اثر سطوح مختلف اسید هیومیک و تراکم کاشت بر فعالیت آنتی اکسیدانی وخواص بیوشیمیایی گیاه دارویی (*Trigonella foenum- graecum* L.)

محمدحسین امینی‌فرد[1*]، حمیرا قادری زه[2]

[1]استادیار، گروه علوم باغبانی و مرکز پژوهشی گیاهان ویژه منطقه دانشکده کشاورزی، دانشگاه بیرجند، بیرجند، ایران

[2]دانشجوی کارشناسی‌ارشد، گروه علوم باغبانی، گرایش فیزیولوژی گیاهان‌دارویی، ادویه‌ای و عطری، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بیرجند، بیرجند، ایران

تاریخ دریافت: ۹۷/۰٤/۲۳ تاریخ پذیرش: ۹۷/۰۷/۱۷

چکیده

شنبلیله (*Trigonella foenum- graecum* L.) یکی از گیاهان دارویی مهم محسوب می‌شود و استفاده از نهاده‌های آلی به‌عنوان یک عامل مهم برای دستیابی به حداکثر عملکرد این گیاه می‌باشد. به منظور بررسی اثر اسید هیومیک و تراکم کاشت بر فعالیت آنتی‌اکسیدانی و خصوصیات بیوشیمیایی(ترکیبات فنلی، فلاونوئیدی، آنتوسیانین، قند و رنگیزه‌های فتوسنتزی) شنبلیله، آزمایشی در سال زراعی ۱۳۹٦ به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی در مزرعه تحقیقاتی دانشگاه بیرجند اجرا شد. تیمارهای آزمایش شامل سه سطح اسید هیومیک (۰، ۵ و ۱۰ کیلوگرم در هکتار) و دو سطح تراکم کاشت (۲۵ و ۵۰ بوته در مترمربع) بودند. بعد از اعمال تیمارها و در مرحله گلدهی کامل و قبل از مرحله رسیدگی فیزیولوژیکی گیاه، نمونه‌هایی از برگهای گیاه شنبلیله تهیه و صفات بیوشیمیایی آن اندازه‌گیری شدند. نتایج آزمایش نشان داد که اسیدهیومیک بر اکثر صفات بیوشیمیایی شنبلیله (فعالیت آنتی‌اکسیدانی، میزان فنل کل، فلاونوئید کل و میزان کربوهیدرات) معنی‌دار شد، بطوریکه بیشترین فعالیت آنتی اکسیدانی (٦٤/٦ درصد) و میزان کربوهیدرات (٦/۷۳ میلی‌گرم برگرم) برگ گیاه از تیمار ۱۰ کیلوگرم بر هکتار اسیدهیومیک و کمترین فعالیت آنتی‌اکسیدانی (۵۰/۰ درصد) و میزان کربوهیدرات (۳/٤۵ میلی‌گرم برگرم) از تیمار شاهد حاصل گردید. همچنین کاربرد اسید هیومیک سبب افزایش معنی‌دار رنگیزه‌های فتوسنتزی (کلروفیل کل، a، b و کارتنوئید) شد، بطوریکه بیشترین میزان کلروفیل کل در تیمار ۱۰ کیلوگرم بر هکتار اسید هیومیک (با ٤/۵۱ میلی‌گرم بر گرم) و کمترین میزان آن (۳/۱۸ میلی‌گرم بر گرم) از تیمار شاهد بدست آمد. با توجه به نتایج، بیشترین میزان فلاونوئید با ٦/٤۳ میلی‌گرم بر گرم در تراکم ۲۵ بوته در مترمربع و کمترین میزان فلاونوئید با ۵/٤٦ میلی‌گرم بر گرم در تراکم کاشت ۵۰ بوته در مترمربع مشاهده گردید. اثر متقابل اسید هیومیک و تراکم کاشت هم بر میزان فنول و فلاونویید گیاه معنی‌دار شد، بطوری‌که بیشترین میزان فنول (٤۲/۰۷ میلی‌گرم بر گرم) در تیمار ۱۰ کیلوگرم بر هکتار اسید هیومیک با تراکم کاشت ۲۵ بوته در مترمربع و کمترین میزان فنول (٤۱/۸٦ میلی‌گرم بر گرم) در تیمار شاهد با تراکم کاشت ۲۵ بوته در مترمربع بدست آمد. بر اساس نتایج این آزمایش، استفاده از ۱۰ کیلوگرم در هکتار اسید هیومیک و تراکم کاشت ۲۵ بوته در مترمربع، نقش موثری در افزایش فعالیت آنتی اکسیدانی و صفات بیوشیمیایی (میزان فنل کل، فلاونوئید، آنتوسیانین، قند) شنبلیله داشت، هرچند تیمارهای آزمایش، نتوانست آنتوسیانین را تحت تاثیر خود قرار دهد.

واژه‌های کلیدی: آنتوسیانین، اسیدهیومیک ترکیبات فنلی، شنبلیله، کودآلی، متابولیت ثانویه.

*نویسنده مسئول: mh.aminifard@birjand.ac.ir

مقدمه

گرایش عمومی جوامع به طب سنتی و استفاده از داروهای گیاهی در طی سال‌های اخیر به علت بروز اثرات زیان‌بار داروهای شیمیایی بر سلامتی انسان و نارسایی‌های متعدد طب نوین در درمان برخی بیماری‌ها، رو به افزایش بوده است. شنبلیله (*Trigonella foenum- graecum* L.) گیاهی است علفی، یک ساله و از خانواده لگومینوز می‌باشد. شنبلیله در طب سنتی سابقه مصرف دیرینه داشته و خواص درمانی چشمگیری برای آن ذکر شده است، به‌طوری که اثرات ضددرد، ضدالتهاب، ضدسرطان، کاهش دهنده کلسترول و چربی خون، درمان کننده دیابت و سل از این گیاه گزارش شده است (Mandegari et al., 2012). یکی از مؤلفه‌های اساسی افزایش عملکرد محصولات کشاورزی، مصرف بیشتر نهاده‌ها به‌ویژه کودهای شیمیایی است اما افزایش مصرف کودهای شیمیایی در دهه‌های اخیر، مشکلات جدی زیست محیطی داشته است. از طرفی با توجه به احتمال بروز اثرات منفی ناشی از مصرف بی رویه سموم و کودهای شیمیایی روی کمیت و کیفیت ترکیبات مؤثره گیاهان دارویی، بسیاری از شرکت‌های دارویی، مواد خام حاصل از نظام‌های پایدار و ارگانیک را ترجیح م دهند (Gewaily et al., 2006). بنابراین مناسب است، که سایر منابع کودی دارای هزینه و اثرات تخریبی کمتر بر اکوسیستم، جایگزین این کودها شوند. از منابع کودی سالم، کم‌هزینه و در دسترس موجود می‌توان به کودهای غیرشیمیایی (آلی و بیولوژیک) اشاره کرد؛ که در سیستم‌های پایدار مورد توجه قرار گرفته‌اند (Nehvi et al., 2009). در بین کودهای سازگار با طبیعت، هیومیک اسید به‌عنوان یک اسید آلی بدون اثرات مخرب زیست محیطی، باعث بهبود ساختار فیزیکی، شیمیایی و بیولوژیکی خاک شده و به دلیل دارا بودن ترکیبات هورمونی، اثرات مثبت قابل ملاحظه‌ای بر شاخص‌های کمی و کیفی محصولات کشاورزی دارد (Sabzevari et al., 2010). اسید هیومیک یک ترکیب پلیمری آلی طبیعی است که در نتیجه پوسیدگی مواد آلی خاک، پیت و لیگنین به‌وجود می‌آید و باعث افزایش عملکرد و کیفیت محصول می‌شود (Ghorbani et al., 2010). اسید هیومیک سبب افزایش ماندگاری بافتهای فتوسنتزکننده شده و از طریق تأثیرات مثبت فیزیولوژیکی، از جمله اثر بر متابولیسم سلول‌های گیاهی، افزایش کلروفیل برگ را باعث می‌شود (Naderi et al., 2002). استرایی و لوانی (Astaraei, and Ivani, 2008) افزایش تولید کلروفیل در برگ‌های گیاه لوبیا در پی استفاده از اسید هیومیک، را بیان نموده است. از طرف دیگر، عوامل محیطی تأثیر به‌سزایی بر کمیت و کیفیت محصول بدست آمده از گیاهان دارویی دارد، با این حال کنترل کامل این عوامل امکان‌پذیر نیست، ولی می‌توان با استفاده از روش‌هایی، اثرات محیطی را به‌شکلی مدیریت کرد که گیاه تحت هر شرایطی، حداکثر توانایی خود را بروز دهد. از جمله مهمترین این تکنیک‌ها، انتخاب تراکم گیاهی مطلوب برای کشت و کار گیاه است که به‌عنوان یک عامل زراعی تحت کنترل، نقش مؤثری در عملکرد محصولات مختلف ایفاء می‌کند و مشخص کردن تراکم گیاهی از اصول اولیه زراعت هر محصول و ازجمله مهمترین عوامل تأثیرگذار بر تولید گیاهان دارویی به‌شمار می‌رود (Ibrahim, 2012). تراکم بوته مطلوب، تراکمی است که در نتیجه آن کلیه عوامل محیطی به‌طور مؤثر مورد استفاده گیاه قرار گرفته و در عین حال رقابت‌های درون بوته‌ای و بین بوته‌ای در حداقل باشند تا حداکثر عملکرد ممکن با کیفیت مطلوب بدست آید (Caliskan et al., 2009). طی آزمایشی در شنبلیله فاصله ردیف ۳۰ سانتی‌متر در مقایسه با ٤٥سانتی‌متر

سبب افزایش تعداد غلاف در بوته، تعداد دانه در غلاف و عملکرد دانه شد (Yadav et al., 2000). همچنین شارما و همکاران (Sharma et al., 2000) نشان دادند که کاهش فاصله ردیف از ٦٠ به ٣٠ سانتی‌متر سبب افزایش عملکرد دانه و وزن ١٠٠٠ دانه شنبلیله شد. با توجه به اهمیت گیاه دارویی مهم شنبلیله و اینکه تاکنون گزارشی در خصوص اثر متقابل اسید هیومیک در تراکم کاشت بر فعالیت آنتی اکسیدانی و خصوصیات بیوشیمایی شنبلیله نشده است، لذا هدف از اجرای این طرح، مشخص کردن نقش اسید هیومیک در تراکم‌های مختلف کشت، بر شاخص‌های فیتوشیمایی گیاه دارویی شنبلیله می‌باشد تا با استفاده مناسب از نهاده آلی و انتخاب تراکم کاشت مناسب، بتوان در جهت تولید پایدار و افزایش کیفیت شنبلیله گام برداشت.

مواد روش‌ها

این آزمایش در سال زراعی ١٣٩٦ در دانشکده کشاورزی دانشگاه بیرجند به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح پایه بلوک‌های کامل تصادفی اجرا گردید. تیمارهای آزمایش شامل: هیومیک اسید (٠، ٥، ١٠ کیلوگرم بر هکتار) و تراکم بوته (٢٥ و ٥٠ بوته درمترمربع) با سه تکرار بودند. قبل از کاشت، جهت تعیین خصوصیات خاک مزرعه، نمونه برداری خاک انجام گرفت (جدول ١). بافت خاک به روش هیدرومتری (Bouyoucos, 1962)، قابلیت هدایت الکتریکی و pH (Haluschak, 2006)، درصد ماده آلی به روش والکلی و بلک (Walkley and Black, 1934)، نیتروژن کل به روش کجلدال (Bremner, 1996)، فسفر قابل جذب گیاه به روش اولسن (Olsen, 1954) و پتاسیم به روش (استات آمونیوم نرمال) انجام شدند. به‌منظور انجام آزمایش، پس از عملیات شخم، دیسک و مسطح کردن خاک، اقدام به کرت بندی زمین نموده وکرت‌هایی به ابعاد ٢ × ٢ متر ایجاد گردید. کشت به صورت خطی در ٥ اردیبهشت سال ١٣٩٥ انجام گرفت. فاصله کاشت بین ردیف‌ها ٢٠ سانتی‌متر و فاصله روی ردیف‌ها ١٠ سانتی‌متر برای تراکم کاشت ٥٠ بوته در مترمربع و فاصله کاشت بین ردیف‌ها ٤٠ سانتی‌متر و فاصله روی ردیف‌ها ١٠ سانتی‌متر برای تراکم کاشت ٢٥ بوته در مترمربع در نظر گرفته شد، که بعد از تنک در مرحله ٤ تا ٦ برگی، فاصله روی ردیف‌ها اعمال گردید. آبیاری اول همزمان با کاشت (٥ اردیبهشت ١٣٩٥به‌صورت سطحی) و آبیاری دوم، ٥ روز بعد از آبیاری اول به منظور تسهیل در سبز شدن بذرها انجام شد. تیمار هیومیک اسید (از پودر تجاری پتاسیم هیومات تهیه شد و شامل ٨٠-٨٢ ٪ اسید هیومیک، پتاسیم محلول ١١-١٣ درصد، بصورت پودر سیاه رنگ) از مرحله ٦ برگی به فاصله هر ١٢ روز طی سه نوبت همراه آب آبیاری به بوته‌ها اعمال شد. در طی دوره رشد گیاه، آبیاری بصورت سیفونی به طور مرتب هر شش روز انجام شد. بعد از اعمال تیمارها در مرحله گلدهی کامل و قبل از مرحله رسیدگی فیزیولوژیکی گیاه، از هر کرت ١٠ بوته به طور تصادفی انتخاب شده و سپس نمونه‌هایی از برگ‌های توسعه یافته از ١٠ بوته تهیه و صفات بیوشیمایی شنبلیله اندازه گیری شدند. تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها با کمک نرم افزار آماری SAS صورت پذیرفت. مقایسه میانگین‌ها بر اساس آزمون دانکن و در سطح احتمال پنج درصد با یکدیگر مقایسه شدند.

روش تهیه عصاره گیاهی: ابتدا یک گرم از بافت تازهٔ برگی به همراه ١٠ میلی‌لیتر متانول ٩٥٪ در داخل‌هاون چینی کوبیده و له شد. قسمت بالای محلول حاصله، جدا گشته و سپس محلول به دست آمده، در دستگاه سانتریفیوژ به‌مدت ١٠ دقیقه با دور٤٠٠٠ قرار گرفت و بعد، فاز مایع رویی برداشته

شده و به‌عنوان عصاره گیاهی استفاده گردید. عصارهٔ به‌دست آمده تا زمان اندازه‌گیری صفات بیوشیمایی در داخل یخچال نگهداری شد.

اندازه‌گیری فعالیت آنتی‌اکسیدانی برگ شنبلیله: جهت تعیین فعالیت آنتی‌اکسیدانی یا همان میزان مهار رادیکال آزاد برگ شنبلیله از روش اندازه‌گیری کاهش ظرفیت رادیکالی و با کمک ۲،۲-دی‌فنیل ۱- پیکریل هیدرازیل (DPPH) استفاده گردید (Turkmen et al., 2005). لذا برای این منظور ۲ میلی‌لیتر از محلول اتانولی ۰/۱۵ میلی‌مولار DPPH به لوله آزمایش حاوی ۱ میلی‌لیتر عصاره برگ شنبلیله اضافه شد. سپس محلول حاصل به‌مدت ۳۰ ثانیه با دستگاه ورتکس مخلوط شد. بعد محلول به مدت ۲۰ دقیقه در تاریکی و در دمای اتاق تثبیت گردید. جذب نمونه‌ها در طول موج ۵۱۷ نانومتر با دستگاه اسپکتوفتومتر مدل (UNICO,2000,Germany) خوانده شد. سپس فعالیت آنتی اکسیدانی برگ گیاه از رابطه ۱ محاسبه گردید

رابطه ۱

۱۰۰× (جذب قرائت شده/ جذب نمونه شاهد) − ۱

=فعالیت آنتی‌اکسیدانی

ارزیابی میزان فنل کل برگ شنبلیله: برای اندازه‌گیری میزان فنل کل برگ شنبلیله از روش گالیک اسید و معرف فولین سیوکالچو استفاده شد (Sharifi et al., 2015). بدین‌منظور، ۰/۵ میلی‌لیتر از معرف فولین سیوکالچو به ۰/۵ میلی‌لیتر عصاره برگ شنبلیله و استانداردهای گالیگ اسید اضافه و سپس به محلول حاصل ٤ میلی‌لیتر سدیم کربنات یک مولار اضافه شد. پس از ۱۵ دقیقه نگهداری در دمای محیط، جذب نمونه‌ها در طول موج ۷٦۵ نانومتر توسط دستگاه اسپکتوفتومتر خوانده شد. سپس مقدار کل ترکیبات فنلی نمونه‌ها با استفاده از منحنی استاندارد گالیک اسید محاسبه گردید و در پایان غلظت بر حسب میلی گرم گالیک اسید بر گرم عصاره برگ گزارش شد.

ارزیابی میزان آنتوسیانین کل برگ: اندازه‌گیری آنتوسیانین برگ شنبلیله به روش pH افتراقی انجام گرفت. برای این منظور از دو بافر شامل پتاسیم کلرید و کلریدریک اسید با pH =۱ و سدیم استات و کلریدریک اسید با pH = ٤/۵ استفاده شد. نمونه‌ها با بافر به حجم رسانده شدند و سپس در دو طول موج ۵۲۰ و ۷۰۰ نانومتر میزان جذب برای هر دو بافر قرائت شد. میزان آنتوسیانین برگ شنبلیله از رابطه زیر محاسبه گردید (Wrosotad, 1976).

رابطه ۲

$$A = (Amax - A700nm)pH1 - (Amax - A700)\ pH4.5$$

$$\text{آنتوسیانین کل}\ \frac{mg}{L} = \frac{A \times MW \times DF \times 1000}{\varepsilon \times d}$$

A_{max} = جذب در طول موج ۵۱۰.

DF = درجه رقت (۱۰). £ = ۱۵٦۰۰.

M_W = وزن مولکولی پلارگونیدین ۳- گلیکوزاید: ٤۳۳/۳۹ گرم بر مول.

ارزیابی میزان فلاونوئید کل: میزان فلاونوئید کل برگ با استفاده از معرف آلومینیوم کلرید انجام گرفت (Yoo et al., 2008). به این‌ترتیب که به ۰/۵ میلی‌لیتر از عصاره متانولی برگ، ۰/۱ میلی‌لیتر از کلرید آلومینیوم ۱۰ درصد افزوده سپس ۰/۱ میلی‌لیتر استات پتاسیم ۱ میلی‌مولار افزوده و در پایان ۲/۸ میلی‌لیتر آب مقطر اضافه شد. بعد از گذشت مدت زمان ۳۰ دقیقه در دمای آزمایشگاه، جذب آنها در ٤۱۵ نانومتر اندازه‌گیری شد. میزان فلاونوئید از روی منحنی استاندارد کوئرستین تعیین بر حسب میلی‌گرم در گرم عصاره بیان شد.

ارزیابی رنگیزه های فتوسنتزی: برای اندازه‌گیری غلظت کلروفیل و کارتنوئید در برگ گیاه شنبلیله از

روش آرنون استفاده شد (Arnon, 1967). برای این منظور ۰/۲ گرم از بافت‌تر برگ در ۱۰ میلی‌لیتر استون ۸۰ درصد ساییده، سپس حجم محلول با استون به ۲۰ میلی‌لیتر رسید. محلول حاضر به‌مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ٤۰۰۰ دور سانتریفیوژ گردید. میزان جذب نور کلروفیل a، b، کارتنوئید و کلروفیل کل به‌ترتیب در سه طول موج ٦٦۳، ٦٦٤ و٤۷۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتوفتومترمدل (UNICO Germany, 2000) اندازه گیری شد. محتوای کلروفیل با استفاده از فرمول‌های زیر برحسب میلی گرم بر گرم محاسبه گردید.

Chl_a=12.7A_{663} −2.69 A_{644}, Chl_b=22.09 A_{644}−4.68 A_{663}, Total Chl=Chla+Chlb
Carotenoides= (1000A_{470}−2.270 $Chla$−81.40 $Chlb$)/227

ارزیابی میزان کربوهیدرات (قند کل): جهت اندازه‌گیری قند کل برگ شنبلیله از روش معرف آنترون استفاده شد و میزان جذب نور هر یک از نمونه‌ها در طول موج ٦۲۰ نانومتر اندازه‌گیری شد (Mocreadye et al., 1950).

جدول ۱: خصوصیات فیزیکو شیمیایی خاک محل آزمایش.

کلاس بافت خاک	اسیدیته خاک	هدایت الکتریکی (دسی زمینس بر متر)	پتاسیم قابل دسترس (میلی‌گرم بر کیلوگرم)	فسفر قابل دسترس (میلی‌گرم بر کیلوگرم)	نیتروژن کل (درصد)	ماده آلی
لومی	۷/۷٦	۲/۳	۲۲۰	٦۰	۰/۰۸	۰/٦۸

نتایج

میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی: نتایج تجزیه واریانس حاکی از اثر مثبت اسید هیومیک بر میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی شنبلیله است، اما این صفت، تحت تاثیر تراکم کاشت و اثر متقابل اسید هیومیک و تراکم کاشت قرار نگرفت (جدول ۲). نتایج مقایسه میانگین‌ها نشان داد، بیشترین فعالیت آنتی‌اکسیدانی (٦٤/٦ درصد) در تیمار ۱۰ کیلوگرم بر هکتار اسیدهیومیک و کمترین میزان آن (۵۰/۰۳) در تیمار شاهد (عدم کود دهی) بدست آمد، بطوری‌که تیمار ۱۰ کیلوگرم بر هکتار اسید هیومیک سبب افزایش ۲۹ درصدی این صفت نسبت به شاهد گردید (جدول ۳).

میزان فنول: نتایج تجزیه واریانس نشان داد که اثر ساده و متقابل اسید هیومیک و تراکم کاشت بر میزان فنول معنی دار گردید (جدول ۲). با توجه به نتایج مقایسه میانگین‌ها، بیشترین میزان فنول (٤۲/۰٤ میلی‌گرم بر گرم) در تیمار ۱۰ کیلوگرم بر هکتار اسید هیومیک و کمترین میزان آن (٤۱/۸۸ میلی‌گرم بر گرم) در شاهد بدست آمد (جدول ۳). همچنین بیشترین میزان فنول (٤۱/۹۸ میلی‌گرم برگرم) در تراکم کاشت ۲۵ بوته در متر مربع و کمترین میزان این صفت (٤۱/۹۳ میلی‌گرم برگرم) در تراکم کاشت ۵۰ بوته در متر مربع بدست آمد (جدول ٤). نتایج اثر متقابل تیمارها نیز نشان داد، که بیشترین میزان فنول (٤۲/۰۷ میلی‌گرم بر گرم) در تیمار ۱۰ کیلوگرم بر هکتار اسید هیومیک با تراکم کاشت۲۵ بوته در مترمربع و کمترین میزان فنول (٤۱/۸٦ میلی‌گرم بر گرم) در تیمار شاهد(عدم کود دهی) با تراکم کاشت ۲۵ بوته در مترمربع بدست آمد (جدول ۵).

میزان فلاونوئید: با توجه به نتایج تجزیه واریانس، میزان فلاونوئید تحت تاثیر اثر ساده و متقابل اسید هیومیک و تراکم کاشت قرار گرفت (جدول ۲). نتایج مقایسه میانگین‌ها نشان داد که بیشترین میزان فلاونوئید با ٦/٤۳ میلی‌گرم بر گرم در تراکم کاشت ۲۵ بوته در مترمربع و کمترین میزان فلاونوئید با ۵/٤٦ میلی‌گرم برگرم در تراکم کاشت ۵۰ بوته در متر مربع

بدست آمد (جدول ٤). همچنین تیمار ۱۰ کیلوگرم در هکتار اسید هیومیک سبب افزایش ۵۳/٦ درصدی فلاونوئید نسبت به تیمار شاهد (عدم کوددهی) گشت (جدول ۳). نتایج اثر متقابل تیمارها نیز نشان داد، که بیشترین میزان فلاونوئید با ۸/۸۱ میلی‌گرم بر گرم در تیمار۱۰ کیلوگرم در هکتار با تراکم کاشت ۲۵ بوته در مترمربع و کمترین میزان با ٤/۷۵ میلی‌گرم بر گرم در تیمار شاهد با تراکم کاشت ۲۵ بوته مترمربع بدست آمد (جدول ۵).

جدول ۲: تجزیه واریانس خصوصیات صفات بیوشیمیایی‌شنبلیله تحت تیمارهای اسید هیومیک و تراکم کاشت

منابع تغییرات	درجه‌آزادی	آنتوسیانین	کربوهیدرات	فنول	آنتی اکسیدان	فلاونوئید
بلوک	۲	۰/۱٦۵^{ns}	۰/۱٤۰^{ns}	۰/۰۰۱^{ns}	۱۷/۳۰^{ns}	۲/۱۰*
اسید هیومیک	۲	۲/۷۵^{ns}	۱۷/۳۸**	۰/۰۳۹**	۳۲۵/۵۳**	۹/۹۷**
تراکم کاشت	۱	۰/۰۵^{ns}	۵/٤٤*	۰/۰۱۰**	٦/۹۹^{ns}	٤/۲۲**
اسید هیومیک × تراکم کاشت	۲	۰/۱٦۲^{ns}	۰/٤۲٦^{ns}	۰/۰۰۸**	۳۰/٤۰^{ns}	٤/٤۸**
خطا	۱۰	۱/۰۳	۰/٦۸۹	۰/۰۰۰۷	۱۰/۹۸	۰/۳۰
ضریب تغییرات	–	۲٦/٤۲	۱۵/٦۱	۰/۰٦۵	۵/۷۲	۹/۱۹

ns، ** و * به‌ترتیب غیر معنی‌داری و معنی‌داری در سطح احتمال یک و پنج درصد.

جدول ۳: اثرات غلظت‌های مختلف اسید هیومیک بر صفات بیوشیمیایی شنبلیله.

اسید هیومیک (کیلوگرم در هکتار)	آنتوسیانین (میلی‌گرم برگرم)	کربوهیدرات (میلی‌گرم بر گرم)	فنول (میلی‌گرم برگرم)	آنتی‌اکسیدان (درصد)	فلاونوئید (میلی‌گرم برگرم)
۰	۳/۱٦^{a}	۳/٤۵^{b}	٤۱/۸۸^{c}	۵۰/۰۳^{c}	٤/۷۷^{c}
۵	۳/۸٤^{a}	۵/۷۱^{a}	٤۱/۹٤^{b}	۵۸/۷۹^{b}	۵/۷۵^{b}
۱۰	٤/۵۲^{a}	٦/۷۳^{a}	٤۲/۰٤^{a}	٦٤/٦۷^{a}	۷/۳۳^{a}

در هر ستون میانگین‌های دارای حداقل یک حرف مشترک، اختلاف آماری معنی‌داری در سطح ۵ درصد ندارند.

جدول ٤: اثرات غلظت‌های مختلف تراکم کاشت بر صفات بیوشیمیایی شنبلیله.

تراکم کاشت (بوته در متر مربع)	آنتوسیانین (میلی‌گرم برگرم)	کربوهیدرات (میلی‌گرم بر گرم)	فنول (میلی‌گرم برگرم)	آنتی‌اکسیدان (درصد)	فلاونوئید (میلی‌گرم برگرم)
۵۰	۳/۸۹^{a}	٤/۷٦^{b}	٤۱/۹۳^{b}	۵۷/۲۱^{a}	۵/٤٦^{b}
۲۵	۳/۷۸^{a}	۵/۸٦^{a}	٤۱/۹۸^{a}	۵۸/٤٦^{a}	٦/٤۳^{a}

در هر ستون میانگین‌های دارای حداقل یک حرف مشترک، اختلاف آماری معنی‌داری در سطح ۵ درصد ندارند.

میزان کربوهیدرات: نتایج تجزیه واریانس نشان داد که اثر ساده اسید هیومیک و تراکم کاشت بر میزان کربوهیدرات معنی دار بود (جدول ۲). با توجه به نتایج مقایسه میانگین‌ها، بیشترین میزان کربوهیدرات (٦/۷۳ میلی‌گرم بر گرم) در تیمار ۱۰ کیلوگرم بر هکتار اسید هیومیک و کمترین میزان آن (۳/٤۵ میلی‌گرم بر گرم) در شاهد بدست آمد، هر چند بین تیمارهای ۵ و ۱۰ کیلوگرم اسید هیومیک تفاوت آماری وجود نداشت (جدول ٦). همچنین بیشترین میزان کربوهیدرات (۵/۸٦ میلی‌گرم برگرم) در تراکم کاشت ۲۵ بوته در مترمربع و کمترین میزان آن (٤/۷٦ میلی‌گرم بر گرم) در تراکم کاشت ۵۰ بوته در متر مربع بدست امد (جدول ۷).

میزان آنتوسیانین: نتایج تجزیه واریانس نشان داد تراکم کاشت قرار نگرفت (جدول ۲). میزان آنتوسیان تحت تاثیر تیمار اسید هیومیک و

جدول ۵: برهمکنش سطوح مختلف اسیدهیومیک و تراکم کاشت بر صفات بیوشیمیایی شنبلیله.

تراکم کاشت (بوته در مترمربع)	اسید هیومیک (کیلوگرم در هکتار)	فنول (میلی‌گرم برگرم)	فلاونوئید (میلی‌گرم برگرم)
۵۰	۰	٤۱/۸۹^{c}	٤/۸۰^{bc}
۲۵	۰	٤۱/۸٦^{c}	٤/۷۵^{c}
۵۰	۵	٤۱/۸۸^{c}	۵/۷۵^{bc}
۲۵	۵	٤۲/۰۰^{b}	۵/۷۵^{bc}
۵۰	۱۰	٤۲/۰۱^{b}	۵/۸۵^{b}
۲۵	۱۰	٤۲/۰۷^{a}	۸/۸۱^{a}

در هر ستون میانگین‌های دارای حداقل یک حرف مشترک، اختلاف آماری معنی‌داری در سطح ۵ درصد ندارند.

رنگیزهای فتوسنتزی (کلروفیل کل): نتایج تجزیه واریانس نشان داد که کلروفیل کل تحت تاثیر اسید هیومیک و تراکم کاشت قرار گرفت، اما بر همکنش اسید هیومیک با تراکم کاشت معنی دار نگردید (جدول ٦). نتایج مقایسه میانگین‌ها نشان داد که بیشترین میزان کلروفیل کل با ٤/۵۱ میلی‌گرم بر گرم در تیمار ۱۰ کیلوگرم در هکتار اسید هیومیک و کمترین میزان کلروفیل کل با ۳/۱۸ میلی‌گرم بر گرم در تیمار شاهد (عدم کودهی) بدست آمد (جدول ۷). همچنین تراکم کاشت ۲۵ بوته در مترمربع سبب افزایش ۱۰/۲۲ درصدی کلروفیل کل نسبت به تراکم کاشت ۵۰ بوته در متر مربع گردید. (جدول ۸).

کلروفیل a: نتایج بیانگر اثر معنی دار اسید هیومیک بر میزان کلروفیل a بود، اما این صفت تحت تاثیر تراکم کاشت و اثر متقابل اسید هیومیک و تراکم کاشت قرار نگرفت (جدول ٦). با توجه به نتایج مقایسه میانگین‌ها، بیشترین میزان کلروفیل a با ۲/۳٤ میلی‌گرم بر گرم در تیمار ۱۰ کیلوگرم بر هکتار اسید هیومیک و کمترین میزان کلروفیل a با ۱/۷٤ میلی‌گرم بر گرم در تیمار شاهد بدست آمد (جدول ۷).

جدول ٦: تجزیه واریانس خصوصیات صفات بیوشیمیایی شنبلیله تحت تیمارهای اسیدهیومیک و تراکم کاشت

منابع تغییرات	درجه‌آزادی	کارتنوئید	کلروفیل b	کلروفیل a	کلروفیل کل
بلوک	۲	۰/۱۲۸^{ns}	۰/۰۳^{ns}	۰/۰۰۱^{ns}	۰/۰۳۷^{ns}
اسید هیومیک	۲	۰/۱۹٦*	۰/۹۵٦**	۰/۵۷۸*	۲/۹۹**
تراکم کاشت	۱	۰/۰۰۰۷^{ns}	۰/۰۹^{ns}	۰/۲۲۵^{ns}	۰/٦۰*
اسید هیومیک × تراکم کاشت	۲	۰/۰۷۱^{ns}	۰/۱۱۱^{ns}	۰/۱۳۲^{ns}	۰/۰۹۳^{ns}
خطا	۱۰	۰/۰۳۸	۰/۰٦۸	۰/۱۱۷	۰/۰۸
ضریب تغییرات	–	۱۹/٤۳	۱۵/۳۵	۱۷/۱۲	۷/۸۱

ns، ** و * به‌ترتیب غیر معنی‌داری و معنی‌داری در سطح احتمال یک و پنج درصد.

کلروفیل b نتایج نشان داد اسید هیومیک بر میزان کلروفیل b معنی‌دار بود، اما بر همکنش اسید هیومیک با تراکم کاشت معنی‌دار نگردید (جدول ٦). با توجه به نتایج مقایسه میانگین‌ها، بیشترین میزان کلروفیل b (٢/١٦ میلی‌گرم بر گرم) در تیمار ١٠ کیلوگرم بر هکتار اسید هیومیک و کمترین میزان کلروفیل b (١/٤٤ میلی‌گرم بر گرم) در شاهد بدست آمد، بطوریکه تیمار ١٠ کیلوگرم بر هکتار اسید هیومیک سبب افزایش ٥٠ درصدی کلروفیل b نسبت به شاهد گردید (جدول ٧).

کارتنوئید: نتایج تجزیه واریانس نشان داد، که فقط اسید هیومیک بر میزان کارتنوئید معنی‌دار بود (جدول ٦)، بطوری‌که بیشترین میزان کارتنوئید با ١/٢٢ میلی‌گرم بر گرم در تیمار ١٠ کیلوگرم بر هکتار اسید هیومیک و کمترین میزان کارتنوئید با ٠/٨٩٠ میلی‌گرم بر گرم در تیمار شاهد بدست آمد (جدول ٧).

جدول ٧: اثرات غلظت‌های مختلف اسید هیومیک بر صفات بیوشیمیایی شنبلیله.

اسید هیومیک (کیلوگرم در هکتار)	کارتنوئید (میلی‌گرم بر گرم)	کلروفیل b (میلی‌گرم بر گرم)	کلروفیل a (میلی‌گرم بر گرم)	کلروفیل کل (میلی‌گرم بر گرم)
٠	٠/٨٩٠^{b}	١/٤٤^{b}	١/٧٤^{b}	٣/١٨^{b}
٥	٠/٩٢٦^{b}	١/٥١^{b}	١/٩٠^{b}	٣/٤١^{b}
١٠	١/٢٢^{a}	٢/١٦^{a}	٢/٣٤^{a}	٤/٥١^{a}

در هر ستون میانگین‌های دارای حداقل یک حرف مشترک، اختلاف آماری معنی‌داری در سطح ٥ درصد ندارند.

جدول ٨: اثرات غلظت‌های مختلف تراکم کاشت بر صفات بیوشیمیایی شنبلیله.

تراکم کاشت (بوته در مترمربع)	کارتنوئید (میلی‌گرم برگرم)	کلروفیل b (میلی‌گرم برگرم)	کلروفیل a (میلی‌گرم برگرم)	کلروفیل کل (میلی‌گرم برگرم)
٥٠	١/٠١^{a}	١/٦٣^{a}	١/٨٨^{a}	٣/٥٢^{b}
٢٥	١/٠١^{a}	١/٧٧^{a}	٢/١٠^{a}	٣/٨٨^{a}

در هر ستون میانگین‌های دارای حداقل یک حرف مشترک، اختلاف آماری معنی‌داری در سطح ٥ درصد ندارند.

بحث

همانطور که نتایج نشان داد (جدول ٢)، اسید هیومیک توانست میزان آنتی‌اکسیدان شنبلیله را افزایش دهد. همسو با نتایج این آزمایش، نتایج تحقیق مظفری و همکاران (Mozafari et al., 2017) نشان داد که با افزایش سطح اسیدهیومیک، بر میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی گیاه خرفه افزوده شد. همچنین گزارش گردید که اسیدهیومیک علاوه بر بهبود وضعیت تغذیه‌ای گیاه و افزایش جذب عناصر غذایی، منجر به افزایش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی گیاه نیز می‌گردد (Tabatabaie and Nazari, 2007). گزارش زنگ (Zang, 2000) مبین آن است که مواد هیومیک عموما مانند تنظیم‌کننده‌های رشد نظیر اکسین وسایتوکنین عمل می‌کند و سبب بهبود تحمل به تنش‌های مختلف و افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدانی در گیاه می‌شود. میزان مواد مؤثره موجود در گیاهان

دارویی به شرایط آب و هوایی، روش‌های زراعی، مدیریت آبیاری و همچنین تغذیه کودی بستگی دارد، بنابراین بهبود عملکرد کمی وکیفی می‌تواند توسط هریک از این عوامل حاصل گردد (Kuntal et al., 2007). گیاهان از بین این عوامل، نسبت به مقادیر مختلف کودهای مورد استفاده پاسخ‌های متفاوتی نشان می‌دهند و مدیریت تغذیه‌ای مناسب می‌تواند در افزایش عملکرد و کیفیت محصول حائز اهمیت باشد (Hikaru et al., 2007). نوع خاک و میزان ترکیبات هیومیکی موجود در خاک می‌تواند اثرات قابل توجهی داشته باشد به گونه‌ای که هرچه ترکیبات هیومیکی خاک بیشتر باشد، فعالیت آنتی‌اکسیدانی گیاه بیشتر است (Rimmer, 2006). همانطور که مشاهده شد اثر ساده و متقابل اسید هیومیک و تراکم کاشت بر میزان فنول معنی‌دار گردید(جدول ۲)، در تحقیق علیزاده احمدابادی و همکاران (Alizadeh Ahmadabadi et al., 2017) نشان داده شد که کاربرد اسید هیومیک بر فنول کل در گیاه سرخارگل معنی دار شد. در تحقیق دیگری روی اثر غلظت‌های مختلف ورمی‌کمپوست و اسیدهیومیک بر خصوصیات کمی و کیفی گل همیشه بهار، محققین دریافتند که غلظت ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر اسیدهیومیک توانست سبب افزایش فنل کل گیاه گردد (Abedini et al., 2015). همچنین گزارش شده است که گیاهان نمی توانند به طور همزمان منابع را به رشد و دفاع اختصاص دهند و رقابت بین پروتئین‌ها و فنل‌ها درگیاهان برای پیش سازهای معمول درگیر در بیوسنتز آنها وجود دارد از سوی دیگر، اسیدهای ارگانیک (مانند اسید هیومیک) به عنوان پیش‌سازها یا فعال کننده‌های گیاهان دارویی و همچنین ترکیبات ثانویه در گیاه عمل می کنند و در نتیجه سبب افزایش محتوای فنل کل می‌شوند (Viti et al., 1989). از طرفی افزایش ترکیبات فنلی با افزایش میزان کربوهیدرات‌ها در گیاه ارتباط مستقیم دارد، از آنجا که هیدرات‌های کربن، اسکلت مورد نیاز برای ساخت ترکیبات فنلی شناخته شده اند لذا افزایش در مقدار آنها به عنوان افزایش سوبسترا برای ترکیبات فنلی می‌باشد (Nguyen and Niemeyer, 2010)، که در این آزمایش، چون میزان قند افزایش یافته است لذا با این دلیل بیان شده، همخوانی دارد. طبق نتایج آزمایش (جدول۲) معین گردید که میزان کربوهیدرات تحت تاثیر تیمار اسید هیومیک قرار گرفت، مشابه نتایج این تحقیق، کاربرد اسید هیومیک برروی گیاه چای ترش اثر مثبتی بر کربوهیدرات داشت (Heidari and Khalili, 2014). همچنین گزارش شده که اسید هیومیک موجب افزایش انتقال گلوکز از بین غشاهای سلولی در گیاهان پیاز، چغندرقند و آفتابگردان شده و موجب افزایش میزان کربوهیدرات در سیب زمینی، چغندر قند، هویج و گوجه فرنگی می‌شود (Tan, 1979). اسید هیومیک دارای فعالیت شبه هورمونی است و جذب عناصر معدنی همانند فسفر و پتاسیم را در گیاهان افزایش می دهد که این امر خود سبب بهبود فتوسنتز و افزایش مقدار قند تولیدی در گیاه خواهد شد (Thi Lua and Bome, 2001). همچنین مواد هیومیکی و آلی باعث افزایش فتوسنتز در گیاه می‌شود و پیرو آن تنفس هم که یک رابطه مستقیم با فتوسنتز دارد افزایش می‌یابد، و در نتیجه، این عوامل فیزیولوژیکی باعث حفظ و ذخیره مواد جامد محلول مثل قندها در برگ می‌شوند. تامپسون و مارتین (Thompson and Martin, 1995) نیز طی مطالعه‌ای بر روی نخود نشان دادند که با افزایش تراکم کاشت، انتقال کربوهیدات‌ها به مخزن در انتهای فصل رشد با کاهش معنی‌دار مواجه می‌شود که با نتایج این آزمایش مطابقت دارد. نتایج نشان داد که تیمارهای مورد استفاده (اسید هیومیک و ترکم کاشت) بر میزان

فلاونوئید شنبلیله تاثیر معنی‌دار داشتند. مشابه نتایج این پژوهش، در آزمایشی که در رابطه با تأثیر اسیدهیومیک بر صفات بیوشیمایی میوه فلفل انجام شد، گزارش گردید که میزان فلاونوئید و فعالیت آنتی‌اکسیدانی این گیاه با کاربرد اسید هیومیک افزایش یافت (Aminifard et al., 2012). همچنین‌هارگریوس و همکاران (Hargreaves et al., 2009) در گیاه توت فرنگی نشان دادند، که میزان فلاونوئید میوه با کاربرد کودهای آلی افزایش یافت. صالحی و همکاران (Salehi et al.,2010) در بررسی‌های خود به این نتیجه دست یافتند که، نهاده‌های اکولوژیک از طریق مکانیسم‌هایی نظیر انحلال ویتامین‌ها، ایزوآنزیم‌ها، هورمون‌ها و آنتی‌بیوتیک‌های طبیعی، سنتز آنزیم فنیل‌آلانین آمونیالیاز (PAL) را فعال و در نتیجه منجر به افزایش میزان فلاونوئید درگیاهان می شود. فلاونوئیدهای موجود در برگ به‌عنوان گیرنده رادیکال‌های آزاد عمل میکنند و گیاهان را در برابر تنش‌های اکسیداتیو محافظت میکنند. همچنین، فلاونوئیدها به‌دلیل داشتن نقش آنتی‌اکسیدانی، به‌طور مستقیم با وارد شدن در واکنش‌های احیایی و یا به‌طور غیرمستقیم به‌وسیله کلات کردن آهن، مانع تنش اکسیداتیو می‌شوند (Yousefi et al., 2014). در این آزمایش مشاهده گردید که میزان رنگیزه‌های فتوسنتز تحت تاثیر اسید هیومیک قرار گرفت (جدول۳). مشابه نتایج این تحقیق، سنجری میجانی و همکاران (Sanjari Mijani et al., 2014) نشان دادند که اسیدهیومیک سبب افزایش محتوای کلروفیل‌های a ،b وکاروتنوئید در گیاه چای ترش شد. فرار و همکاران (Ferrara et al., 2008) نیز اعلام کردند که اسیدهیومیک سبب افزایش میزان کلروفیل و رنگیزه‌های فتوسنتزی، کارتنوئیدها در برگهای گیاه انگور شد. همچنین در نتایج محققین دیگر، اسیدهیومیک باعث افزایش معنی‌دار کلروفیل در گیاه گندم شد (and Khazaie, Sabzevaria.2009). مواد هیومیک در فرآیندهای بیولوژیک مانند فتوسنتز و کلروفیل کل مؤثرند (Salman et al., 2005). اسید هیومیک سبب تداوم بافت‌های فتوسنتز کننده شده و عملکرد گیاهان را افزایش می دهد و نیز از طریق تأثیرات مثبت فیزیولوژیکی از جمله اثر بر متابولیسم سلولهای گیاهی و افزایش غلظت کلروفیل برگ، افزایش عملکرد گیاه

را در پی دارد (Naderi et al., 2002). همچنین مشابه نتایج این آزمایش، اثر تراکم‌های مختلف کاشت بر میزان کلروفیل a و b در برگ‌های نخود نشان داد که با افزایش تعداد گیاه از ۲۷ تا ٤٦ بوته در مترمربع میزان کلروفیل‌ها روندی افزایشی داشته است و از تراکم ٤٦ تا ۵۷ بوته در مترمربع میزان آنها از روندی کاهشی برخوردار شده که می تواند ناشی از عوامل درونی گیاه، بر اثر رقابت بوته‌ها برای جذب عناصر غذایی خاک، باشد (Majnoun Hosseini et al., 2003).

نتیجه‌گیری نهایی

بر اساس نتایج یکساله و با توجه به شرایط محیطی و خاک حاصله از این آزمایش، مشخص شد که اسید هیومیک و تراکم کاشت توانسته‌اند بر اکثر شاخص‌های بیوشیمایی و رنگیزه‌های فتوسنتزی گیاه دارویی شنبلیله اثر مثبت بگذارند. در این تحقیق، سطوح بالا اسید هیومیک (۱۰ کیلوگرم در هکتار) و تراکم کاشت پایین (۲۵ بنه در مترمربع) بیشترین تاثیر را بر خصوصیات فیتوشیمایی گیاه اعمال کردند، هر چند لازم است. سطوح پیشنهادی در این تحقیق، در مناطق و آزمایشات دیگر هم مورد تایید قرار گیرد. بطور کلی، با توجه به نتایج این مطالعه، به نظر می‌رسد که تراکم کاشت مناسب و استفاده بهینه از نهاده‌های آلی از جمله اسید هیومیک (البته با توجه به در نظر گرفتن شرایط خاک هر منطقه و قابل جذب بودن این کود در خاک) می‌تواند برای بهبود بخشیدن به متابولیت‌های ثانویه و فعالیت آنتی‌اکسیدانی این گیاه ارزشمند مد نظر قرار گیرد.

References

1. Abedini, T., Moradi, P. and Hani, A. 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(10): 1100-1103.
2. Alizadeh Ahmadabadi, A., Khorasani Nejad, S. and Hemati, Kh. 2017. The effect of low irrigation and humic acid on morphological characteristics and phytochemical irrigation and Echinacea (*Echinacea purpurea* L.) root. Journal of Crops, 19(1): 1-14.
3. Aminifard, M.H., Aroiee, H., Azizi, M., Nemati, H. and Jaafar, H.Z. 2012. Effect of humic acid on antioxidant activities and fruit quality of hot pepper (*Capsicum annuum* L.). Journal of Herbs, Spices and Medicinal Plants, 18(4): 360-369.
4. Astaraei, A.R. and Ivani, R. 2008. Effect of organic sources as foliar spray and root media on nutrition if cowpea plant. American-Eurasian Journal of Agriculture Environmental Science, 3(3): 352-356.
5. Beige, O. 2005. Production and processing of medicinal plants. Press Astan Quds Razavi Mashhad, 438 p.
6. Bouyoucos, C.J. 1962. Hydrometer method improved for making particle size analysis of soil. Journal of Agronomy, 54: 464-465.
7. Caliskan, M.E., Kusman, N. and Caliskan, S. 2009. Effects of plant density on the yield and yield components of true potato seed (TPS) hybrids in early and main crop potato production systems. Field Crops Research, 114: 223-232.
8. Ferrara, G., Pacifico, A., Simeone, P. and Ferrara, E. 2008. Preliminary study on the effects of foliar applications of humic acids on 'Italia' table grape. Journal International OENO One, 42: 79-87.
9. Gewaily, E.M., Fatma, I., El-Zamik, T., El-Hadidy, T., Abd El-Fattah, H.I. and Salem, S.H. 2006. Efficiency of bio-fertilizers, organic and inorganic amendments application on growth and essential oil of marjoram (*Majorana hortensis* L.) plants grown in sandy and

calcareous soils. Zagazig Journal of Agricultural Research, 33: 205-230.
10. Ghorbani, S., Khazaei, H., Kafi, M. and Banayan aval, M. 2010. Effect of using humic in irrigation water on corn yield. Journal of Agricultural Ecology, 2(1): 111-118.
11. Haluschak, P. 2006. Laboratory methods of soil analysis. Canada-Manitoba soil survey, 3-133.
12. Hargreaves, J.C., Adl, M.S. and Warman, P.R. 2009. The effects of municipal solid waste compost and compost tea on mineral element uptake and fruit quality of strawberries. Compost Science and Utilization, 17(2): 85-94.
13. Heidari, M. and Khalili, S. 2014.The effect of humic acid and phosphorus on grain and flower photosynthetic pigments and mineral ingredients in sour tea. Iranian Journal of Plant Plants, 45(2): 191-199.
14. Hikaru, A., Amzad, H., Yukio, I., Kenichi, Y., Kazuo, H., Yukikazu, I. and Yoko, A. 2007. Effect of application of N, P and K alone or in combination of growth, yield and curcumin content of turmeric (*Curcuma longa* L.). Plant Production Science, 10(1): 151-154.
15. Ibrahim, H.M. 2012. Response of some sunflower hybrids to different levels of plant density. Procedia, 4: 175-182.
16. Kuntal, D., Raman, D., Thippenahalli, N.S. and Sekeroglu, N. 2007. Influence of bio-fertilizers on the biomass yield and nutrient content in (*Stevia rebaudiana* L.) Journal of Medicinal Plants Research, 1(1): 5-8.
17. Krizek, D. T., Mirecki, R. M. and Britz, S. J. 1997. Inhibitory effects of ambient levels of solar UV-A and UV-B radiation on growth of cucumber. Physiology Plant, 100(4): 886-893.
18. Lichtenthaler, H.K. 1987. Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic bio membranes. Methods in Enzymology, 148(34): 350-382.
19. Majnoun Hosseini, N., Mohammadi, H., Pustini, K. and Zainali Khaneghah, H. 2003. Effect of plant density on agronomic traits, chlorophyll content and shoot transfer percentage in white chickpea cultivars (*Cicer Arietinum* L.). Journal of Agricultural Sciences, 34(4): 1011-1019.
20. Mandegary, A., Pournamdari, M., Sharififar, F., Pournourmohammadi, SH., Fardiar, R. and Shooli, S. 2012.

Alkaloid and flavonoid rich fractions of fenugreek seeds (*Trigonella foenum-graecum* L.) with antinociceptive and anti-inflammatory effects. Journal Food and Chemical Toxicology, 50: 2503-2507.

21. Mocready, R., Guggolz, J., Silviera, V. and Owens, H. 1950. Determination of starch and amylose in vegetables. Application to peas. Journal of Analytical Chemistry, 22: 1156-1158.
22. Mozafari, S., Khorasani Nejad, S. and Greginia shabankare. H. 2017. The effect of irrigation regimes and humic acid application on some physiological and biochemical characteristics of purapole (*Portulaca oleracea* L.) medicinal plant in greenhouse conditions. Journal of Crops, 19(2): 401-416.
23. Naderi, S., Pizzeghello, D., Muscolo, A. and Vianello, A. 2002. Physiological effects of humic substances on higher plants. Soil Biology and Biochemistry, 34: 1527-1536.
24. Nehvi, F.A., Khan, M.A., Lone, A.A. and Maqhdoomi, M.I. 2009. Impact of microbial inoculation on growth and yield of saffron in Kashmir. 3rd International Symposium on Saffron: Forthcoming Challenges in Cultivation, Greece. 20-24 May: 171-174.
25. Nguyen, P.H.M., Kwee, E.M. and Niemeyer, E.D. 2010. Potassium rate alters the antioxidant capacity and phenolic concentration of basil (*Ocimum basilicum* L.) leaves. Food Chemistry, 123(4): 1235-1241.
26. Olsen, S., Cole, C., Watanabe, F. and Dean, L. 1954. Estimation of available phosphorus in soils by extraction with sodium bicarbonate. USDA Circular Nr 939, Office, Washington, D.C.
27. Rimmer, D.L. 2006. Free radicals, antioxidants, and soil organic matter recalcitrance. European Journal of Soil Science, 57: 91-94.
28. Sabzevari, S., Khazaie, H.R. and Kafi, M. 2009. Effect of humic acid on root and shoot growth of two wheat cultivars (*Triticum aestivum* L.). Journal of Water and Soil, 23(2): 87-94.
29. Sabzevari, S., Khazaie, H.R. and Kafi, M. 2010. Study on the effects of humic acid on germination of four wheat cultivars (*Triticun aestivum* L.). Journal of Iranian Field Crop Research, 8(3): 473-480.
30. Safarnejad, A., Salami, M.R. and Hamidi, H. 2007. Morphological characterization of medicinal plants (*Plantago ovata*, and *Plantago psyllium*) in response to salt stress. Pajouhesh and Sazandegi, 75: 152-160.
31. Salehi, B., Bagherzadeh, A.S. and Ghasemi, M., 2010. Effect of humic acid on growth, yield and yield components of three tomato cultivars (*Lycopersicon esculentum* L.). Journal of Agricultural Ecology, 2 (4): 640-647.
32. Salman, S.R., Abou-Hussein, S.D., Abdel-Mawgoud, A.M.R. and El-Nemr, M.A. 2005. Fruit yield and quality of watermelon as affected by hybrids and humic acid application. Journal of Applied Sciences Research, 1: 51-58.
33. Sanjari Mijani, M., Sirous Mehr, A. R. and Fakhri, B.A. 2014. Effect of drought stress and humic acid on some physiological properties of (*Hibiscus gossypifolius* L.). Journal of Crops, 17(2): 403-417.
34. Sharma, S.K. 2000. Response of nitrogen and spacing on fenugreek seed production. Horticultural Journal, 13(2): 39-42.
35. Tan, K.H. and Nopamornbodi, V. 1979. Effect different levels of humic acid on nutrient content and growth of Corn *(Zea mays).* Plant and Soil, 51: 283-287.
36. Tabatabaie, J. and Nazari, J. 2007. Influence of nutrient concentrations and NaCl salinity on the growth, photosynthesis, and essential oil content of peppermint and lemon verbena. Turkish Journal of Agriculture and Forestry, 31: 245-253.
37. Thi Lua, H. and Bome, M. 2001. The influence of humic acid on tomato in hydroponic system. Acta Horticulture, 548: 451-458.
38. Thompson, P.R. and Martin, W.D. 1995. A chickpea cultivar x population x row space study in southern Queensland.

Proceeding of the 8th Australian Agronomy. 34-39 p.
39. Turkmen, N., Sari, F. and Velioglu, Y. S., 2005. The effect of cooking methods on total phenolics and antioxidant activity of selected green vegetables. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 93(4): 713-718.
40. Viti, R., Bartolini, S. and Vitagliano, C. 1989. Growth regulators on pollen germination in olive. Journal of Acta Horticulture, 286: 227-230.
41. Walkley, A. and Black, I.A. 1934. An examination of the degtjareff method for determining soil organic matter, and a proposed modification of the chromic acid titration method. Soil Science, 37: 29-38.
42. Wrosotad, R.E. 1976. Color and pigment analysis in fruit products. Oregon State University Publications Limited, Cornwalis. U.S.A.
43. Yousefi, M., Enteshare, SH. and Saadatmand, M. 2014. The effect of treatment with silicea and bor some morphological characteristics, anatomical and physiological borage (*Echium amoenum* L.). Journal of Greenhouse Crop Science and Technology, 5(18): 52-62.
44. Yoo, K.M., Lee, C., Lee, H., Moon, B. K. and Lee, C.Y. 2008. Relative antioxidant and cytoprotective activities of common herbs. Food Chemistry, 106: 929-936.
45. Yadav, J.S., Jagdev, S., Virender, K. and Yadav, B.D. 2000. Effect of sowing time, spacing and seed rate on seed yield of fenugreek (*Trigonella foenum gracum* L.) on light textured soil. Haryana Agricultural University Journal of Research, 30 (3-4): 107-111.
46. Zhang, X. and Schmidt, R.E. 2000. Hormone-containing products impact on antioxidant status of tall fescue and creeping bent grass subjected to drought. Crop Science, 40: 1344-1349.

Effects of different levels of humic acid and planting density on antioxidant activity and biochemical properties of *Trigonella foenum- graecum* L.

Aminifard, M.H.[1]*, Ghaderi zh, H.[2]

[1]Assistant Prof, Department of Horticultural Science and Special Plants Regional Research Center, College of Agriculture, University of Birjand, Birjand, Iran

[2]M.Sc student of Horticultural Science (Medicnal plants), College of Agriculture, University of Birjand, Birjand, Iran

Received: 2018-7-14; Accepted: 2018-10-09

Abstract

Fenugreek (*Trigonellafoenum- graecum* L.) is one of the significant medicinal plants and application of organic materials is very important for achieving maximum yields of that. In this study, the effects of applications of humic acid and planting density on biochemical characteristics of fenugreek were evaluated under field conditions. Treatments were of three levels of humic acid (0.5 and 10 kg ha^{-1}) and two plant density (25 and 50 plants/m^2). This experiment was carried out as factorial based on randomized completely block design with three replications in research farm of University of Birjand, Iran, during growing season 2016.The leaves` antioxidant compounds (antioxidant activity, total phenol and anthocyanin) were recorded at flowering stage. The results were showed that humic acid had significant effect on most biochemical characteristics(antioxidant activity, flavonoid content, total phenol and carbohydrate). The highest of antioxidant activity (64. 67%) and carbohydrate (6.73 mg/g) were observed in 10 kg/ha humicacid, while the lowest antioxidant activity (50.03%) and carbohydrate (3.45 mg/g) were recorded in control. Also, the humic acid uses significantly increased photosynthetic pigments (total chlorophyll, a, b and carotenoids). The highest and the lowest total chlorophyll content were observed (4.51 mg /g) in 10 kg/ha humic acid andcontrol (3.18 mg/g), respectively. Based on the results, the highest flavonoid content (6.43 mg/g) was obtained in the plant density of 25 plants /m^2, whereas the lowest flavonoid content (5.46 mg /g) was in planting density of 50 plants /m^2. There were significant differences in the total phenolic and flavonoid content due to interaction plant density and humic acid treatments, in which the highest amount of total phenolic content (42.07 mg/g) was observed in 10 kg/ha humic acid with the plant density of 25 plants /m^2.and the lowest content was recorded (41.86 mg /g) in the control with density of 25 plants /m^2. According to the results, using 10 kg ha^{-1} of humic acid and planting density of 25 plants/ m^2 had a significant role in increasing biochemical characteristics of fenugreek.

Keywords: Anthocyanin, Fenugreek, Humic acid, Organic fertilizer, Phenol Compounds, Secondary metabolite.

*Corresponding author; mh.aminifard@birjand.ac.ir