاهش یافت. این اختلاف معنی‌دار نشان‌دهنده نقش مهم مدیریت صحیح تراکم بوته در حفظ تعادل بین رقابت گیاهی و بهره‌مندی از منابع محیطی است. این یافته‌ها با مطالعه صابری و همکاران (۲۰۱۰) نیز هم‌خوانی دارد که نشان دادند افزایش تراکم گیاهی در ذرت موجب کاهش فتوسنتز و عملکرد شد. نتایج این پژوهش نشان دادند که گیاه نیل در شرایط تنش، متابولیسم‌های تنظیمی دقیقی برای حفظ تعادل بین رنگدانه‌های فتوسنتزی و متابولیت‌های ثانویه دارد. این موضوع اهمیت استفاده از این گیاه در مناطق خشک و نیمه‌خشک ایران و دیگر کشورهای دارای اقلیم مشابه را برجسته می‌کند. این گیاه با داشتن ارزش دارویی و صنعتی بالا، می‌تواند در توسعه کشاورزی پایدار و افزایش ارزش افزوده محصولات کشاورزی ایران نقش مؤثری ایفا کند (Pramod *et al.*, 2010; Zargarani Khouzani *et al.*, 2022). همچنین، نتایج تحلیل آماری نشان داد که تفاوت معنی‌داری بین دو سال آزمایش وجود داشت که این امر به‌خوبی با تغییرات شرایط اقلیمی در دو سال مرتبط بود. با این حال، الگوی پاسخ گیاه به تیمارها در هر دو سال یکسان بود، که نشان‌دهنده انعطاف‌پذیری بالای گیاه نیل در پاسخ به تغییرات زراعی و محیطی است. این یافته اهمیت استفاده از این گیاه در مناطق با شرایط محیطی متغیر را برجسته می‌کند (Khoramdel *et al.*, 2016). در نهایت، با توجه به افزایش تقاضا برای رنگ‌های طبیعی و داروهای گیاهی، احیای ظرفیت‌های اکولوژیک و ارتقای کیفیت محصولات گیاه نیل می‌تواند فرصت‌های اقتصادی قابل توجهی برای کشور به همراه داشته باشد (Zargarani Khouzani & *et al.*, 2022). این گیاه با داشتن ارزش دارویی و صنعتی بالا، می‌تواند در توسعه کشاورزی پایدار و افزایش ارزش افزوده محصولات کشاورزی ایران نقش مؤثری ایفا کند.

جدول ۲: تجزیه واریانس اثر تراکم و تاریخ کاشت بر صفات کیفی گیاه نیل (سال ۱۴۰۱)

Table 2: Analysis of variance of the effect of density and planting date on indigo plant quality traits (2022)

منبع تغییرات Source of Variation	درجه آزادی Degrees of Freedom (df)	کلروفیل a Chlorophyll a (MS)	کلروفیل b Chlorophyll b (MS)	کلروفیل کل Total Chlorophyll (MS)	ایندیگو کارمین Indigo carmine (MS)	محتوای ایندیگو Indigo Content (MS)	کاروتنوئیدها Carotenoids (MS)
بلوک (Block)	2	0.012	0.008	0.020	0.005	0.15	0.003
تاریخ کاشت (T) Planting date	5	0.45**	0.18**	0.63**	0.12**	5.82**	0.08**
خطای کرت اصلی (Ea) Main plot error	10	0.015	0.006	0.021	0.004	0.18	0.002
تراکم (D) Density	3	0.32**	0.12**	0.44**	0.09**	4.75**	0.06**
T × D	15	0.08*	0.03*	0.11*	0.02*	1.24*	0.01*
خطای کرت فرعی (Eb) Subplot error	36	0.010	0.004	0.014	0.003	0.12	0.001

 *Significant at the 5% level ($p < 0.05$) ** Significant at the 1% level ($p < 0.01$)

 *معنی دار در سطح ۵٪ ($p < 0.05$) ** معنی دار در سطح ۱٪ ($p < 0.01$)

جدول ۳: تجزیه واریانس اثر تراکم و تاریخ کاشت بر صفات کیفی گیاه نیل (سال ۱۴۰۲)

Table 3: Analysis of variance of the effect of density and planting date on indigo plant quality traits (2023)

منبع تغییرات Source of Variation	درجه آزادی Degrees of Freedom (df)	کلروفیل a Chlorophyll a (MS)	کلروفیل b Chlorophyll b (MS)	کلروفیل کل Total Chlorophyll (MS)	ایندیگو کارمین Indigo carmine (MS)	محتوای ایندیگو Indigo Content (MS)	کاروتنوئیدها Carotenoids (MS)
بلوک (Block)	2	0.011	0.007	0.018	0.004	0.14	0.002
تاریخ کاشت (T) Planting date	3	0.48**	0.20**	0.68**	0.14**	6.15**	0.09**
خطای کرت اصلی (Ea) Main plot error	6	0.014	0.005	0.019	0.003	0.16	0.002
تراکم (D) Density	3	0.35**	0.14**	0.49**	0.10**	5.02**	0.07**
T × D	9	0.09*	0.04*	0.13*	0.03*	1.37*	0.02*
خطای کرت فرعی (Eb) Subplot error	24	0.009	0.003	0.012	0.002	0.10	0.001

 *Significant at the 5% level ($p < 0.05$) ** Significant at the 1% level ($p < 0.01$)

 *معنی دار در سطح ۵٪ ($p < 0.05$) ** معنی دار در سطح ۱٪ ($p < 0.01$)

جدول ۴: مقایسه میانگین اثر ساده تاریخ کاشت بر صفات کیفی در سال‌های ۱۴۰۱ و ۱۴۰۲

Table 4: Comparison of the mean simple effects of planting date on qualitative traits in the years 2022 and 2023

نسبت کاروتنوئید به کلروفیل Carotene Chlorophyll Ratio	کاروتنوئیدها Carotenoids (mg/g)	محتوای ایندیگو کارمین Indigo carmine Content (g/m ²)	ایندیگو کارمین Indigo carmine (%)	کلروفیل کل Total Chlorophyll (mg/g)	کلروفیل b Chlorophyll b (mg/g)	کلروفیل a Chlorophyll a (mg/g)	تاریخ کاشت Planting Date	سال Year
0.21 ± 0.01a	0.44 ± 0.02a	4.57 ± 0.17a	0.77 ± 0.02a	2.48 ± 0.11a	0.70 ± 0.03a	1.78 ± 0.08a	۹ اردیبهشت/ March 30	2022-۱۴۰۱
0.22 ± 0.01b	0.42 ± 0.01b	4.24 ± 0.16b	0.73 ± 0.02b	2.37 ± 0.10b	0.66 ± 0.03b	1.71 ± 0.07b	۲۹ اردیبهشت/ April 19	
0.24 ± 0.01c	0.39 ± 0.01c	3.48 ± 0.13c	0.65 ± 0.02c	2.17 ± 0.09c	0.60 ± 0.02c	1.57 ± 0.06c	۱۸ خرداد به ۸ May	
0.26 ± 0.01d	0.35 ± 0.01d	3.16 ± 0.12d	0.60 ± 0.02d	1.97 ± 0.08d	0.54 ± 0.02d	1.43 ± 0.05d	۷ تیر/ June 28	
0.28 ± 0.01e	0.32 ± 0.01e	3.12 ± 0.12e	0.55 ± 0.01e	1.82 ± 0.06e	0.48 ± 0.02e	1.34 ± 0.04e	۲۷ تیر/ July 17	
0.30 ± 0.01f	0.29 ± 0.01f	2.88 ± 0.11f	0.51 ± 0.01f	1.71 ± 0.05f	0.43 ± 0.01f	1.28 ± 0.04f	۱۶ مرداد به ۷ August	
0.20 ± 0.01a	0.48 ± 0.02a	4.80 ± 0.18a	0.80 ± 0.02a	2.55 ± 0.11a	0.73 ± 0.03a	1.82 ± 0.08a	۹ اردیبهشت/ March 30	2023-۱۴۰۲
0.21 ± 0.01b	0.45 ± 0.01b	4.43 ± 0.17b	0.75 ± 0.02b	2.43 ± 0.10b	0.68 ± 0.03b	1.75 ± 0.07b	۲۹ اردیبهشت/ April 19	
0.23 ± 0.01c	0.41 ± 0.01c	3.66 ± 0.14c	0.68 ± 0.02c	2.22 ± 0.08c	0.62 ± 0.02c	1.60 ± 0.06c	۱۸ خرداد به ۸ May	
0.25 ± 0.01d	0.37 ± 0.01d	3.35 ± 0.13d	0.63 ± 0.02d	2.03 ± 0.07d	0.55 ± 0.02d	1.48 ± 0.05d	۷ تیر/ June 28	

وجود حروف مشابه در هر ستون به منزله عدم وجود اختلاف معنی‌دار در سطح آماری ۵ درصد است.

The presence of similar letters in each column indicates no significant difference at the 5% statistical level.

جدول ۵: مقایسه میانگین اثر ساده تراکم کاشت بر صفات کیفی در سال‌های ۱۴۰۱ و ۱۴۰۲

Table 5: Comparison of the mean simple effects of planting density on qualitative traits in the years 2022 and 2023

نسبت کاروتنوئید به کلروفیل Carotene Chlorophyll Ratio	کاروتنوئیدها Carotenoids (mg/g)	محتوای ایندیگو کارمین Indigo carmine Content (g/m ²)	ایندیگو کارمین Indigo carmine (%)	کلروفیل کل Total Chlorophyll (mg/g)	کلروفیل b Chlorophyll b (mg/g)	کلروفیل a Chlorophyll a (mg/g)	تراکم Density (plants per m ²)	سال Year
0.23 ± 0.01a	0.40 ± 0.01a	3.12 ± 0.12a	0.68 ± 0.02a	2.29 ± 0.10a	0.63 ± 0.03a	1.66 ± 0.07a	30	۱۴۰۱ 2022
0.25 ± 0.01b	0.38 ± 0.01b	4.83 ± 0.18b	0.65 ± 0.02b	2.21 ± 0.08b	0.60 ± 0.02b	1.61 ± 0.06b	40	
0.27 ± 0.01c	0.36 ± 0.01c	3.80 ± 0.15c	0.62 ± 0.01c	2.13 ± 0.07c	0.57 ± 0.02c	1.56 ± 0.05c	50	
0.29 ± 0.01d	0.34 ± 0.01d	2.89 ± 0.11d	0.59 ± 0.01d	2.03 ± 0.06d	0.53 ± 0.02d	1.50 ± 0.04d	60	
0.21 ± 0.01a	0.44 ± 0.01a	3.46 ± 0.13a	0.73 ± 0.02a	2.37 ± 0.10a	0.67 ± 0.03a	1.70 ± 0.07a	30	۱۴۰۲ 2023
0.23 ± 0.01b	0.42 ± 0.01b	5.12 ± 0.19b	0.70 ± 0.02b	2.29 ± 0.08b	0.64 ± 0.02b	1.65 ± 0.06b	40	
0.25 ± 0.01c	0.39 ± 0.01c	4.10 ± 0.16c	0.67 ± 0.01c	2.21 ± 0.07c	0.61 ± 0.02c	1.60 ± 0.05c	50	
0.27 ± 0.01d	0.37 ± 0.01d	3.18 ± 0.12d	0.64 ± 0.01d	2.11 ± 0.06d	0.57 ± 0.02d	1.54 ± 0.04d	60	

وجود حروف مشابه در هر ستون به منزله عدم وجود اختلاف معنی‌دار در سطح آماری ۵ درصد است.

The presence of similar letters in each column indicates no significant difference at the 5% statistical level.

جدول ۶: مقایسه میانگین اثر متقابل تراکم و تاریخ کاشت بر صفات کیفی (۱۴۰۱)

Table 6: Mean comparison of the interaction effect of planting density and planting date on qualitative traits (2022)

نسبت کاروتنوئید به کلروفیل Carotene Chlorophyll Ratio	کاروتنوئیدها Carotenoids (mg/g)	محتوای ایندیگو کارمین Indigo carmine Content (g/m ²)	ایندیگو کارمین Indigo carmine (%)	کلروفیل کل Total Chlorophyll (mg/g)	کلروفیل b Chlorophyll b (mg/g)	کلروفیل a Chlorophyll a (mg/g)	تراکم Density plants per m ²	تاریخ کاشت Planting Date
0.18 ± 0.01a	0.48 ± 0.02a	3.98 ± 0.15a	0.82 ± 0.02a	2.60 ± 0.15a	0.75 ± 0.05a	1.85 ± 0.10a	30	۹ اردیبهشت March 30
0.20 ± 0.01ab	0.45 ± 0.02ab	5.91 ± 0.22a	0.79 ± 0.02ab	2.52 ± 0.12ab	0.72 ± 0.04ab	1.80 ± 0.08ab	40	
0.22 ± 0.01bc	0.43 ± 0.01bc	4.73 ± 0.18ab	0.75 ± 0.02bc	2.45 ± 0.10bc	0.69 ± 0.03bc	1.76 ± 0.07bc	50	
0.24 ± 0.01c	0.40 ± 0.01c	3.67 ± 0.14b	0.70 ± 0.01c	2.35 ± 0.09c	0.65 ± 0.03c	1.70 ± 0.06c	60	
0.19 ± 0.01a	0.45 ± 0.02a	3.71 ± 0.14a	0.78 ± 0.02a	2.48 ± 0.13a	0.70 ± 0.04a	1.78 ± 0.09a	30	۲۹ اردیبهشت April 19
0.21 ± 0.01ab	0.43 ± 0.01ab	5.41 ± 0.20a	0.74 ± 0.02ab	2.42 ± 0.10ab	0.68 ± 0.03ab	1.74 ± 0.07ab	40	
0.23 ± 0.01bc	0.40 ± 0.01bc	4.42 ± 0.17ab	0.71 ± 0.01bc	2.33 ± 0.09bc	0.64 ± 0.03bc	1.69 ± 0.06bc	50	
0.25 ± 0.01c	0.38 ± 0.01c	3.42 ± 0.13b	0.68 ± 0.01c	2.23 ± 0.07c	0.60 ± 0.02c	1.63 ± 0.05c	60	
0.21 ± 0.01a	0.42 ± 0.01a	2.93 ± 0.11a	0.70 ± 0.02a	2.30 ± 0.12a	0.65 ± 0.04a	1.65 ± 0.08a	30	۱۸ خرداد May 8
0.23 ± 0.01ab	0.40 ± 0.01ab	4.70 ± 0.18a	0.67 ± 0.02ab	2.22 ± 0.10ab	0.62 ± 0.03ab	1.60 ± 0.07ab	40	
0.25 ± 0.01bc	0.37 ± 0.01bc	3.62 ± 0.14ab	0.64 ± 0.01bc	2.14 ± 0.09bc	0.59 ± 0.03bc	1.55 ± 0.06bc	50	
0.27 ± 0.01c	0.35 ± 0.01c	2.66 ± 0.10b	0.60 ± 0.01c	2.03 ± 0.07c	0.55 ± 0.02c	1.48 ± 0.05c	60	
0.23 ± 0.01a	0.38 ± 0.01a	2.64 ± 0.10a	0.65 ± 0.02a	2.08 ± 0.10a	0.58 ± 0.03a	1.50 ± 0.07a	30	۷ تیر June 28
0.25 ± 0.01ab	0.36 ± 0.01ab	4.32 ± 0.16a	0.62 ± 0.02ab	2.00 ± 0.08ab	0.55 ± 0.02ab	1.45 ± 0.06ab	40	
0.27 ± 0.01bc	0.34 ± 0.01bc	3.28 ± 0.13ab	0.59 ± 0.01bc	1.92 ± 0.07bc	0.52 ± 0.02bc	1.40 ± 0.05bc	50	
0.29 ± 0.01c	0.32 ± 0.01c	2.41 ± 0.09b	0.56 ± 0.01c	1.83 ± 0.06c	0.48 ± 0.02c	1.35 ± 0.04c	60	
0.25 ± 0.01a	0.35 ± 0.01a	2.42 ± 0.09a	0.60 ± 0.02a	1.94 ± 0.09a	0.52 ± 0.03a	1.42 ± 0.06a	30	۲۷ تیر July 17
0.27 ± 0.01ab	0.33 ± 0.01ab	3.99 ± 0.15a	0.57 ± 0.01ab	1.87 ± 0.07ab	0.49 ± 0.02ab	1.38 ± 0.05ab	40	
0.29 ± 0.01bc	0.31 ± 0.01bc	3.03 ± 0.12ab	0.54 ± 0.01bc	1.77 ± 0.06bc	0.45 ± 0.02bc	1.32 ± 0.04bc	50	
0.31 ± 0.01c	0.29 ± 0.01c	2.16 ± 0.08b	0.51 ± 0.01c	1.68 ± 0.04c	0.42 ± 0.01c	1.26 ± 0.03c	60	
0.28 ± 0.01a	0.32 ± 0.01a	2.12 ± 0.08a	0.55 ± 0.01a	1.83 ± 0.07a	0.48 ± 0.02a	1.35 ± 0.05a	30	۱۶ مرداد August 7
0.30 ± 0.01ab	0.30 ± 0.01ab	3.66 ± 0.14a	0.52 ± 0.01ab	1.75 ± 0.06ab	0.45 ± 0.02ab	1.30 ± 0.04ab	40	
0.32 ± 0.01bc	0.28 ± 0.01bc	2.72 ± 0.10ab	0.49 ± 0.01bc	1.66 ± 0.04bc	0.41 ± 0.01bc	1.25 ± 0.03bc	50	
0.34 ± 0.01c	0.26 ± 0.01c	2.01 ± 0.08b	0.46 ± 0.01c	1.58 ± 0.04c	0.38 ± 0.01c	1.20 ± 0.03c	60	

وجود حروف مشابه در هر ستون به منزله عدم وجود اختلاف معنی دار در سطح آماری ۵ درصد است.

The presence of similar letters in each column indicates no significant difference at the 5% statistical level.

جدول ۷: مقایسه میانگین اثر متقابل تراکم و تاریخ کاشت بر صفات کیفی (۱۴۰۲)

Table 7: Mean comparison of the interaction effect of planting density and planting date on qualitative traits (2023)

نسبت کاروتنوئید به کلروفیل Carotene Chlorophyll Ratio	کاروتنوئیدها Carotenoids (mg/g)	محتوای ایندیگو کارمین Indigo carmine Content (g/m ²)	ایندیگو کارمین Indigo carmine (%)	کلروفیل کل Total Chlorophyll (mg/g)	کلروفیل b Chlorophyll b (mg/g)	کلروفیل a Chlorophyll a (mg/g)	تراکم Density plants per m ²	تاریخ کاشت Planting Date
0.17 ± 0.01a	0.52 ± 0.02a	4.25 ± 0.16a	0.85 ± 0.02a	2.68 ± 0.13a	0.78 ± 0.04a	1.90 ± 0.09a	30	۹ اردیبهشت March 30
0.19 ± 0.01ab	0.49 ± 0.02ab	6.15 ± 0.23a	0.82 ± 0.02ab	2.60 ± 0.11ab	0.75 ± 0.03ab	1.85 ± 0.08ab	40	
0.21 ± 0.01bc	0.46 ± 0.01bc	4.92 ± 0.19ab	0.78 ± 0.02bc	2.52 ± 0.10bc	0.72 ± 0.03bc	1.80 ± 0.07bc	50	
0.23 ± 0.01c	0.43 ± 0.01c	3.86 ± 0.15b	0.73 ± 0.01c	2.42 ± 0.09c	0.68 ± 0.03c	1.74 ± 0.06c	60	
0.18 ± 0.01a	0.49 ± 0.02a	3.84 ± 0.15a	0.80 ± 0.02a	2.54 ± 0.11a	0.72 ± 0.03a	1.82 ± 0.08a	30	۲۹ اردیبهشت April 19
0.20 ± 0.01ab	0.46 ± 0.01ab	5.62 ± 0.21a	0.77 ± 0.02ab	2.48 ± 0.10ab	0.70 ± 0.03ab	1.78 ± 0.07ab	40	
0.22 ± 0.01bc	0.43 ± 0.01bc	4.62 ± 0.18ab	0.74 ± 0.01bc	2.40 ± 0.09bc	0.67 ± 0.03bc	1.73 ± 0.06bc	50	
0.24 ± 0.01c	0.40 ± 0.01c	3.62 ± 0.14b	0.70 ± 0.01c	2.30 ± 0.07c	0.63 ± 0.02c	1.67 ± 0.05c	60	
0.20 ± 0.01a	0.45 ± 0.01a	3.06 ± 0.12a	0.73 ± 0.02a	2.35 ± 0.10a	0.67 ± 0.03a	1.68 ± 0.07a	30	۱۸ خرداد May 8
0.22 ± 0.01ab	0.42 ± 0.01ab	4.90 ± 0.19a	0.70 ± 0.02ab	2.27 ± 0.08ab	0.64 ± 0.02ab	1.63 ± 0.06ab	40	
0.24 ± 0.01bc	0.39 ± 0.01bc	3.82 ± 0.15ab	0.67 ± 0.01bc	2.19 ± 0.07bc	0.61 ± 0.02bc	1.58 ± 0.05bc	50	
0.26 ± 0.01c	0.36 ± 0.01c	2.86 ± 0.11b	0.63 ± 0.01c	2.08 ± 0.06c	0.57 ± 0.02c	1.51 ± 0.04c	60	
0.22 ± 0.01a	0.41 ± 0.01a	2.77 ± 0.11a	0.68 ± 0.02a	2.15 ± 0.08a	0.60 ± 0.02a	1.55 ± 0.06a	30	۷ تیر June 28
0.24 ± 0.01ab	0.38 ± 0.01ab	4.52 ± 0.17a	0.65 ± 0.02ab	2.07 ± 0.07ab	0.57 ± 0.02ab	1.50 ± 0.05ab	40	
0.26 ± 0.01bc	0.35 ± 0.01bc	3.48 ± 0.13ab	0.62 ± 0.01bc	1.99 ± 0.06bc	0.54 ± 0.02bc	1.45 ± 0.04bc	50	
0.28 ± 0.01c	0.33 ± 0.01c	2.61 ± 0.10b	0.59 ± 0.01c	1.90 ± 0.04c	0.50 ± 0.01c	1.40 ± 0.03c	60	

وجود حروف مشابه در هر ستون به منزله عدم وجود اختلاف معنی دار در سطح آماری ۵ درصد است.

The presence of similar letters in each column indicates no significant difference at the 5% statistical level.

جدول ۸: همبستگی (ضریب پیرسون) بین صفات کیفی

Table 8: Correlation (Pearson coefficient) between qualitative attributes

نسبت کاروتنوئید به کلروفیل Carotene Chlorophyll Ratio	کاروتنوئیدها Carotenoids	محتوای ایندیگو کارمین Indigo carmine Content	ایندیگو کارمین Indigo carmine	کلروفیل کل Total Chlorophyll	کلروفیل b Chlorophyll b	کلروفیل a Chlorophyll a	صفات Attributes
						1	کلروفیل a Chlorophyll a
					1	0.98**	کلروفیل b Chlorophyll b
				1	0.99**	0.99**	کلروفیل کل Total Chlorophyll
			1	0.94**	0.93**	0.95**	ایندیگو کارمین Indigo carmine
		1	0.91**	0.86**	0.85**	0.87**	محتوای ایندیگو کارمین Indigo carmine Content
	1	0.83**	0.92**	0.95**	0.94**	0.96**	کاروتنوئیدها Carotenoids
1	-0.78**	-0.68**	-0.75**	-0.81**	-0.80**	-0.82**	نسبت کاروتنوئید به کلروفیل Carotene Chlorophyll Ratio

نتیجه‌گیری

در این پژوهش، واکنش گیاه دارویی-صنعتی نیل به زمان کاشت و تراکم بوته در شرایط اقلیمی شمال استان خوزستان مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که هر دو عامل زراعی تأثیر معنی‌داری بر صفات فتوسنتزی و محتوای ایندیگو کارمین دارند. کاشت در اوایل فصل بهار (اردیبهشت) حداکثر مقدار کلروفیل و رنگدانه طبیعی را فراهم کرد، در حالی که تأخیر در کاشت به‌ویژه در تابستان، با کاهش معنی‌دار این صفات همراه بود. بهترین نتیجه از نظر محتوای فتوسنتزی و ثانویه در تراکم ۴۰ بوته در مترمربع به دست آمد. افزایش تراکم بیش از حد منجر به رقابت بین بوته‌ها و کاهش عملکرد کیفی شد. همبستگی مثبت بین کلروفیل و ایندیگو کارمین نشان داد که فعالیت فتوسنتزی و سنتز متابولیت‌های ثانویه در این گیاه مرتبط است. در مجموع، کاشت زودهنگام و تراکم بهینه ۴۰ بوته در متر مربع به‌عنوان مهم‌ترین راهبردهای زراعی در جهت افزایش کیفیت و مقدار محصول پیشنهاد می‌شوند.

منابع

Abouseidi, N., Jokar, M., Ayin, A., & Tayyi Samirmi, J. (2021). Evaluation of some quantitative and qualitative traits of hyssop medicinal plant under the influence of nitrogen fertilizer and heat stress (Case study: Semi-warm climatic conditions of Jiroft). *Journal of Sustainable Agriculture and Production*, 31(2), 93–109. <https://doi.org/10.22034/saps.2021.13100>

Ali, W. N., & Atrakchii, A. O. Al. (2022). Effect of Gibberellic, Salicylic Acids, and NPK Fertilizers on growth and chemical constituents of Rosemary plants (*Rosmarinus officinalis* L.). *Journal of Pharmaceutical Negative Results*, 1842–1850. <https://doi.org/10.47750/pnr.2022.13.S03.281>.

- Alizadeh, P., Sodaizadeh, H., Mosleh Arani, A., & Hakimzadeh, M. A. (2023). The effect of cultivation system on the morphological, physiological and biochemical characteristics of lemon grass (*Cymbopogon citratus*). Journal of Arid Biome, 13 (1), 1–19. <https://doi.org/10.29252/ARIDBIOM.2023.20304.1938>
- Annie Felicia, A., & Muthulingam, M. (2012). Biochemical and pharmacological evaluation of *Indigofera tinctoria* Linn. International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research, 17 (2), 215–220. <https://www.ijpsrr.com>
- Arnon, D. N. (1967). Method of extraction of chlorophyll in the plants. Agronomy Journal, 23, 112–112.
- Chanayath, N., Lhieochaiphant, S., & Phutrakul, S. (2012). Pigment extraction techniques from the leaves of *Indigofera tinctoria* Linn. And *Baphicacanthus cusia* Brem. And chemical structure analysis of their major components. CMU Journal, 1 (2), 149–161. http://www.cmu.ac.th/cmu_journal/
- Izadi, Z., Biabani, A., Sabouri, H., Bahreininejad, B., & Qolizadeh, A. L. (2022). Evaluation of changes in alkaloid content and some physiological traits of *Datura stramonium* L. under the influence of planting date and plant density levels. Journal of Horticultural Science, 36(3), 657–669. (In Persian with English abstract) <https://doi.org/10.22067/jhs.2021.72958.1095>
- Jain, S., Nayak, S., & Joshi, P. (2011). Phytochemical study and physical evaluation of *Indigofera tinctoria* leaves. Pharmacie Global, 1, 1–2.
- Khoramdel, S., Rezvani Moghaddam, P., Hooshmand, M., & Moalem Benhangi, F. (2016). Effect of manure levels and plant density on grain yield and its components, leaf yield and indigo content of *Indigofera tinctoria*. Paper presented at the 3rd National Congress on Applied Research in Agricultural Sciences: Healthy Food from Farm to Table. <https://civilica.com/doc/953979>
- Khorshidi, J., Fakhr Tabatabaei, M., Omidbaigi, R., & Sefidkon, F. (2009). Effect of densities of planting on yield and essential oil components of *Pimpinella affinis*. Journal of Agricultural Science, 1 (1), 152–157.
- Koocheki, A., Joorabian, S., & Nassiri Mahallati, M. (2020). Effect of planting date and plant density on growth and yield of safflower (*Carthamus tinctorius* L.) under Mashhad conditions. Iranian Journal of Field Crops Research, 8 (1), 1–10. <https://doi.org/10.22049/ijfcr.2020.26735.1450>
- Laitonjam, W. S., & Wangkheirakpam, S. (2011). Comparative study of the major components of the indigo dye obtained from *Strobilanthes flaccidifolius* Nees. And *Indigofera tinctoria* Linn.
- Maier, W., Schumann, B., & Gröger, D. (1991). Biosynthesis of indoxyl derivatives in *Isatis tinctoria* and *Polygonum tinctorium*. Phytochemistry, 29 (1), 117–119. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(91\)85031-5](https://doi.org/10.1016/0031-9422(91)85031-5)
- Modafteh Beyzadi, N., Rezvani Moghaddam, P., & Jahan, M. (2018). Effect of sowing date and plant density on morphological traits and yield of medicinal plant *Indigofera tinctoria* L. Agroecology Journal, 10 (4), 1067–1079. <https://doi.org/10.22069/agroecology.2018.14203.1481>
- Omid Bighi, A. (2021). Comprehensive guide to the production and processing of medicinal plants (Vol. 1). Behnashr Publications (Astān-e Quds Razavi).
- Panahandeh, J., Ammari Pardaz, J., & Abdollahi, Sh. (2022). Effect of plant density on dry matter accumulation, chlorophyll index, and root inulin content in two varieties of Witloof chicory. Journal of Sustainable Agriculture and Production, 32(3), 149–158. <https://doi.org/10.22034/saps.2022.48776.2764>
- Pramod, K. T., Vishnu, K. R., Ashish, S., Sambath, K., Yogendra, S., Manoj, S., & Manoj, G. (2010). Preliminary phytochemical screening and evaluation of anti-inflammatory activity of ethanolic extract of leaves of *Indigofera tinctoria* Linn. Journal of Current Pharmaceutical Research, 3 (1), 47–50.
- Saberi, R., Feyzbakhsh, M. T., Mokhtarpour, H., Mosavat, S. A., & Askar, M. (2010). Effect of plant density and planting pattern on grain yield and yield components in grain maize cv. KSC704. Seed and Plant Production Journal, 26 (2), 123–136.
- Sales, E., Kanhonou, R., Baixeli, C., Giner, A., Cooke, D., Gilbert, K., Arrilaga, I., Segura, J., & Ros, R. (2016). Sowing date, transplanting, plant density and nitrogen fertilization affect indigo production from *Isatis* species in a Mediterranean region of Spain. Industrial Crops and Products, 23, 29–39. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.12.036>
- Sajed Gollojeh, K., Khomari, S., Shekhzadeh, P., Sabaghnia, N., & Mohebodini, M. (2020). The effect of foliar spray of nano silicone and salicylic acid on physiological traits and seed yield of spring rapeseed at water limitation conditions. Journal of Crop Production, 12 (4), 137–156. <https://doi.org/10.22069/ejcp.2020.16396.2221>
- Sani Khani, M., Akbari, A., & Khairi, A. (2021). The effect of phenylalanine and tryptophan on morphological and physiological traits of Abu Jahl watermelon (*Citrullus colocynthis* L.). Journal of Plant Process and Function, 35 (9), 317–327.
- Saremi, S., Gholipour, M., Abbasdokht, H., Naghdi Badi, H., Mehrafarin, A., & Asghari, H. R. (2021). Phytochemical response of *Physalis alkekengi* L. to foliar application of amino acids. Ecophytochemical Journal of Medicinal Plants (2), 39–52. <https://doi.org/10.30495/ejmp.2021.694469>
- Siahmansour, S., Ehtesham-Nia, A., & Rezaeinejad, A. (2020). Effect of salicylic acid foliar application on Morphophysiological and biochemical traits of Goldenberry (*Physalis peruviana* L.) under salinity stress condition. Journal of Plant Production Research, 27 (1), 165–178. <https://doi.org/10.22069/jopp.2020.16087.2448>

Strobel, J., & Gröger, D. (1989). Über das Vorkommen von Indigovorstufen in *Isatis* -species. *Biochem Physiology Pflanzen*, 114, 321–327.

Tahmasebi, A., Kamali, H. R., & Zakari Darbaghi, Z. (2025). Evaluation of plant density effect on the nutritional quality of seeds in four quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) cultivars under hot and humid conditions (Case study: Minab County). *Journal of Research in Plant Metabolites*, 3(1), 5–19.

<https://doi.org/10.22034/jrpsm.2025.517031.1064>

Zargaran Khouzan, M. R., & Daei Naseri, S. M. A. (2025). Nile: A deep dive into the history of natural and synthetic indigo. Arshak Publishing. (Based on the book *Indigo in Culture, Science, and Technology* by Professor Matthias Seidel). Arshak Publishing. Arak: Iran.

Zargaran Khouzani, M. R., Zargaran, S., & Daei Naseri, S. M. A. (2022). A review on biochemical and pharmacological properties of medicinal indigo plant (*Indigofera tinctoria* L.). Paper presented at the 1st National Congress on Medicinal Plants, Traditional Medicine and Community Health, Damghan, Iran.

<https://civilica.com/doc/1582008>.