University of Tehran Press

Journal of Crops Improvement

Online ISSN: 2345-6957

Homepage: https://jci.ut.ac.ir/

Effects of Humic Acid and Salinity Stress on Some Germination and Morpho-physiological Indices of Iranian St Johns Wort in in Vitro Conditions

Mehrdad Rasouli[1]✉ | Alireza Noroozisharaf[2]

1. Corresponding Author, Department of Horticultural Science, Sayyed Jamaleddin Asadabadi University, Asadabad, Iran. E-mail: rasouli@sjau.ac.ir
2. Department of Horticultural Science, Sayyed Jamaleddin Asadabadi University, Asadabad, Iran. E-mail: noroozi2ar@yahoo.com

Article Info

Article type:
Research Article

Article history:
Received: 05 August 2021
Received in revised form: 07 January 2022
Accepted: 29 January 2022
Published online: 17 December 2022

Keywords:
Flavonoids,
germination percentage,
organic matter,
peroxidase,
tissue culture.

ABSTRACT

The use of compounds that can improve plant tolerance to abiotic environmental stress, including salinity, is important. To evaluate the adjustment of salinity stress using humic acid (HA), a factorial layout is conducted based on a complete randomized design with three replications on the *Hypericum perforatum* L. as an Iranian medicinal plant are collected from Hamadan province in the tissue culture laboratory of the Faculty of Agriculture, Sayyed Jamaleddin Asadabadi University during 2019. Experimental treatments include NaCl as salinity at three levels (such as 0, 50, and 100 mmol.L^{-1}) and HA at four levels (control, 25, 50, and 100 mg.L^{-1}). Results indicate that the plants treated with 50 mg.L^{-1} HA without salinity have had the highest germination percentage (98.65), germination rate (38.94) and root length (34.21 mm). The highest plant height, fresh and dry weight of both shoots and roots and total chlorophyll are obtained under control conditions and HA with a concentration of 100 mg.L^{-1}. On the contrary, the highest amount of phenol in the treatment is 50 mmol.L^{-1} salinity and HA with a concentration of 50 mg.L^{-1}. In the treatment of 100 mmol.L^{-1} salinity and HA with a concentration of 50 mg.L^{-1}, the highest amount of total antioxidants (99.77 mg/g FW) and total flavonoids (2.39 mg/Qe g FW) and the lowest amount of hydrogen peroxide (9.12 µg/g FW) are obtained. Results show that the mitigating effect, especially the application of HA of 50 mg.L^{-1} levels, can affect the physiological processes and morphological traits of the *Hypericum perforatum* L. under salinity stress.

Cite this article: Rasouli, M., & Noroozisharaf, A. R. (2022). Effects of Humic Acid and Salinity Stress on Some Germination and Morpho-physiological Indices of Iranian St Johns Wort in in Vitro Conditions. *Journal of Crops Improvement*, 24 (4), 1293-1310. DOI: http://doi.org/10.22059/jci.2022.328340.2593

© The Authors.
Publisher: University of Tehran Press.
DOI: http://doi.org/10.22059/jci.2022.328340.2593

انتشارات دانشگاه تهران

به زراعی کشاورزی

شاپا الکترونیکی: ۶۹۵۷-۲۳۴۵

Homepage: https://jci.ut.ac.ir/

تأثیر هیومیک‌اسید و تنش شوری بر برخی شاخص‌های جوانه‌زنی و مرفوفیزیولوژیکی گل‌راعی ایرانی در شرایط کشت بافت

مهرداد رسولی[1]✉ | علیرضا نوروزی شرف[2]

۱. نویسنده مسئول، گروه علوم و مهندسی باغبانی و فضای سبز، دانشگاه سیدجمال الدین اسدآبادی، اسدآباد، ایران. رایانامه: rasouli@sjau.ac.ir

۲. گروه علوم و مهندسی باغبانی و فضای سبز، دانشگاه سیدجمال الدین اسدآبادی، اسدآباد، ایران. رایانامه: noroozi2ar@yahoo.com

اطلاعات مقاله

نوع مقاله: مقالهٔ پژوهشی

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۵/۱۴

تاریخ بازنگری: ۱۴۰۰/۱۰/۱۷

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۱۱/۰۹

تاریخ انتشار: ۱۴۰۱/۰۹/۲۶

کلیدواژه‌ها:
پراکسیداز،
درصد جوانه‌زنی،
فلاونوئید،
کشت بافت،
مواد آلی.

چکیده

کاربرد ترکیب‌هایی که بتواند تحمل گیاهان را به تنش‌های محیطی از جمله شوری افزایش دهد دارای اهمیت است. برای ارزیابی تعدیل تنش شوری با استفاده از هیومیک‌اسید آزمایشی به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار روی گیاه دارویی گل‌راعی بومی ایران توده همدان (*Hypericum perforatum* L.) در آزمایشگاه کشت بافت دانشکده کشاورزی دانشگاه سیدجمال الدین اسدآبادی در سال ۱۳۹۸ اجرا شد. تیمارهای آزمایشی شامل سه سطح شوری (صفر، ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌مول بر لیتر) نمک کلریدسدیمکلریدسدیم و چهار سطح هیومیک‌اسید (صفر، ۲۵، ۵۰، ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر) بود. بیش‌ترین درصد (۹۸/۶۵ درصد) و سرعت جوانه‌زنی (۳۸/۹۴) و طول ریشه (۳۴/۲۱ میلی‌متر) در تیمار ۵۰ میلی‌مول بر لیتر هیومیک‌اسید و بدون شوری به‌دست آمد. بیش‌ترین ارتفاع گیاه، وزن تر و خشک اندام هوایی، وزن تر و خشک ریشه و کلروفیل کل مربوط به شرایط بدون تنش و هیومیک‌اسید با غلظت ۱۰۰ میلی‌مول بر لیتر بود. بیش‌ترین مقدار فنل در تیمار شوری ۵۰ میلی‌مولار و هیومیک‌اسید با غلظت ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر بود. بیش‌ترین میزان آنتی‌اکسیدان (۹۹/۷۷ میلی‌گرم بر گرم) و فلاونوئید کل (۲/۳۹ میلی‌گرم بر گرم) و کم‌ترین میزان پراکسیدهیدروژن (۹/۱۲ میکروگرم بر گرم) در تیمار شوری ۱۰۰ میلی‌مولار و هیومیک‌اسید با غلظت ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر به‌دست آمد. نتایج پژوهش نشان داد اثر تعدیل‌کننده به‌ویژه کاربرد سطوح ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر هیومیک‌اسید می‌تواند بر فرایندهای فیزیولوژیک و صفات رویشی گیاه گل‌راعی تحت تنش شوری اثرگذار باشد.

استناد: رسولی، م. و نوروزی شرف، ع (۱۴۰۱). تأثیر هیومیک‌اسید و تنش شوری بر برخی شاخص‌های جوانه‌زنی و مرفوفیزیولوژیکی گل‌راعی ایرانی در شرایط کشت بافت. *به‌زراعی کشاورزی*، ۲۴ (۴)، ۱۳۱۰-۱۲۹۳. DOI: http://doi.org/10.22059/jci.2022.328340.2593

ناشر: مؤسسه انتشارات دانشگاه تهران.

© نویسندگان.

CC BY NC

۱. مقدمه

در حال حاضر پژوهش در گیاهانی که از طریق کشت بافت قابل باززایی باشند و به‌ویژه در گیاهان مهم از نظر دارویی و اقتصادی هستند دارای اهمیت ویژه می‌باشد. این به‌دلیل افزایش قابل‌توجه تقاضا برای داروهای گیاهی طبیعی است که تأثیر جانبی کم‌تری دارند. کاهش منابع طبیعی ناشی از شهرنشینی و صنعتی‌شدن که باعث آسیب در بقای این گیاهان شده است، پژوهش‌گران را بر آن داشته تا از فناوری کشت بافت گیاهی که می‌تواند ساده، سریع و در مقیاس بزرگ این گیاهان را تکثیر نماید، استفاده کنند (Sharma *et al*., 2013). ریزازدیادی یکی از روش‌های تکثیر غیرجنسی گیاهان با استفاده از روش کشت بافت گیاهی است که در آن طی مدت زمان کوتاهی تعداد زیادی گیاه تولید می‌شود. سیستم‌های کشت بافت گیاهی غالباً به‌عنوان سیستم‌های مدل برای پژوهش‌های مختلف فیزیولوژیکی، بیوشیمیایی، ژنتیکی و تنوع مرفولوژیکی گیاهان مورداستفاده قرار می‌گیرند. فنون کشت‌بافت گیاهی در این راستا کاربرد زیادی دارد، چون به‌عنوان ابزاری برای تکثیر رویشی محصولات مهم باغبانی و نیز محصولاتی که استعداد استفاده تجاری در آینده را دارند، به‌کار می‌رود (Vishwanathan, 2018).

گل‌راعی با نام علمی *Hypericum perforatum* L. گیاهی چندساله و مهم از خانواده Hypericaceae است (Crockett, 2010). این گیاه دارویی حاوی دامنه وسیعی از متابولیت‌های ثانویه و منبع طبیعی ترکیبات فعالی نظیر نفتودیانترون‌ها (هایپریسین[1] و سودو هایپریسین[2])، فلوروگلوسینول‌ها[3]، تانن‌ها، گزانتون‌ها، فلاونوئیدها، اسیدهای فنولیک و اسانس روغنی فرّار است (Karppinen *et al*., 2010). این گیاه خاصیت آرام‌بخشی و قابض دارد و در طب سنتی برای درمان دردهای مزمن عصبی، اختلالات یائسگی، اضطراب و افسردگی استفاده می‌شود (Bilia *et al*., 2002). امروزه گل‌راعی مهم‌ترین منبع طبیعی ضدافسردگی به لحاظ ارزش اقتصادی است (Karppinen *et al*., 2010). افزایش روزافزون علاقه بازار به اثر ضد افسرگی این گیاه باعث شده تا انگیزه برای توسعه، افزایش سرعت تولید و تکثیر و اصلاح این گیاه افزایش یابد (Galla *et al*., 2019). کشت بافت این گیاه بومی می‌تواند روش جایگزین مناسبی برای تکثیر با سرعت بالا برای تولید مواد گیاهی مفید باشد. امروزه یکی از مهم‌ترین راه‌کارهای بهبود عملکرد گیاه تحت شرایط نامساعد، از جمله شوری، منابع اصلی زیست‌فناوری و کشت بافت هم‌چون عوامل ژنتیکی مقاومت به تنش‌های شوری و ثبات عملکرد گیاه می‌باشد. دستیابی به این هدف مستلزم آن است که پژوهش‌های وسیعی جهت شناسایی عوامل ایجادکننده و کنترل اجزای تنظیم‌کننده‌ی آن‌ها طول دوره تنش صورت گیرد (Elmaghrabi *et al*., 2018).

تمام گیاهان در طول چرخه زندگی خود تحت تأثیر تنش‌های فراوانی قرار می‌گیرند. تنش شوری یکی از مهم‌ترین عوامل محدودکننده رشد و عملکرد گیاهان در مناطق خشک و نیمه‌خشک است و شوری خسارت‌های مستقیم روی گونه‌های متعدد گیاهی وارد می‌کند. توانایی گیاهان برای سازش به تنش‌های محیطی به نوع و شدت تنش، مدت تنش، گونه گیاهی و نیز مرحله وقوع تنش، بستگی دارد. در پاسخ به تنش شوری نیز رشد و عملکرد بیش‌تر گیاهان کاهش می‌یابد. به‌طوری‌که کاهش سطح برگ، سریع‌ترین پاسخ گیاه به شوری است و با افزایش سطح شوری، توسعه برگ‌ها متوقف می‌شود (Parida & Das, 2005). تیمار شوری، وزن اندام هوایی، ریشه و محتوای کلروفیل را در گیاهان کاهش می‌دهد. در سه گیاه دارویی زنیان، رازیانه و شوید با اعمال تنش خشکی و شوری، درصد و سرعت جوانه‌زنی هر سه گیاه کاهش می‌یابد (Borromand & Koocheki, 2006). ارزیابی تغییرات فیزیولوژیک و بیوشیمیایی در شرایط تنش‌زا راه‌کاری مناسب جهت مطالعه جنبه‌های وراثتی تحمل به

1. Hypericin
2. Pseudohypericin
3. Phloroglucinol

تنش فراهم می‌آورد. با توجه به اثرهای اسمزی و یونی ناشی از تنش شوری، گیاهان سازوکارهایی نظیر تعدیل تنش اسمزی، حفظ تعادل یونی سلول و کاهش آثار سمیت یونی را به‌کار می‌گیرند (Munns & Tester, 2008). گیاهان برای مقابله با تنش اکسیدانی از سیستم دفاعی مؤثری که شامل افزایش فعالیت آنزیم‌های آسکوربات پراکسیداز، کاتالاز، سوپراکسید دیسموتاز، پراکسیداز، گلوتاتیون ردوکتاز، فعالیت مهار رادیکال DPPH، ترکیبات فنلی و تعداد دیگری از مواد آنتی‌اکسیدانی است، استفاده می‌کنند (Zhao *et al.*, 2019). غلظت این بیومولکول‌ها پس از مواجهه گیاه با تنش به سرعت افزایش یافته و هزینه‌های پاسخ به تنش را در گیاه تعدیل می‌کنند (García-Caparrós *et al.*, 2019).

استفاده از انواع کودهای طبیعی بدون اثرات مخرب زیست‌محیطی می‌تواند در جهت بالابردن عملکرد گیاه به‌ویژه در شرایط متغیر محیطی مثمرثمر واقع شود، هیومیک‌اسید ازمنابع مختلف نظیر خاک، هوموس، پیت، لیگنیت اکسیدشده و زغال‌سنگ استخراج می‌شود که در اندازه مولکولی و ساختار شیمیایی متفاوت می‌باشند (Albayrak & Camas, 2005). مدت‌هاست که نقش و اثر هیومیک‌اسید در فرایندهای مرفولوژیکی و فیزیولوژیکی گیاهان شناخته شده است (Eyheraguibel *et al.*, 2008). هیومیک‌اسید براساس اثر بر نوع گیاهان و میزان غلظت، قادر به تحریک رشد گیاه است. استفاده از هیومیک‌اسید جهت محلول غذایی در بسترهای مختلف موجب افزایش قابل‌توجهی در رشد گیاهان شده است. سازوکار اثر هیومیک‌اسید نشان می‌دهد که هیومیک‌اسید میزان جذب مواد ریزمغذی را افزایش داده است. به‌دلیل ترکیب ویژه آن، هیومیک‌اسید قادر به کاهش اثرات نامطلوب نمک و شوری خاک می‌باشد. وجود هیومیک‌اسید در بستر کشت می‌تواند باعث بهبود فتوسنتز و نیز تحمل گیاهان در برابر تنش‌های زنده و غیرزنده شود و سیستم گیاهی را با افزودن آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی، فولیک‌اسید، بهبود جذب منیزیم و آهن‌سوختگی برگ‌ها را به تأخیر اندازد (Zaremanesh *et al.*, 2019). تأثیر محلول‌پاشی برگی هیومیک‌اسید روی بسیاری از گیاهان از جمله گوجه‌فرنگی، خیار، پنبه، انار و انگور نیز گزارش شده است (Ghanbarpour *et al.*, 2019El-Nemr *et al.*, 2012 ;). محلول‌پاشی هیومیک‌اسید بر ویژگی‌های رشدی و فیزیولوژیکی نعناع سبز در شرایط تنش خشکی بررسی شد و نشان داد محلول‌پاشی هیومیک‌اسید در غلظت ۱۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر بیش‌ترین تأثیر را در افزایش شاخص‌های رشدی آن داشت (Rostami *et al.*, 2019). هم‌چنین کاربرد هیومیک‌اسید توانست بر عملکرد کمی و کیفی گیاه همیشه‌بهار تأثیر مثبتی داشته باشد به‌طوری‌که کاربرد ۵۰۰ میلی‌گرم هیومیک‌اسید باعث افزایش میزان عملکرد و وزن دانه، عملکرد گلبرک، محتوای کاروتنوئید و کلروفیل کل، میزان فنول و درصد موسیلاژ آن شد (Tina *et al.*, 2015). کشت‌های درون‌شیشه‌ای یک محیط یکنواخت و منظم را برای بررسی میزان مقاومت به تنش شوری در گیاهان و اثرات تنظیم‌کننده‌های رشد در تعدیل اثرات تنش را فراهم می‌کنند. کاربرد کودهای آلی در شرایط درون‌شیشه‌ای باعث افزایش شاخص‌های جوانه‌زنی و رشدی گیاه دارویی پنیرباد (*Withania somnifera* L.) شد (Kaur *et al.,* 2018). پژوهش‌گران دیگری نشان دادند افزایش سطوح مختلف هیومیک‌اسید تا ۴۰ لیتر در هکتار در شرایط کشت خاکی تأثیر معنی‌داری در افزایش وزن تر و خشک، ارتفاع بوته و هم‌چنین میزان اسانس گل‌راعی داشت (Kaboli Farshchi *et al.*, 2016). با این‌حال، گزارش‌ها در خصوص تأثیر هیومیک‌اسید بر رشدونمو گیاه در شرایط تکثیر درون‌شیشه‌ای به‌ویژه در شرایط تنش‌های محیطی بسیار محدود می‌باشد. بنابراین هدف از این مطالعه بررسی اثرات بالقوه هیومیک‌اسید و غلظت بهینه آن بر گیاه دارویی گل‌راعی در کشت آزمایشگاهی در سطوح مختلف تنش شوری می‌باشد.

۲. مواد و روش‌ها

۲. ۱. مواد گیاهی، تهیه محیط کشت و اعمال تیمارها

بذور گیاه گل‌راعی بومی ایران توده همدان از مجموعه گیاهان دارویی پارک علم و فناوری استان همدان تهیه شد و با

استفاده از محلول هیپوکلریت‌سدیم پنج درصد به اضافه ۰/۱ درصد توین۲۰ به‌مدت پنج دقیقه ضدعفونی شد و سپس سه مرتبه با آب مقطر استریل آبکشی شد. از این بذور عاری از ویروس، جهت کشت در محیط درون‌شیشه‌ای استفاده شد. این آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی و به‌صورت فاکتوریل در سه تکرار با هشت ریزنمونه در هر تکرار در آزمایشگاه کشت بافت گیاهی انجام شد. تیمارهای آزمایشی شامل مقادیر مختلف هیومیک‌اسید خریداری‌شده از شرکت سیگما (Sigma Aldrich, USA 6-93-1415) (صفر، ۲۵، ۵۰، ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر) به‌همراه صفر، ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌مول بر لیتر کلریدسدیم بود، که به محیط کشت حاوی غلظت نمک‌های محیط کشت پایه MS[1] افزوده شد (Murashige & Skoog, 1962). میزان ساکارز ۳۰ گرم بر لیتر، آگار ۸ گرم برلیتر بود و pH محیط در ۵/۸ تنظیم شد. علاوه بر این به محیط کشت هورمون جیبرلین (GA_3) به میزان ۰/۱ گرم بر لیتر و ایندول بوتیریک‌اسید (IBA) ۰/۱ گرم بر لیتر، به‌همراه نمک‌های تیامین و پیرودکسین HCl و نیکوتئنیک اسید اضافه شد. پس از جوانه‌زنی بذور و در روز هفتم گیاهچه‌های حاصل از بذر پنج بار به فاصله یک هفته واکشت شدند تا کاهش مواد غذایی و تغییر در میزان غلظت تیمارهای هیومیک‌اسید و کلریدسدیم و بالارفتن غلظت نمک‌ها اتفاق نیافتد. در طی آزمایش تمامی شیشه‌های حاوی ریزنمونه‌های بذری و نمونه‌های واکشت‌شده در ژرمیناتور با دمای متناوب ۱۶ / ۲۵ درجه سانتی‌گراد (شب / روز) و دوره نوری هشت ساعت روشنایی نگه‌داری شد. پس از گذشت پنج روز از آخرین واکشت و گذشت مجموع ۴۰ روز از اعمال تیمارها نمونه‌های گیاهی در مرحله پنج برگی از ظروف کشت برداشته شد و به‌سرعت در فریزر ۸۰- منجمد شد تا در سنجش‌ها و بررسی‌های بیوشیمیایی مورداستفاده قرار گیرد.

۲. ۲. اندازه‌گیری صفات رشدی

اولین شمارش بذور جوانه‌زده ۲۴ ساعت پس از انتقال آن‌ها به محیط کشت صورت گرفت و بذوری را که ریشه‌چه آن‌ها قابل مشاهده بود به‌عنوان جوانه‌زده شمارش شدند، این کار تا زمانی‌که بذور قادر به جوانه‌زنی بودند ادامه پیدا کرد. بعد از گذشت هفت روز، با ثابت‌شدن تعداد بذور جوانه‌زده و اتمام دوره جوانه‌زنی شاخص‌های جوانه‌زنی شامل درصد جوانه‌زنی و سرعت جوانه‌زنی براساس روابط (۱) و (۲) به‌دست آمد.

$$PG = (n/N) \times 100$$ رابطه ۱)

PG: درصد جوانه‌زنی، n: تعداد کل بذرهای جوانه‌زده در طی دوره شمارش، N: تعداد کل بذرهای کشت‌شده در هر ظرف کشت (Behboudian *et al.*, 2006).

$$SG = \sum Ni / Di$$ رابطه ۲)

SG: سرعت جوانه‌زنی، Ni: بذور جوانه زده در هر روز، Di: روز شمارش (Mereddy, 2015).

پس از ۴۰ روز شاخص‌های رشدی مانند طول ریشه و طول گیاه (به‌وسیله دستگاه کولیس) و وزن تر ساقه و وزن تر ریشه (به‌وسیله ترازوی دیجیتال با دقت ۰/۰۰۰۱ گرم) اندازه‌گیری شد. برای تعیین وزن خشک، ابتدا نمونه‌ها با آب مقطر شسته شد و پس از جداکردن کامل از محیط کشت ساقه و ریشه در دمای ۷۵ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۴۸ ساعت، درون آون قرار داده شدند. سپس وزن خشک ساقه و وزن خشک ریشه کل گیاه مورد اندازه‌گیری قرار گرفت.

1. Murashige and Skoog medium

۲. ۳. اندازه‌گیری صفات بیوشیمیایی

برای اندازه‌گیری کلروفیل مقدار ۰/۰۵ گرم از بافت تازه برگ گیاه در مرحله پنج‌برگی با یک میلی‌لیتر استون ۸۰ درصد مخلوط شد. مخلوط به‌دست‌آمده به‌مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۶۰۰۰ rpm سانتریفیوژ شد و در نهایت عصاره استونی شفاف را جدا کرده و پس از نیم ساعت تاریکی کلروفیل با استفاده از روش اسپکتروفتومتری توسط دستگاه اسپکتروفتومتر (مدلItd T80 + UV/VIS; PG Instruments, Leicestershire، انگلستان) در طول موج‌های ۶۶۳ و ۶۴۵ نانومتر انجام گرفت. برای تعیین مقدار کلروفیل کل از رابطه (۳) استفاده شد (Strain & Svec, 1966).

رابطه ۳) $Chl_{a+b} = 7.15A_{663} + 18.71A_{645}$

که در روابط بالا A۶۴۵ و A۶۶۳ به‌ترتیب جذب نور در طول موج‌های ۶۴۵ و ۶۶۳ می‌باشند، Chl: کلروفیل نمونه برحسب میلی‌گرم بر میلی‌لیتر است.

فنل کل در عصاره برگ با معرف فولین سیکالتو اندازه‌گیری شد (Singleton & Rossi, 1965). مقدار جذب محلول با استفاده از اسپکتروفتومتر در طول موج ۷۶۵ نانومتر خوانده شد. از گالیک‌اسید به‌عنوان استاندارد استفاده شد و مقدار ترکیبات فنلی کل براساس معادل میلی‌گرم گالیک‌اسید در ۱۰۰ گرم وزن خشک بیان شد.

ظرفیت آنتی‌اکسیدانی از طریق خاصیت خنثی‌کنندگی رادیکال آزاد DPPH (۱و۱-دی فنیل ۲-پیکریل هیدرازیل)[1] تعیین شد. ابتدا عصاره‌های متانولی با استفاده از متانول خالص در دمای اتاق تهیه شد و فعالیت آنتی‌اکسیدانی با ایجاد کمی تغییرات از طریق غیرفعال‌کردن رادیکال‌های آزادشده توسط DPPH صورت پذیرفت. جذب محلول‌های حاصل و شاهد در طول موج ۵۱۷ نانومتر توسط اسپکتروفتومتر قرائت شد. درصد بازدارندگی از DPPH با مقایسه نمونه‌های عصاره و نمونه شاهد و استفاده از رابطه (۴) به‌دست آمد (Moon & Terao, 1998).

رابطه ۴) $\%AA: 1-A_{517}\ (sample)/A_{517}\ (control) \times 100$

برای اندازه‌گیری میزان پراکسیدهیدروژن (H_2O_2)، مقدار یک گرم بافت تر در حمام یخ با پنج میلی‌لیتر TCA ۰/۱ درصد هموژنیزه شد و بعد برحسب گرم در ۱۲۰۰۰ rpm به‌مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شد. ۰/۵ میلی‌لیتر از محلول شناور رویی به نیم میلی‌لیتر بافر فسفات‌پتاسیم ۱۰ mM با pH=۷ و ۱ میلی‌لیتر یدیدپتاسیم اضافه شد و بعد جذب آن در ۳۹۰ نانومتر قرائت شد. منحنی استاندارد با استفاده از پراکسیدهیدروژن رسم شد. در نهایت محتوای پراکسیدهیدروژن نمونه‌ها با ضریب خاموشی $mM^{-1}cm^{-1}$ ۰/۲۸ براساس میکرومول پراکسیدهیدروژن به‌ازای گرم وزن تر محاسبه شد (Velikova *et al.*, 2000).

از روش رنگ‌سنجی کلرید آلومینیوم برای تعیین مقدار فلاونوئیدها استفاده شد (Chang *et al.*, 2002). هر کدام از عصاره‌های متانولی گیاهی به‌صورت جداگانه با ۱/۵ میلی‌لیتر متانول، ۰/۱ میلی‌لیتر کلرید آلومینیوم (۱۰ درصد متانولی)، ۰/۱ میلی‌لیتر استات‌پتاسیم (۱ مولار) و ۲/۸ میلی‌لیتر آب مقطر ترکیب شدند. سپس محلول‌ها در دمای اتاق به‌مدت ۳۰ دقیقه قرار داده شدند. جذب هر ترکیب واکنشی در ۴۱۵ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شد. منحنی استاندارد با محلول‌های کوئرستین متانولی در غلظت‌های $\mu g.\ ml^{-1}$ ۲۵۰-۱۰۰۰ تهیه شد و منحنی با نرم‌افزار اکسل (نسخه ۲۰۰۷) رسم شد. سپس معادله خط y=bx+a به‌دست آمد. جذب‌های خوانده‌شده از نمونه‌ها به جای y قرار داده شد و x یا همان غلظت به‌دست آمد. جهت تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار آماری SAS (نسخه ۹/۲) و مقایسه میانگین‌ها براساس آزمون چنددامنه‌ای دانکن در سطح احتمال پنج درصد انجام شد.

1. 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl

۳. نتایج و بحث

طبق جدول تجزیه واریانس اثر متقابل تنش شوری و کاربرد هیومیک‌اسید بر درصد جوانه‌زنی، سرعت جوانه‌زنی، طول ریشه، وزن تر ساقه، وزن تر ریشه، وزن خشک ساقه و فلاونوئید کل در سطح پنج درصد و برای طول گیاه، وزن خشک ریشه، کلروفیل کل، فنل کل، آنتی‌اکسیدان کل و میزان پراکسیدهیدروژن در سطح یک درصد معنی‌دار شد (جدول ۱).

جدول ۱. تجزیه واریانس (میانگین مربعات) تأثیر هیومیک‌اسید و شوری بر ویژگی‌های رشدی و جوانه‌زنی گل‌راعی

منابع تغییرات	درجه آزادی	درصد جوانه‌زنی	سرعت جوانه‌زنی	طول ریشه	ارتفاع گیاه	وزن تر اندام هوایی	وزن تر ریشه	وزن خشک اندام هوایی	وزن خشک ریشه
شوری	۲	۸۸۱/۴۸**	۹۴/۵۶**	۴۸۴/۵۱**	۷۴۷/۸۲**	۰/۱۵**	۰/۰۵**	۰/۰۰۲**	۰/۰۱**
هیومیک‌اسید	۳	۸۱۹/۰۱**	۵۴۷/۰۹**	۸۹/۳۶**	۳۳۴/۲۳**	۰/۰۷**	۰/۰۲۲**	۰/۰۰۱**	۰/۰۰۴**
شوری× هیومیک‌اسید	۶	۱۱۲/۱۸*	۷/۸۹*	۱۳/۵۶*	۳۲/۱۱**	۰/۰۱*	۰/۰۰۳*	۰/۰۰۰۱*	۰/۰۰۰۴**
خطا	۲۴	۴۲/۴۶	۲/۹۴	۵/۰۶	۷/۴۱	۰/۰۰۲	۰/۰۰۰۶	۰/۰۰۰۰۱	۰/۰۰۰۰۸
ضریب تغییرات (%)	–	۹/۱۸	۶/۴۳	۹/۲۴	۷/۳۵	۸/۳۵	۸/۰۸	۶/۸۰	۸/۹۷

، * و ns: اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۱ و ۵ درصد و بدون اختلاف معنی‌دار.

ادامه جدول ۱. تجزیه واریانس (میانگین مربعات) تأثیر هیومیک‌اسید و شوری بر خصوصیات فیزیولوژیک گل‌راعی

منابع تغییرات	درجه آزادی	کلروفیل کل	فنل کل	آنتی‌اکسیدان کل	پراکسیدهیدروژن	فلاونوئید
شوری	۲	۰/۳۲**	۲۳/۳۷**	۴۳۰/۶۶**	۱۴/۶۷**	۰/۲۳**
هیومیک‌اسید	۳	۰/۴۰**	۸/۴۹**	۷۴۲/۳۱**	۳۳/۶۸**	۰/۹۰**
شوری× هیومیک‌اسید	۶	۰/۰۸**	۴/۰۶**	۱۵۷/۷۲**	۳/۱۴**	۰/۰۸*
خطا	۲۴	۰/۰۲	۱/۰۷	۲۶/۷۳	۰/۶۳	۰/۰۲
ضریب تغییرات (%)	–	۷/۲۴	۹/۴۰	۶/۴۸	۷/۰۶	۸/۶۰

، * و ns: اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۱ و ۵ درصد و بدون اختلاف معنی‌دار.

۱. ۳. درصد جوانه‌زنی بذرها

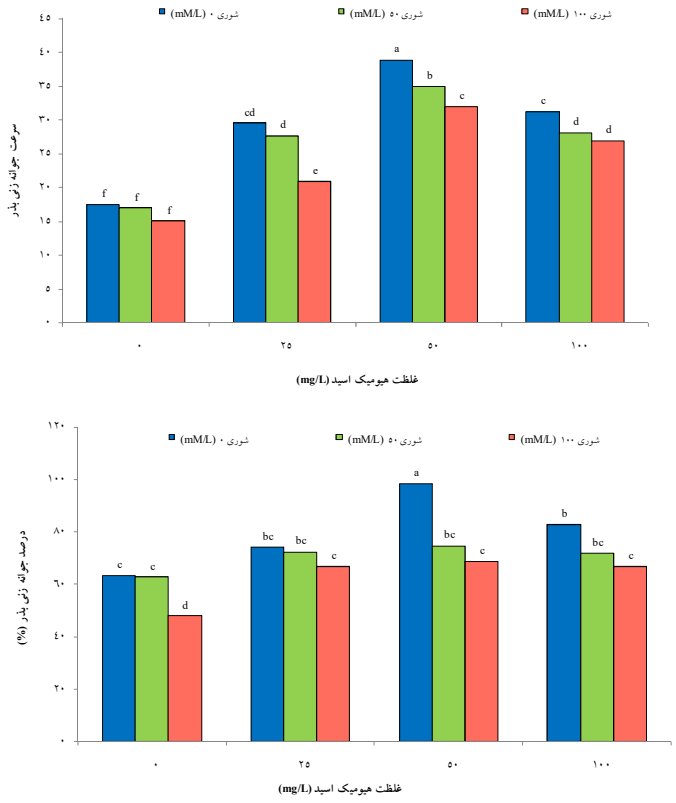
نتایج اثر متقابل تیمار هیومیک‌اسید و شوری بر درصد جوانه‌زنی بذرها نشان داد، با افزایش میزان شوری در همه غلظت‌های هیومیک‌اسید میزان جوانه‌زنی بذرها کاهش یافت. با کاربرد هیومیک‌اسید در غلظت ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر درصد جوانه‌زنی در تیمار شاهد شوری به‌طور معنی‌داری افزایش یافت. بیش‌ترین درصد جوانه‌زنی در تیمار بدون شوری و با کاربرد ۵۰ میلی‌گرم در لیتر هیومیک‌اسید مشاهده شد (شکل ۱).

۲. ۳. سرعت جوانه‌زنی

نتایج اثر متقابل تیمار هیومیک‌اسید و شوری بر سرعت جوانه‌زنی بذرها نشان داد، در همه تیمارهای هیومیک‌اسید در غلظت‌های مختلف، میزان سرعت جوانه‌زنی بذرها نسبت به تیمار شاهد افزایش معنی‌داری داشت. بیش‌ترین سرعت جوانه‌زنی بذرها در کاربرد ۵۰ میلی‌گرم در لیتر هیومیک‌اسید با تیمار بدون شوری به‌دست آمد (شکل ۱).

۳. ۳. طول ریشه

بررسی مقایسه میانگین‌ها نشان داد که در بین تیمارهای مذکور بیش‌ترین میزان طول ریشه از اثر متقابل کاربرد تیمار ۵۰ میلی‌گرم در لیتر هیومیک‌اسید با تیمار بدون شوری و کم‌ترین آن در تیمار عدم کاربرد هیومیک‌اسید با شوری ۱۰۰ میلی‌مولار بر لیتر به‌دست آمد (شکل ۲).



شکل ۱. مقایسه میانگین اثر متقابل سطوح مختلف هیومیک‌اسید و تنش شوری بر درصد جوانه‌زنی و سرعت جوانه‌زنی بذر گل‌راعی

۳. ۴. ارتفاع گیاه

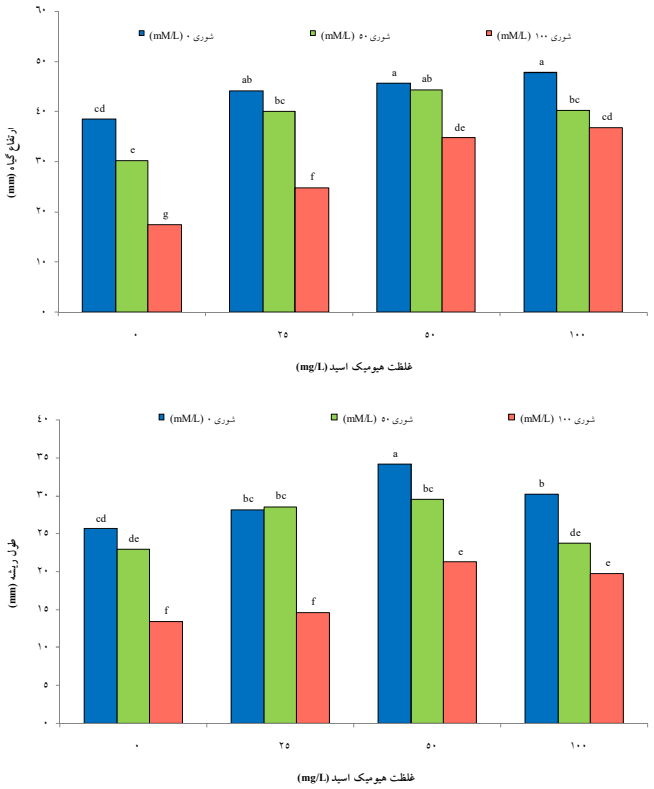
براساس مقایسه میانگین‌ها کم‌ترین ارتفاع گیاه از اثر متقابل تیمار بدون کاربرد هیومیک‌اسید و تیمار شوری ۱۰۰ میلی‌مولار بر لیتر به‌دست آمد. کاربرد هیومیک‌اسید در غلظت‌های مختلف باعث بهبود رشد و ارتفاع گیاه در شرایط تیمار شوری شد (شکل ۲).

۳. ۵. وزن تر اندام هوایی

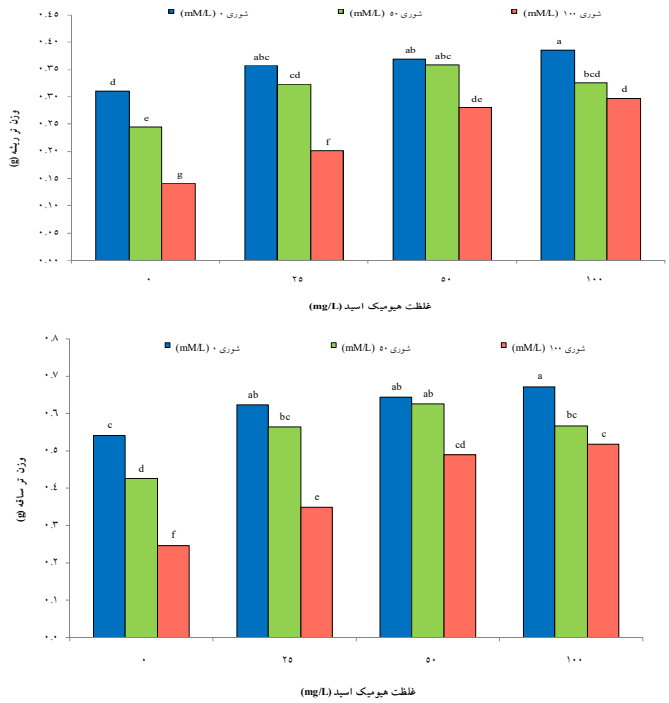
نتایج اثر متقابل تیمار هیومیک‌اسید و شوری بر وزن تر اندام هوایی نشان داد، در هر غلظت هیومیک‌اسید، با بالارفتن میزان شوری، میزان وزن تر اندام هوایی به‌طور مداوم کاهش یافت. بیش‌ترین میزان وزن تر اندام هوایی مربوط به گیاهان تیمار بدون شوری بود (شکل ۳).

۳. ۶. وزن تر ریشه

با افزایش تنش شوری از صفر به ۱۰۰ میلی‌مولار بر لیتر وزن تر ریشه به‌شدت کاهش یافت و کاربرد هیومیک‌اسید در هر دو سطح ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر سبب بهبود قابل‌توجه این صفت شد. به‌طوری‌که عدم کاربرد هیومیک‌اسید در تنش ۱۰۰ میلی‌مولار بر لیتر کم‌ترین میزان وزن تر ریشه را نسبت به بقیه تیمارها داشت. بیش‌ترین میزان از این صفت در تیمار ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر هیومیک‌اسید در تیمار شوری شاهد مشاهده شد (شکل ۳).



شکل ۲. مقایسه میانگین اثر متقابل سطوح مختلف هیومیک‌اسید و تنش شوری بر طول ریشه و ارتفاع گیاه گل‌راعی



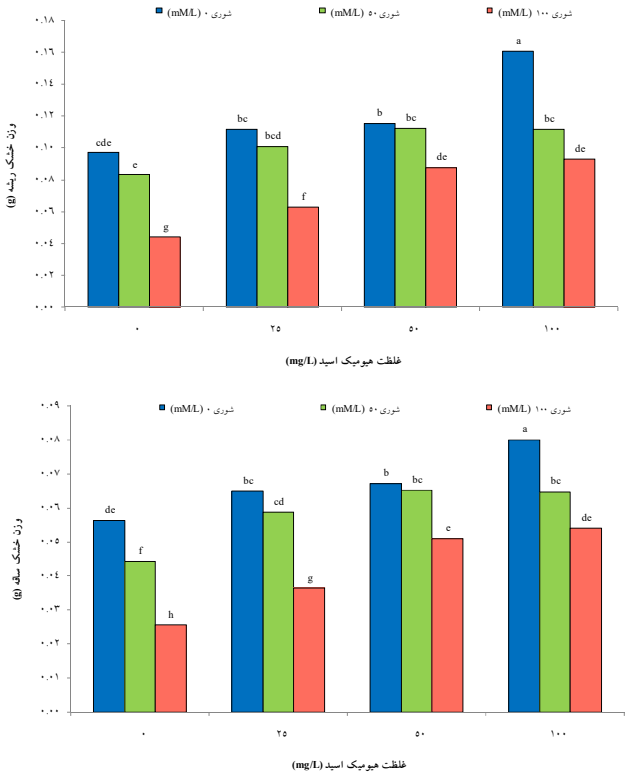
شکل ۳. مقایسه میانگین اثر متقابل سطوح مختلف هیومیک‌اسید و تنش شوری بر وزن تر اندام هوایی و وزن تر ریشه گل‌راعی

۳. ۷. وزن خشک اندام هوایی

بیش‌ترین میزان وزن خشک اندام هوایی از تیمار ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر هیومیک‌اسید و تنش شوری شاهد به‌دست آمد (شکل ۴).

۳. ۸. وزن خشک ریشه

وزن خشک ریشه با افزایش شوری کاهش معنی‌داری نشان داد به‌طوری‌که بیش‌ترین میزان از این صفت مربوط به شرایط عدم شوری و کاربرد ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر هیومیک‌اسید بود. در سطوح ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌مولار شوری کاربرد ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر هیومیک‌اسید باعث بهبود این صفت شد (شکل ۴).



شکل ٤. مقایسه میانگین اثر متقابل سطوح مختلف هیومیک‌اسید و تنش شوری بر وزن خشک اندام هوایی و ریشه گل‌راعی

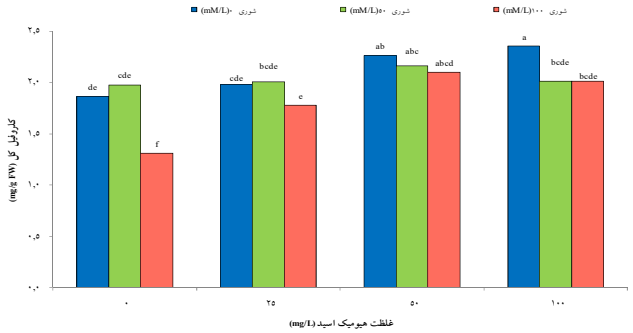
سرعت جوانه‌زنی یکی از مهم‌ترین شاخص‌های ارزیابی ارقام در تحمل به تنش است. به‌طوری‌که ارقام با سرعت جوانه‌زنی بالا در شرایط تنش امکان سبزشدن سریع‌تری نسبت به سایر ارقام دارند (Hsuan *et al.*, 2019). در پژوهش حاضر با افزایش شوری سرعت جوانه‌زنی کاهش یافت، اما کاربرد هیومیک‌اسید باعث افزایش سرعت جوانه‌زنی شد. در پژوهشی مشخص شد اگر جذب آب توسط بذر دچار اختلال شود، فعالیت‌های متابولیکی جوانه‌زنی در داخل بذر به‌آرامی صورت خواهد گرفت در نتیجه زمان خروج ریشه‌چه از بذر افزایش و از این‌رو سرعت جوانه‌زنی کاهش پیدا می‌کند (Obroucheva *et al.*, 2017). کاربرد هیومیک‌اسید باعث افزایش سرعت جوانه‌زنی شد که با نتایج پژوهش‌گران دیگر مطابقت دارد (Paksoy *et al.*, 2010). تنش شوری باعث کاهش چشم‌گیری در درصد جوانه‌زنی بذرهای تنش‌دیده‌ای

شد که به‌وسیله هیومیک‌اسید تیمار نشده بودند. در واقع، شوری باعث می‌شود که بذر نتواند آب موردنیاز خود را به اندازه کافی جذب کند و با ایجاد تنش خشکی فیزیولوژیک میزان جوانه‌زنی بذر و سرعت آن کاهش می‌یابد. در تنش شوری به‌علت کاهش پتانسیل آب محیط اطراف بذر، مدت زمان بیش‌تری طول می‌کشد تا بذر بتواند آب موردنیاز خود را به اندازه کافی به‌دست آورد، بنابراین زمان جوانه‌زنی را طولانی می‌سازد (Debez *et al.*, 2004).

کاربرد هیومیک‌اسید توانست وزن تر و خشک ریشه را افزایش دهد. هیومیک‌اسید با افزایش رشد، افزایش متابولیسم، افزایش جذب عناصر موجب افزایش تولید ریشه می‌شود که در نتیجه آن افزایش مقاومت به تنش شوری نیز می‌باشد. افزایش وزن تر و خشک ریشه توسط هیومیک‌اسید را می‌توان یک شاخص مطلوب در استفاده از منابع محدود محیطی در شرایط تنش توسط گیاه قلمداد کرد و به‌طور کلی می‌توان چنین استنباط کرد که با افزایش غلظت هیومیک‌اسید زیست‌توده ریشه افزایش معنی‌داری می‌یابد. طبق پژوهش‌های صورت‌گرفته هیومیک‌اسید می‌تواند تأثیر مثبتی بر فیزیولوژی گیاه داشته باشد و باعث توسعه ریشه و ریشه‌های جانبی شوند (Jindo *et al.*, 2012). مصرف هیومیک‌اسید موجب افزایش طول گیاه، وزن تر و خشک گل‌راعی بومی ایران شد. به‌طوری‌که در مقایسه با تیمار شوری صفات مذکور وضعیت بهتری داشتند. پژوهش‌گران دیگری هم نشان دادند با افزایش میزان شوری در گیاه گل‌راعی وزن خشک بخش هوایی و ریشه نسبت به شاهد کاهش یافت، اما کاربرد آسکوربیک‌اسید توانست وزن خشک اندام هوایی و ریشه را افزایش دهد که با نتایج پژوهش حاضر مشابهت دارد (Alinian Joozdani *et al.*, 2021). اثر تسریع‌کنندگی مواد هیومیک‌اسید روی رشد ساقه در درجه اول به‌خاطر تأثیر فعالیت H^+-ATPase ریشه و توزیع نیترات ریشه و ساقه بوده که به نوبه خود منجر به تغییرات در توزیع مشخص سیتوکنین‌ها، پلی‌آمین‌ها و ABA می‌شود (Rubio *et al.*, 2009). به‌طورکلی، کاهش وزن در اثر تنش شوری به‌دلیل کاهش جذب آب و بازدارندگی مواد فتوسنتزی و سنتز کربوهیدرات‌هاست. کاهش رشد عمده‌ترین اثر شوری بر گیاه است. وزن تر و خشک از شاخص‌هایی هستند که به‌منظور بررسی رشد گیاه استفاده می‌شوند. هم‌چنین تیمار هیومیک‌اسید هم‌زمان با شوری موجب افزایش صفات رشدی گیاه بادرشبو شد که با نتایج پژوهش حاضر در گل‌راعی مشابهت دارد (Narimani *et al.*, 2019).

۳. ۹. کلروفیل کل

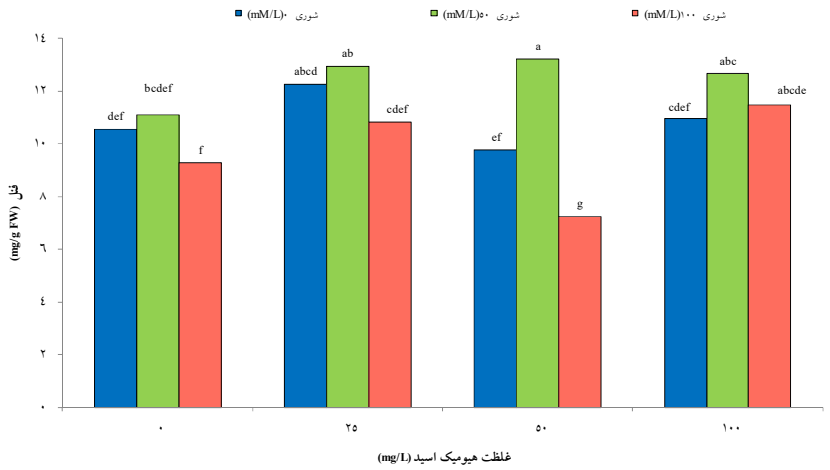
نتایج نشان داد که بیش‌ترین کلروفیل کل در غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر هیومیک‌اسید بود و با افزایش میزان شوری میزان کلروفیل کل کاهش یافت و در غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر هیومیک‌اسید و تیمار شوری ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌مولار میزان کلروفیل کل افزایش یافت. به‌عبارت دیگر، میزان کلروفیل کل با افزایش غلظت هیومیک‌اسید نسبت به شاهد روند افزایشی و معنی‌دار نشان می‌دهد (شکل ۵).



شکل ۵. مقایسه میانگین اثر متقابل سطوح مختلف هیومیک‌اسید و تنش شوری بر کلروفیل کل برگ گل‌راعی

۳. ۱۰. فنل کل

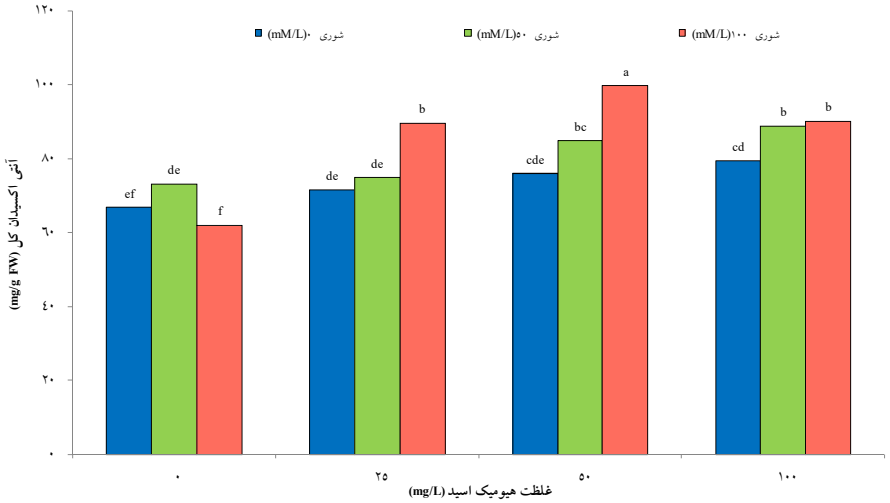
نتایج مقایسه میانگین داده‌ها در اثر متقابل هیومیک‌اسید و شوری نشان داد که بیش‌ترین میزان فنل در تیمار هیومیک‌اسید ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر و شوری ۵۰ میلی‌مولار مشاهده شد که تفاوت معنی‌داری با تیمار هیومیک‌اسید در غلظت‌های ۲۵ و ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر و همین غلظت تیمار شوری نداشت (شکل ۶).



شکل ٦. مقایسه میانگین اثر متقابل سطوح مختلف هیومیک‌اسید و تنش شوری بر فنل کل برگ گل‌راعی

۳. ۱۱. آنتی‌اکسیدان کل

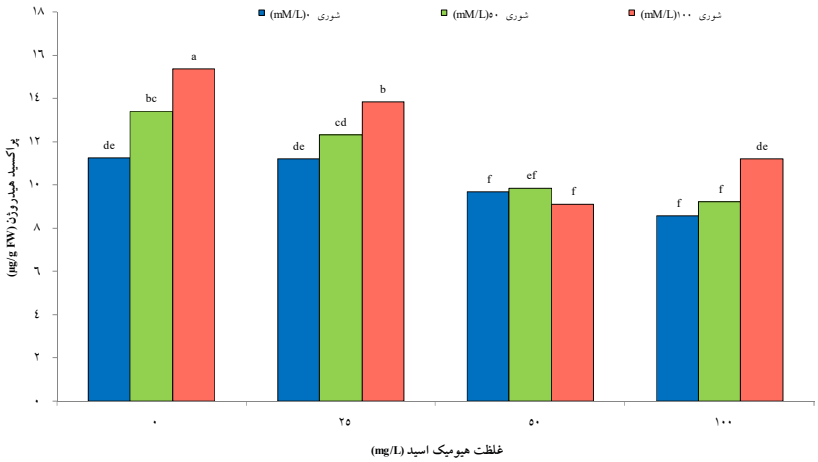
نتایج نشان داد که با افزایش غلظت هیومیک‌اسید در محیط کشت افزایش فعالیت ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل در تیمارهای شاهد بدون شوری مشاهده شد، اما در شرایط تنش شوری این واکنش متفاوت بود به‌طوری‌که بیش‌ترین میزان ظرفیت آنتی‌اکسیدانی در غلظت ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر هیومیک‌اسید و شوری ۱۰۰ میلی‌مولار مشاهده شد (شکل ۷).



شکل ۷. مقایسه میانگین اثر متقابل سطوح مختلف هیومیک‌اسید و تنش شوری بر آنتی‌اکسیدان کل گل‌راعی

۳. ۱۲. پراکسیدهیدروژن

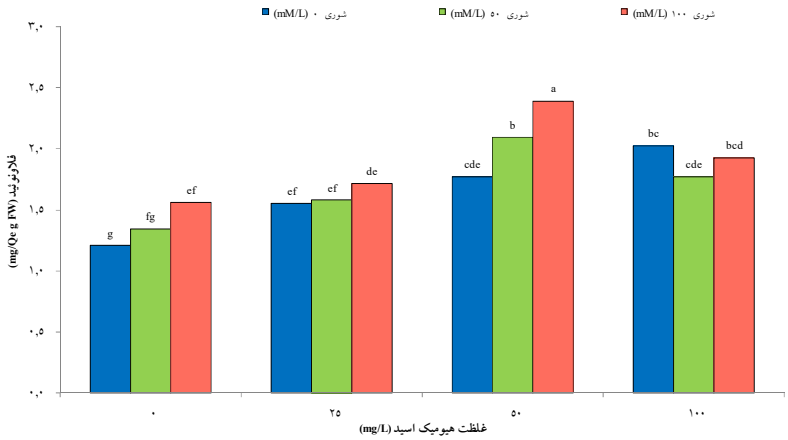
بررسی اثر متقابل هیومیک‌اسید و شوری نشان داد که بیش‌ترین میزان پراکسیده‌شدن هیدروژن در تیمار هیومیک‌اسید شاهد و شوری ۱۰۰ میلی‌مولار به‌دست آمد. با افزایش غلظت هیومیک‌اسید از صفر به ۱۰۰ در تیمارهای شوری شاهد و ۵۰ میلی‌مولار میزان پراکسیده‌شدن هیدروژن روند کاهشی داشت و در غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر و شوری ۱۰۰ میلی‌مولار یک افزایش در پراکسیده‌شدن هیدروژن مشاهده شد که تفاوت معنی‌داری نیز با دیگر تیمارهای شوری در همان غلظت هیومیک‌اسید داشت (شکل ۸).



شکل ۸. مقایسه میانگین اثر متقابل سطوح مختلف هیومیک‌اسید و تنش شوری بر پراکسیدهیدروژن گل‌راعی

۳. ۱۳. فلاونوئید کل

با توجه به مقایسه میانگین اثر متقابل تیمارها، با افزایش غلظت هیومیک‌اسید تا ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر و افزایش سطوح شوری میزان فلاونوئید کل نسبت به تیمار شاهد به‌صورت معنی‌داری افزایش یافت. بیش‌ترین میزان فلاونوئید کل در تیمار هیومیک‌اسید با غلظت ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر و شوری ۱۰۰ میلی‌مولار مشاهده شد (شکل ۹).



شکل ۹. مقایسه میانگین اثر متقابل سطوح مختلف هیومیک‌اسید و تنش شوری بر فلاونوئید گل‌راعی

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که سطوح هیومیک‌اسید اعمال‌شده از لحاظ میزان رنگیزه‌های کلروفیلی تفاوت معنی‌داری با تیمار شوری و شاهد نشان دادند. مهم‌ترین آثار بیولوژیک هیومیک‌اسید بر موجودات زنده شامل تحریک جوانه‌زنی بذر و رشد، تحریک تجمع زیست‌توده در گیاهان (Ouni *et al.*, 2014)، تحریک تجمع نیتروژن و تحریک جذب عناصر غذایی معدنی می‌باشد (Pettit, 2004). در بین عناصر غذایی، نیتروژن سهم مهمی در افزایش سبزینه گیاه دارد. با فعال شدن فرایندهای فیزیولوژیکی، کلروفیل‌سازی افزایش یافته که در پی آن منجر به بهبود فرایند فتوسنتز در شرایط تنش شوری نیز می‌شود. به‌نظر می‌رسد در شرایط تنش کاهش میزان فتوسنتز خالص در درجه اول، به‌علت بسته‌شدن روزنه‌ها باشد، اما در شرایط محدودبودن شدید آب، اثر روزنه‌ای ممکن است با افزایش مقاومت مزوفیلی و تأثیر سوء تنش بر غشای تیلاکوئیدها تشدید شود. هیومیک‌اسید با قدرت کلات‌کنندگی عناصر غذایی و با کاهش تبخیر، تعرق و در نتیجه، قراردادن آب و مواد غذایی بیش‌تر و مناسب‌تر در اختیار گیاه می‌تواند ساخت رنگیزه‌ها را افزایش دهد و انتقال مواد فتوسنتزی را در گیاه آسان‌تر کند (Karakurt *et al.*, 2009). پژوهش‌گران نشان دادند محتوای کلروفیل در گیاهچه‌های آویشن با افزایش غلظت نمک کاهش معنی‌دار یافت و در غلظت بالاتر از ۱۲۰ میلی‌مولار برگ‌ها دچار نکروز شدند (Razavizadeh & Mohagheghiyan, 2015). هم‌چنین در گیاه دارویی کرچک کاربرد هیومیک‌اسید توانست محتوای کلروفیل را به‌طور معنی‌داری افزایش دهد (Moradi *et al.*, 2014) که با نتایج پژوهش حاضر مطابقت دارد.

ترکیبات فنلی آنتی‌اکسیدان‌های نیرومندی در بافت‌های گیاهی در تنش هستند و این ویژگی به‌علت ساختار اسکلتی و گروه فنلی این متابولیت‌هاست. گروه‌های هیدروکسیل آزاد متصل به حلقه آروماتیک توان جاروب‌کردن رادیکال‌های آزاد را داشته و به همین خاطر خسارت‌های اکسیداتیو را کاهش داده، ساختارهای سلولی را از اثرات منفی شوری محافظت می‌کنند (Al-Amier & Craker, 2007). بیش‌ترین میزان از این شاخص در تیمار ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر هیومیک‌اسید و شوری ۵۰ میلی‌مولار مشاهده شد. گزارش شده است که هیومیک‌اسید تراوایی غشای گیاهان را افزایش داده، بنابراین جذب مواد غذایی را تقویت می‌کند. هیومیک‌اسیدی که در مراحل اولیه نمو وارد گیاه شده یک منبع مکمل از پلی‌فنل بوده و به‌عنوان کاتالیزور تنفسی عمل می‌کند. تولید ترکیب‌های فنلی که از ترکیب‌های آنتی‌اکسیدانی نیرومندی در بافت‌های گیاهی است در اثر تنش خشکی و کاربرد هیومیک‌اسید در گیاه نعناع نیز گزارش شده است که با نتایج پژوهش حاضر مطابقت دارد (Qader *et al.*, 2019).

رادیکال دی‌فنیل پیکریل هیدرازیل (DPPH) یک رادیکال آزاد است که به‌طور وسیع برای آزمایش پاک‌کردن رادیکال-های آزاد مورداستفاده قرار می‌گیرد. طبق نتایج آزمایش فعالیت آنتی‌اکسیدانی تحت تأثیر تنش شوری ۱۰۰ میلی‌مولار و ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر هیومیک‌اسید بیش‌ترین فعالیت را داشت و این افزایش میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی توسط هیومیک‌اسید در تنش ۱۰۰ میلی‌مولار احتمالاً به‌دلیل افزایش مقاومت گیاه می‌باشد. افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان یکی از سازوکارهای مقاومت گیاهان در برابر تنش‌ها می‌باشد که هیومیک‌اسید با افزایش جذب عناصر پرمصرف مانند نیتروژن، پتاسیم و کلسیم سمیت گونه‌های فعال اکسیژن را از راه افزایش غلظت آنتی‌اکسیدان‌ها کاهش می‌دهند. آنتی‌اکسیدان‌ها گونه‌های فعال اکسیژن را بازیابی می‌کنند و واکنش‌های اکسیداسیون نوری را کاهش می‌دهند و در نتیجه موجب حفظ تکامل غشای کلروپلاست می‌شوند (Waraich *et al.*, 2011). هم‌چنین هیومیک‌اسید می‌تواند فعالیت آنزیم‌ها را با به تأخیرانداختن تجمع پراکسیدهیدروژن بهبود بخشد (Fan *et al.*, 2014). در پژوهش حاضر کم‌ترین میزان پراکسیده‌شدن هیدروژن در تیمارهای شوری و غلظت هیومیک‌اسید در ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر بود درحالی‌که در اکثر صفات این غلظت هیومیک‌اسید از همه بهتر بوده است. به‌نظر می‌رسد تیمارهای مصرف هیومیک‌اسید باعث کاهش مقدار تولید پراکسیدهیدروژن در گیاه شد و این تأثیر هم در شرایط تنش شوری و هم در شرایط بدون تنش شوری دیده شد، اما در شرایط تنش تأثیر آن‌ها محسوس‌تر بود. مصرف مقادیر

مناسب کود سبب تأمین مطلوب و کافی عناصر غذایی جهت تولید آنتی‌اکسیدان‌های آنزیمی و غیرآنزیمی شده است که به‌دنبال آن در نتیجه افزایش فعالیت این آنتی‌اکسیدان‌ها میزان H_2O_2 و سایر رادیکال‌های آزاد اکسیژن کاهش پیدا کرده و در نهایت باعث کاهش میزان پراکسیداسیون لیپیدی غشا نیز می‌شود. مطابق با پژوهش حاضر در پژوهشی با مطالعه اثر تنش شوری و هیومیک‌اسید بر گیاه فلفل گزارش شده است که هیومیک‌اسید در برگ و ریشه القا شده منجر به کاهش پراکسیداسیون هیدروژن و حفظ نفوذپذیری غشا شده است (Akladious & Mohamed, 2018). کاهش میزان فلاونوئید کل در غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر نشان داد افزایش کاربرد در این غلظت در تیمارهای مختلف شوری اثر افزایشی بر میزان فلاونوئید نداشت و همانند غلظت پایین از این تیمار واکنش نشان داد. اما مطالعات مختلفی در زمینه تغییر در تجمع ترکیب‌های فلاونوئیدی که گروهی از مهم‌ترین متابولیت‌های ثانویه گیاهی هستند در گیاهان مختلفی که در تأثیر تنش‌های مختلف قرار داده شده‌اند، گزارش شده است (Fritz *et al.*, 2006). ازآنجاکه شدت آسیب‌های واردشده به گیاهان در اثر شوری و تنش‌های اکسیداتیو به‌عنوان تنش ثانویه و همراه با شوری، در میان گونه‌های مختلف گیاهی، اندام‌های گیاهی یا در مراحل مختلف رشد متفاوت است، عملکرد گونه‌های مختلف گیاهی در میزان سنتز و تجمع ترکیب‌های آلی و تغییر در ظرفیت و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در پاسخ به شوری می‌تواند متفاوت باشد (Ábrahám, 2011). هم‌چنین از هیومیک‌اسید به‌عنوان یک کود طبیعی بدون اثرات مخرب زیست‌محیطی می‌توان در جهت بالابردن عملکرد و محتوای فلاونوئیدی که گروه مهمی از متابولیت‌های ثانویه گیاهی هستند در گیاه مرزه در شرایط متغیر محیطی استفاده کرد که با نتایج پژوهش حاضر مطابقت دارد (Zaremanesh *et al.*, 2021).

۴. نتیجه‌گیری

نتایج این پژوهش دلالت بر آن دارد که تنش شوری موجب القای اثرات منفی بر شاخص‌های جوانه‌زنی، ویژگی‌های رشدی، میزان کلروفیل و فنل و هم‌چنین افزایش میزان آنتی‌اکسیدان و پراکسیدهیدروژن در گیاه گل‌راعی بومی ایران شد. کاربرد هیومیک‌اسید با القای تغییرات فیزیولوژیکی و تأثیرگذاری بر جذب و انتقال عناصر غذایی گیاه باعث کاهش اثرات منفی تنش شوری شد. هیومیک‌اسید سبب ایجاد تغییرات بیوشیمیایی، موفولوژیکی و فیزیولوژیکی در گل‌راعی بومی ایران شد و با فعال‌کردن سیستم آنتی‌اکسیدانی و نیز افزایش تجمع فلاونوئید و فنل کل باعث بهبود ویژگی‌های رشدی و کیفی گیاه شد. در بین غلظت‌های مختلف هیومیک‌اسید نیز غلظت ۵۰ میلی‌گرم در لیتر بیش‌ترین تأثیر را در بهبود اکثر شاخص‌های اندازه-گیری‌شده در تنش شوری نسبت به سایر غلظت‌ها داشت. از آنجاییکه شوری یکی از مشکلات روزافزون در جهان و سطوح وسیعی از ایران است، مطالعه و توسعه روش‌های افزایش مقاومت فیزیولوژیکی گیاه در برابر تنش‌ها امری ضروری است. تولیدکنندگان با کاربرد کود آلی هیومیک‌اسید به جای کودهای شیمیایی علاوه بر کمک در کاهش هزینه‌های تولید می‌تواند در راستای کشاورزی پایدار تأثیر بسزایی در کاهش آلودگی‌های زیست‌محیطی داشته باشد.

۵. تشکر و قدردانی

از دانشگاه سیدجمال الدین اسدآبادی و هم‌چنین از تمام افرادی که در اجرای این پژوهش همکاری داشته‌اند، تشکر و قدردانی می‌گردد.

۶. تعارض منافع

هیچ‌گونه تعارض منافع توسط نویسندگان وجود ندارد.

۷. منابع مورداستفاده

Ábrahám, E. (2011). Identification of arabidopsis and thellungiella genes involved in salt tolerance by novel genetic system. *Acta Biologica Szegediensis*, *55*(1), 53-57.

Akladious, S. A., & Mohamed, H. I. (2018). Ameliorative effects of calcium nitrate and humic acid on the growth, yield component and biochemical attribute of pepper (*Capsicum annuum*) plants grown under salt stress. *Scientia Horticulturae*, *236*, 244-250.

Al-Amier, H., & Craker, L. E. (2007). In vitro selection for stress tolerant spearmint. *Issues in New Crops and New Uses*, 306-310.

Albayrak, S., & Camas, N. (2005). Effects of different levels and application times of humic acid on root and leaf yield and yield components of forage turnip (*Brassica rapa* L.). *Journal of Agronomy*, *4*(2), 130-133.

Alinian Joozdani, S., Rafieiolhossaini, M., Razmjoo, J., & Bahreininejad, B. (2021). Physiological mechanism involved in st. John's wort (*Hypericum perferatum* L.) response to salinity and effect of ascorbic acid foliar application. *Environmental Stresses in Crop Sciences*, *14*(2), 529-543.

Behboudian, B., Lahouti, M., & Nezami, A. (2006). Effects of salt stress on germination of chickpeas cultivars. *Seed Reseach Gorgania, 9*(3), 254-269.

Bilia, A. R., Gallori, S., & Vincieri, F. F. (2002). St. John's wort and depression: Efficacy, safety and tolerability-an update. *Life Sciences*, *70*(26), 3077-3096.

Borromand, R. Z., & Koocheki, A. (2006). Germination response of ajowan, fennel and dill to osmotic potential of sodium chloride and polyethylene glycol 6000 in different temperature regimes. *Iranian Journal of Field Crops Research*, *3*(2), 207-217.

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 & Drug Analysis*, *10*(3), 213-218.

Crockett, S. L. (2010). Essential oil and volatile components of the genus *hypericum* (hypericaceae). *Natural Product Communications*, *5*(9), 1934578X1000500926.

Debez, A., Hamed, K. B., Grignon, C., & Abdelly, C. (2004). Salinity effects on germination, growth, and seed production of the halophyte *cakile maritima*. *Plant and Soil*, *262*(1-2), 179-189.

El-Nemr, M., El-Desuki, M., El-Bassiony, A., & Fawzy, Z. (2012). Response of growth and yield of cucumber plants (*Cucumis sativus* L.) to different foliar applications of humic acid and bio-stimulators. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*, *6*(3), 630-637.

Elmaghrabi, A. M., Rogers, H. J., Francis, D., & Ochatt, S. (2018). Toward unravelling the genetic determinism of the acquisition of salt and osmotic stress tolerance through in vitro selection in *medicago truncatula*. *Functional Genomics in Medicago Truncatula*, 291-314.

Eyheraguibel, B., Silvestre, J., & Morard, P. (2008). Effects of humic substances derived from organic waste enhancement on the growth and mineral nutrition of maize. *Bioresource Technology*, *99*(10), 4206-4212.

Fan, H. m., Wang, X. w., Sun, X., Li, Y. y., Sun, X. z., & Zheng, C. s. (2014). Effects of humic acid derived from sediments on growth, photosynthesis and chloroplast ultrastructure in chrysanthemum. *Scientia Horticulturae*, *177*. 118-123.

Fritz, C., Palacios-Rojas, N., Feil, R., & Stitt, M. (2006). Regulation of secondary metabolism by the carbon–nitrogen status in tobacco: Nitrate inhibits large sectors of phenylpropanoid metabolism. *The Plant Journal*, *46*(4), 533-548.

Galla, G ,.Basso, A., Grisan, S., Bellucci, M., Pupilli, F., & Barcaccia, G. (2019). Ovule gene expression analysis in sexual and aposporous apomictic *Hypericum perforatum* L. (hypericaceae) accessions. *Frontiers in Plant Science*, *10*, 654.

García-Caparrós, P., Hasanuzzaman, M., & Lao, M. T. (2019). Oxidative stress and antioxidant defense in plants under salinity. *Reactive Oxygen, Nitrogen and Sulfur Species in Plants*, 291-309.

Ghanbarpour, E., Rezaei, M., & Lawson, S. (2019). Reduction of cracking in pomegranate fruit after foliar application of humic acid, calcium-boron and kaolin during water stress. *Erwerbs-obstbau*, *61*(1), 29-37.

Hsuan, T.-P., Jhuang, P.-R., Wu, W.-C., & Lur, H.-S. (2019). Thermotolerance evaluation of taiwan japonica type rice cultivars at the seedling stage. *Botanical Studies*, *60*(1), 29.

Jindo, K., Martim, S. A., Navarro, E. C., Pérez-Alfocea, F., Hernandez, T., Garcia, C., Aguiar, N. O., & Canellas, L. P. (2012). Root growth promotion by humic acids from composted and non-composted urban organic wastes. *Plant and Soil*, *353*(1-2), 209-220.

Kaboli Farshchi, H., Azizi, M., Nemati, H., & Roshan-Sarvestani, V. (2016). Effect of potassium sulphate and humic acid on growth, yield and essential oil content in *Hypericum perforatum* L. *Journal of Horticultural Science*, *29*(4), 518-527.

Karakurt, Y., Unlu, H., Unlu, H., & Padem, H. (2009). The influence of foliar and soil fertilization of humic acid on yield and quality of pepper. *Acta Agriculturae Scandinavica Section B–Soil and Plant Science*, *59*(3), 233-237.

Karppinen, K., Taulavuori, E., & Hohtola, A. (2010). Optimization of protein extraction from *hypericum perforatum* tissues and immunoblotting detection of hyp-1 at different stages of leaf development. *Molecular Biotechnology*, *46*(3), 219-226.

Kaur, A., Ohri, P., & Kaur, A. (2018). Effect of vermicompost extracts on in-vitro germination and growth of *Withania somnifera* (L.) dunal. *International Journal of Herbal Medicine, 6*(2), 28-32.

Mereddy, R. (2015). Solid matrix priming improves seedling vigor of okra seeds. In: *Proceedings of the Oklahoma Academy of Science*. pp: 33-37.

Moon, J.-H., & Terao, J. (1998). Antioxidant activity of caffeic acid and dihydrocaffeic acid in lard and human low-density lipoprotein. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *46*(12), 5062-5065.

Moradi, R., Afshari, H., Masoud Sinaki, J., & Zadeh Bagheri, M. (2014). Investigation effect of cultivar, planting date and humic acid on protein content, oil seed and chlorophyll content in (*Ricinus communis* L.). *Journal of Plant Ecophysiology*, *6*(18), 80-90.

Munns, R., & Tester, M. (2008). Mechanisms of salinity tolerance. *Annu. Rev. Plant Biol.*, *59*, 651-681.

Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, *15*(3), 473-497.

Narimani, R., Moghaddam, M., Nemati, S., & Ghasemi, P. A. (2019). 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.*) 927-938.

Obroucheva, N., Sinkevich, I., Lityagina, S., & Novikova, G. (2017). Water relations in germinating seeds. *Russian Journal of Plant Physiology*, *64*(4), 625-633.

Ouni, Y., Ghnaya, T., Montemurro, F., Abdelly, C., & 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.

Paksoy, M., Türkmen, Ö., & Dursun, A. (2010). Effects of potassium and humic acid on emergence, growth and nutrient contents of okra (*Abelmoschus esculentus* L.) seedling under saline soil conditions. *African Journal of Biotechnology*, *9*(33).

Parida, A. K., & Das, A. B. (2005). Salt tolerance and salinity effects on plants: A review. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, *60*(3), 324-349.

Pettit, R. E. (2004). Organic matter, humus ,humate, humic acid, fulvic acid and humin: Their importance in soil fertility and plant health. *CTI Research*, 1-17.

Qader, R., Mohammad, M., Pouya, E., & Laden, A. (2019). Effect of humic acid foliar application on some morphophysiological and biochemical properties of green mint (*Mentha spicata* L.) under drought stress. *Environmental Stresses in Crop Sciences*, *12*(1), 95-110.

Razavizadeh, R., & Mohagheghiyan, N. (2015). An investigation of changes in antioxidant enzymes activities and secondary metabolites of thyme (*Thymus vulgaris*) seedlings under in vitro salt stress. *Iranian Journal of Plant Biology*, *7*(26), 41-58.

Rostami, G., Moghaddam, M., Saeedi Pooya, E., & Ajdanian, L. (2019). The effect of humic acid foliar application on some morphophysiological and biochemical characteristics of spearmint (*Mentha spicata* L.) in drought stress conditions. *Environmental Stresses in Crop Sciences*, *12*(1), 95-110.

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.

Sharma, A., Bhansali, S., & Kumar, A. (2013). In vitro callus induction and shoot regeneration in *Eclipta alba* (L.) hassk. *International Journal of Life Science and Pharma Research*, *3*(2), 43-46.

Singleton, V. L., & Rossi, J. A. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American journal of Enology and Viticulture*, *16*(3), 144-158.

Strain, H. H., & Svec, W. A. (1966). Extraction, separation, estimation and isolation of the chlorophylls. *The Chlorophylls*, *1*, 22-66.

Tina, A., Pezhman, M., & Abbas, H. (2015). Effect of organic fertilizer and foliar application of humic acid on some quantitative and qualitative yield of pot marigold. *Journal of Novel Applied Sciences*, *4*, 1100-1103.

Velikova, V., Yordanov, I., & Edreva, A. (2000). Oxidative stress and some antioxidant systems in acid rain-treated bean plants: Protective role of exogenous polyamines. *Plant Science*, *151*(1), 59-66.

Vishwanathan, A. (2018). Ethnobotany: A bridge between traditional knowledge and biotechnological studies on medicinal and aromatic plants. In: Biotechnological approaches for medicinal and aromatic plants. *Springer*: p. 383-394.

Waraich, E. A., Ahmad, R., & Ashraf, M. (2011). Role of mineral nutrition in alleviation of drought stress in plants. *Australian Journal of Crop Science*, *5*(6), 764.

Zaremanesh, H., Eisvand, H., Akbari, N., Ismaili, A., & Feizian, M. (2019). Effects of different humic acid and salinity levels on some traits of khuzestani savory (*Satureja khuzistanica* jamzad). *Applied Ecology and Environmental Research*, *17*(3), 5409-5433.

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

Zhao, H., Liang, H., Chu, Y., Sun, C., Wei, N., Yang, M., & Zheng, C. (2019). Effects of salt stress on chlorophyll fluorescence and the antioxidant system in *Ginkgo biloba* L. Seedlings. *HortScience*, *54*(12), 2125-2133.