

### اثر کودهای زیستی و کاربرد اسیدهای هیومیک و فولویک بر برخی خصوصیات فیتوشیمیایی گیاه دارویی گاوزبان ایرانی (*Echium amoenum*)

محمد بهزاد امیری\*<sup>۱</sup>، پرویز رضوانی مقدم<sup>۲</sup>، محسن جهان<sup>۳</sup>.

۱- استادیار مجتمع آموزش عالی گناباد

۲- استاد دانشگاه فردوسی مشهد

۳- دانشیار دانشگاه فردوسی مشهد

(amiri@gonabad.ac.ir)

#### چکیده

به منظور بررسی اثر نهاده‌های بوم‌سازگار بر خصوصیات فیتوشیمیایی گل و دانه گاوزبان ایرانی (*Echium amoenum*) آزمایشی در دو سال زراعی متوالی ۹۱-۱۳۹۰ و ۹۲-۱۳۹۱ در دانشگاه فردوسی مشهد در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی با سه تکرار انجام شد. تیمارهای آزمایش شامل هفت نوع نهاده آلی و زیستی مختلف نظیر اسید هیومیک، اسید فولویک، نیتروکسین (حاوی باکتری‌های *Azotobacter spp.* و *Azospirillum spp.*)، بیوفسفر (حاوی باکتری‌های *Bacillus sp.* و *Pseudomonas sp.*)، بیوسولفور (حاوی باکتری‌های *Acidithiobacillus spp.*)، میکوریزا حاوی قارچ *Glomus mosseae* و حاوی قارچ *Rhizophagus intraradices* و عدم استفاده از کود (به عنوان تیمار شاهد) بودند. نتایج آزمایش نشان داد که بیشترین میزان فنول کل در نتیجه‌ی کاربرد بیوسولفور بدست آمد و میزان آنتوسیانین کل در شرایط استفاده از اسید هیومیک و اسید فولویک به ترتیب ۳۸ و ۳۳ درصد نسبت به شاهد ارتقاء پیدا کرد. کودهای بیولوژیک بیوفسفر و بیوسولفور میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی را به ترتیب ۸ و ۷ درصد نسبت به شاهد افزایش دادند. هر دو میکوریزای مورد مطالعه (*G. mosseae* و *Rh. intraradices*) به ترتیب افزایش ۲۰ و ۱۵ درصدی روغن دانه و افزایش ۳۰ و ۱۸ درصدی پروتئین دانه را در مقایسه با شاهد در پی داشتند. به طور کلی با توجه به یافته‌های این پژوهش، با کاربرد نهاده‌های بوم‌سازگار ضمن کاهش خسارات ناشی از کودهای شیمیایی، خصوصیات کیفی گاوزبان ایرانی بهبود یافت.

**کلمات کلیدی:** آنتوسیانین کل، فعالیت آنتی‌اکسیدانی، فنول کل، میکوریزا، نیتروکسین

#### مقدمه

تأکید سیستم‌های آینده‌ی کشاورزی بر مبنای کاهش در مصرف انرژی، نهاده‌ها و مدیریت مناسب آب و خاک و منابع بیولوژیکی و حفظ محیط‌زیست به منظور دستیابی به عملکرد مطلوب و پایدار است، به طوری که اطمینان از تولید مداوم و پایدار منابع غذایی به‌ویژه گیاهان دارویی همراه با حفظ محیط‌زیست، به یکی از مهمترین موضوعات علوم کشاورزی تبدیل شده و مورد توجه روزافزون تولیدکنندگان، محققین، دولتمردان و سیاست‌گذاران قرار گرفته است. در سیستم‌های کشاورزی پایدار، استفاده از منابع تجدیدپذیری که حداکثر محاسن اکولوژیکی و حداقل مضرات زیست‌محیطی را دارا باشند، امری ضروری است [۱۵]. از جمله این منابع تجدیدپذیر می‌توان به استفاده از نهاده‌های بوم‌سازگار نظیر اسیدهای آلی و کودهای بیولوژیک اشاره کرد.

اسید هیومیک با وزن مولکولی ۳۰-۳۰۰ کیلودالتون و اسید فولویک با وزن مولکولی کمتر از ۳۰ کیلودالتون به ترتیب سبب تشکیل کمپلکس پایدار نامحلول و محلول با عناصر میکرو می‌گردند. اسید هیومیک دارای درصد کربن بیشتری نسبت به اسید فولویک بوده، ولی اسید فولویک، اکسیژن بیشتری نسبت به اسید هیومیک دارد. کودهای هیومیکی با اکثر کودهای

شیمیایی سازگار بوده و قابل اختلاط می‌باشند، در آب به خوبی حل شده و می‌توان آن‌ها را از طریق محلول پاشی، مصرف خاکی و سیستم‌های آبیاری تحت فشار مورد استفاده قرار داد [۲۲]. نقش اسید فولویک در گیاه مشابه اسید هیومیک است. اسید فولویک فعال‌ترین ترکیب هیومیکی بوده و باعث حل شدن مواد معدنی در آب شده و به راحتی عناصر غذایی را از طریق یک کمپلکس به گیاه منتقل می‌نماید. قدرت کلات‌کنندگی اسید فولویک در خاک منحصر به فرد است. همچنین اسید فولویک می‌تواند ویتامین‌ها، ایزوآنزیم‌ها، هورمون‌ها و آنتی‌بیوتیک‌های طبیعی را در خود حل نموده و از این طریق باعث بهبود رشد و نمو گیاه گردد [۲۲]. اثر سطوح مختلف اسید هیومیک (صفر، ۵۰۰، ۱۰۰۰، ۲۰۰۰ و ۴۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر) بر خصوصیات کمی و کیفی گیاه دارویی همیشه‌بهار (*Calendula officinalis* L.) مطالعه و گزارش شد که بیشترین مقدار عملکرد زیستی، ارتفاع و تعداد گل و برگ در بوته در تیمار ۲۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر اسید هیومیک حاصل شد [۱۸].

کودهای زیستی ماده‌ای شامل انواع مختلف ریز موجودات آزاد زی بوده که توانایی تبدیل عناصر غذایی اصلی را از فرم غیرقابل دسترس به فرم قابل دسترس دارند. برخی از این ریز موجودات اثرات مفیدی در بهبود رشد گیاه دارند و از آن‌ها تحت عنوان ریزوباکترهای محرک رشد گیاه یاد می‌شود [۱]. در یک پژوهش اثر کودهای زیستی مختلف بر خصوصیات کمی و کیفی گیاه دارویی سرخارگل (*Echinacea angustifolia*) بررسی و گزارش شد که بیشترین ترکیبات فنولی ریشه در تیمار ترکیبی بیوسولفور و بیوفسفر حاصل شد [۱۵].

میکوریزا از مهم‌ترین موجودات همزیست با گیاهان هستند و تقریباً در تمام اکوسیستم‌های خشکی حضور دارند. میکوریزا ضمن بهبود جذب عناصر غذایی به‌ویژه فسفر، باعث بهبود ساختار خاک و افزایش مقاومت به تنش‌های محیطی می‌شود [۱۶]. جهان و همکاران [۱۳] اثر کاربرد همزمان میکوریزا (*Glomus intraradices*) و باکتری‌های آزاد زی تثبیت‌کننده نیتروژن (*Azospirillum brasilense* و *Azotobacter paspali*) را در نظام‌های زراعی رایج و اکولوژیک بررسی و گزارش کردند که بیشترین سرعت فتوسنتز و شاخص کلروفیل ذرت (*Zea mays* L.) در تلقیح همزمان میکوریزا و باکتری به دست آمد. ترکیبات ثانویه موجود در گیاهان، ترکیباتی هستند که نقش چندانی در فرآیندهای اصلی گیاه، مانند فتوسنتز و تنفس ندارند. اغلب این متابولیت‌ها در برخی از اندام‌ها و بافت‌های گیاهی سنتز، ذخیره و نهایتاً ترشح می‌شوند. از مهم‌ترین ترکیبات ثانویه به سه گروه مهم آلکالوئیدها، تریپن‌ها و فنول‌ها می‌توان اشاره کرد. قناعت [۹] طی یک پژوهش در گاوزبان ایرانی، ۲۸ ترکیب ثانویه را جداسازی و شناسایی کرد که مهم‌ترین آن‌ها اسپاتولئول، آلفاپینن و دی جرمکین بودند. این گیاه دارای ۳ تا ۵ درصد موسیلاژ، ۰/۱۵ درصد فلاونوئید و ۱۳/۴۳ درصد آنتوسیانین به همراه آگلیکون دلفینیدین و سیانیدین است و به مقدار ناچیز آلکالوئید دارد [۱۱].

علیرغم تحقیقات گسترده‌ای که در مورد تأثیر اسیدهای آلی و کودهای بیولوژیک بر گیاهان زراعی انجام شده، اطلاعات موجود در مورد اثر این نهاده‌ها بر بسیاری از گیاهان دارویی اندک است، لذا با توجه به مصرف بی‌رویه کودهای شیمیایی، همچنین نظر به اهمیت گاوزبان ایرانی به‌عنوان یکی از مهم‌ترین محصولات دارویی که در بسیاری از صنایع داروسازی، آرایشی و بهداشتی کاربرد دارد، این پژوهش با هدف ارزیابی اثرات اسیدهای آلی، دو گونه میکوریزا و ریزوباکترهای محرک رشد گیاه بر عملکرد کمی و برخی خصوصیات فیتوشیمیایی گل و دانه گاوزبان ایرانی در یک نظام زراعی کم‌نهاده انجام گرفت.

### بخش تجربی

این پژوهش در دو سال زراعی متوالی ۹۱-۱۳۹۰ و ۹۲-۱۳۹۱ در مزرعه‌ی تحقیقاتی دانشکده‌ی کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد در زمینی به مساحت حدود ۵۰۰ مترمربع در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی با سه تکرار انجام شد. تیمارهای آزمایش شامل هفت نوع اصلاح‌کننده‌ی خاک و کود بیولوژیک مختلف نظیر ۱- اسید هیومیک، ۲- اسید فولویک، ۳- نیتروکسین (حاوی باکتری‌های *Azotobacter* spp. و *Azospirillum* spp.)، ۴- بیوفسفر (حاوی باکتری‌های *Bacillus* sp. و *Pseudomonas* sp.)، ۵- بیوسولفور (حاوی باکتری‌های *Acidithiobacillus* spp.)، ۶ و ۷ به ترتیب میکوریزا حاوی قارچ

*Glomus mosseae* و حاوی قارچ *Rhizopagus intraradices* بودند، ضمن اینکه عدم استفاده از کود به عنوان تیمار شاهد مدنظر قرار گرفت.

قبل از انجام آزمایش‌های مزرعه‌ای، به منظور تعیین خصوصیات فیزیکی و شیمیایی خاک، از عمق صفر تا ۳۰ سانتی‌متری خاک محل آزمایش نمونه برداری انجام گرفت و خصوصیات فیزیکی و شیمیایی آن تعیین شد.

جهت آماده‌سازی زمین با تأکید بر عملیات زراعی اکولوژیک، خاک‌ورزی حداقل انجام شد، به این ترتیب که پس از انجام دیسک سبک، کرت‌های آزمایشی با ابعاد  $4/80 \times 2/50$  متر ایجاد شدند. به منظور تلقیح میکوریزا، خاک حاوی این قارچ‌ها به میزان ۲۰ گرم به ازای هر بوته در هنگام کاشت زیر بذور قرار داده شد. بذرها را گاو زبان ایرانی با منشأ توده‌ی مشهد از مزرعه‌ی تحقیقاتی دانشکده‌ی کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد تهیه و اواخر فروردین‌ماه ۱۳۹۱ در ردیف‌هایی به فاصله‌ی ۵۰ سانتی‌متر و با فاصله‌ی روی ردیف ۴۰ سانتی‌متر از یکدیگر کشت شدند. همزمان با کاشت و به منظور اعمال کودهای بیولوژیک (نیتروکسین، بیوفسفر و بیوسولفور)، میزان دو لیتر در هکتار از این کودها با بذرها در یک کرت‌های آزمایشی بسته به تیمار آزمایشی مربوطه آغشته شدند، ضمن اینکه در هر دو سال زراعی مورد مطالعه، این کودها در مرحله‌ی شش تا هفت برگی همراه با آب آبیاری به کرت‌های مربوطه اضافه گردیدند.

اولین آبیاری بلافاصله پس از کاشت و آبیاری‌های بعدی به فاصله هر ۷ روز یکبار تا آخر فصل رشد به روش نشتی انجام شد. به دلیل کودی بودن ماهیت تیمارها و جلوگیری از اختلاط تیمارها با هم، برای هر بلوک آزمایشی یک لوله‌ی آبیاری جداگانه در نظر گرفته شد. کاربرد اسیدهای آلی در دو نوبت به صورت محلول‌پاشی روی برگ‌ها در مراحل شش تا هفت برگی و قبل از گلدهی انجام گرفت و در دومین سال زراعی (۹۲-۱۳۹۱) نیز همین میزان کود در اختیار گیاه قرار گرفت. محلول‌پاشی به هنگام غروب آفتاب و توسط پمپ دستی با حجم پاشش ۴۰۰ لیتر در هکتار انجام شد. اسید هیومیک و اسید فولویک مورد استفاده در آزمایش، به ترتیب با نام‌های تجاری پوهوموس و فولویتال، گرانول قابل حل در آب با منشأ معدنی (کشور آلمان) بودند.

برای رسیدن به تراکم مناسب، پس از رسیدن گیاه به مرحله‌ی ۴ برگی عملیات تنک کردن انجام گرفت. به منظور کنترل علف‌های هرز، تنها سه نوبت وجین دستی در سال اول (به ترتیب ۱۵، ۳۰ و ۴۵ روز پس از کاشت) و یک نوبت وجین دستی در سال دوم (۳۰ روز پس از رشد مجدد گیاه در سال دوم) انجام شد.

در سال زراعی دوم (۹۲-۱۳۹۱)، از ابتدا تا انتهای فصل گلدهی، گل‌های تمام سطح کرت‌های آزمایشی به صورت روزانه برداشت و وزن تر و خشک گل‌ها اندازه‌گیری شد. به منظور حفظ کیفیت مواد مؤثره‌ی گیاه، نمونه‌های گل در سایه و در درجه حرارت محیط خشک شدند. جهت تعیین ترکیبات ثانویه و مواد مؤثره‌ی گل‌ها، از هر یک از تیمارهای آزمایشی مقدار ۵۰ گرم گل خشک شده به آزمایشگاه منتقل و توسط دستگاه سوکسله عصاره‌گیری و در نهایت میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی، درصد فنول کل، درصد فلاونوئید کل و میزان آنتوسیانین کل آن تعیین شد. میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی با استفاده از روش به دام‌اندازی رادیکال دی‌فنیل پیکریل هیدرازیل (DPPH)<sup>۱</sup> تعیین شد [۲۳]. به منظور تعیین محتوای ترکیبات فنولی از روش فولین سیوکیوکالتیو<sup>۲</sup> استفاده شد [۲۱]. محتوای فلاونوئید کل با استفاده از روش رنگ‌سنجی تعیین گردید (چانگ ۲۰۰۲). روش اختلاف pH<sup>۳</sup> برای تعیین میزان آنتوسیانین کل مورد استفاده قرار گرفت [۱۹].

در اواخر فصل رشد، با آغاز مرحله‌ی رسیدگی دانه‌ها و خشک شدن اندام هوایی گیاه، مقداری از بذور هر کرت آزمایشی برای تعیین درصد روغن و پروتئین دانه به آزمایشگاه ارسال شد. روغن دانه با استفاده از روش استخراج گرم AOAC Official Method 972.28 (41.1.22) و پروتئین دانه به روش AOAC Official Method 968.06 (4.2.04) بر اساس تعیین نیتروژن به روش کج‌لدال و با استفاده از دستگاه Semi-Automated Distillation Unit انجام شد.

1. Diphenyl Picrylhydrazyl  
2. Folin-Ciocalteu  
3. pH Different Method

تجزیه و تحلیل واریانس داده‌ها (ANOVA) و ترسیم نمودارها با استفاده از نرم‌افزارهای SAS Ver. 9.1، MS Excel، Ver. 11 و Slide Write Ver. 2 و 11 و مقایسه‌ی میانگین‌ها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن و در سطح احتمال ۵ درصد انجام شد.

### نتایج و بحث

میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی و فنول کل

اسیدهای آلی و کودهای بیولوژیک مختلف به‌طور معنی‌داری بر میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی و فنول کل تأثیر داشت (جدول ۱). کودهای بیولوژیک بیوفسفر و بیوسولفور میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی را به ترتیب ۸ و ۷ درصد نسبت به شاهد افزایش دادند (جدول ۲). بیشترین میزان فنول کل (۷۴ میلی‌گرم گالیک اسید در گرم وزن خشک گل) در نتیجه‌ی کاربرد بیوسولفور به دست آمد، به‌طوری‌که میزان فنول کل در این تیمار ۴۲ درصد بیشتر از شاهد بود (جدول ۲). کودهای نیتروکسین و میکوریزا (*Rhizophagus intraradices*) نیز به ترتیب افزایش ۳۱ و ۳۶ درصدی میزان فنول کل را در مقایسه با شاهد در پی داشتند (جدول ۲). یکی از شیوه‌های بیولوژیکی برای افزایش تولید در کشاورزی، استفاده‌ی بالقوه از میکروارگانیسم‌های مفید خاک‌زی است که به طرق مختلف باعث افزایش رشد و عملکرد گیاه می‌شوند. این میکروارگانیسم‌ها با برقراری کنش متقابل با ریشه گیاهان در ریزوسفر، سبب بروز فواید بسیاری می‌شوند [۱]. کودهای بیولوژیک از طریق مکانیسم‌های مختلفی نظیر افزایش دسترسی به نیتروژن به‌وسیله تثبیت نیتروژن، آزاد کردن متابولیت‌ها، تولید هورمون‌های گیاهی نظیر اکسین [۱۵]، افزایش جذب آب و مواد غذایی و کنترل بیولوژیک پاتوژن‌های خاک‌زاد باعث بهبود رشد گیاه می‌شوند.

میکوریزا احتمالاً از طریق بهبود جذب و انتقال عناصر غذایی و تولید متابولیت‌ها و هورمون‌های گیاهی نظیر اکسین باعث افزایش رشد گیاه [۱۶] می‌شود. گوپتا و همکاران [۱۰] پس از بررسی اثر میکوریزا بر خصوصیات کمی و کیفی گیاه دارویی نعناع (*Mentha arvensis*) گزارش کردند که کلونیزاسیون ریشه تحت تأثیر تلقیح با این قارچ بهبود یافت و در نتیجه خصوصیات رشدی، عملکرد ماده‌ی خشک و محتوی اسانس گیاه از افزایش قابل‌توجهی در مقایسه با شاهد برخوردار شدند.

# اولین کنفرانس ملی شیمی کاربردی و نانو شیمی



## از پژوهش تا فناوری

۲۴-۲۳ آبان ۱۳۹۷ - گناباد، ایران

جدول ۱- تجزیه واریانس (میانگین مربعات) برخی ویژگی‌های کیفی گاوزبان ایرانی تحت تأثیر اسیدهای آلی و کودهای بیولوژیک مختلف

میانگین مربعات						
درجه آزادی	میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی	میزان فنول کل	میزان فلاونوئید کل	میزان آنتوسیانین کل	روغن دانه	پروتئین دانه
۲	۶۳/۹۶**	۳۸/۸۱ns	۳۱۶۲**	۰/۰۰۰۰۰۱ns	۷/۴۰ns	۵/۴۰ns
۷	۱۷۹/۰۷**	۵۲۶/۰۶**	۲۸۹۸۴**	۰/۰۰۰۰۰۲**	۱۵/۱۰*	۹/۴۵**
۱۴	۸/۸۵	۱۶/۸۰	۲۶۹/۸۳	۰/۰۰۰۰۰۱	۴/۵۱	۱/۶۸
-	۱۳/۷۹	۱۷/۸۱	۱۶/۵۲	۱۸/۸۹	۱۵/۵۷	۱۷/۳۸

\*\*\*، \*\*، \* و ns به ترتیب معنی‌داری در سطح احتمال ۱ و ۵ درصد و عدم معنی‌داری می‌باشد.

جدول ۲- مقایسه میانگین برخی ویژگی‌های کیفی گاوزبان ایرانی تحت تأثیر اسیدهای آلی و کودهای بیولوژیک مختلف

میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی (mg/ml)	میزان فنول کل (mg GAE/g flower DW)	میزان فلاونوئید کل (mg QE/100g flower DW)	میزان آنتوسیانین کل (mg/g flower DW)	روغن دانه (%)	پروتئین دانه (%)	
۶۴/۱۸e	۳۷/۱۴d	۲۵۳/۸۸c	۰/۰۰۵۵a	۱۹/۱۵b	۹/۳۱c	اسید هیومیک
۸۱/۲۷bc	۴۰/۴۲d	۲۸۹/۹۹b	۰/۰۰۵۱ab	۱۸/۵۱b	۹/۶۶c	اسید فولویک
۷۹/۰۶c	۶۱/۶۹b	۱۵۸/۲۲e	۰/۰۰۴۸b	۱۸/۷۳b	۸/۱۱de	نیتروکسین
۸۷/۲۴a	۴۸/۰۳c	۳۸۷/۴۱a	۰/۰۰۳۰c	۱۸/۶۵b	۹/۴۹c	بیوفسفر
۸۶/۰۴ab	۷۳/۷۸a	۳۹۵/۱۱a	۰/۰۰۳۴c	۲۱/۸۵a	۱۱/۲۹a	بیوسولفور
۷۹/۸۳c	۵۰/۱۰c	۲۰۴/۵۷d	۰/۰۰۳۷c	۲۱/۳۶a	۱۰/۴۶ab	<i>Glomus mosseae</i>
۷۰/۳۳d	۶۶/۰۸b	۱۶۰/۲۹e	۰/۰۰۳۳c	۱۹/۹۷b	۸/۹۲cd	<i>Rhizophagus intraradices</i>
۸۰/۲۶c	۴۲/۵۸cd	۱۶۳/۰۴e	۰/۰۰۳۴c	۱۷/۰۴c	۷/۳۱e	شاهد

در هر ستون، میانگین‌های دارای حداقل یک حرف مشترک، در سطح احتمال ۵ درصد، با یکدیگر تفاوت معنی‌داری ندارند.

در یک پژوهش اثر کودهای زیستی مختلف بر خصوصیات کمی و کیفی گیاه دارویی سرخارگل بررسی و گزارش شد که بیشترین ترکیبات فنولی ریشه در تیمار ترکیبی بیوسولفور و بیوفسفر حاصل شد [۲]. پاسخ آنتی‌اکسیدانی، فرآیندی مهم برای حفاظت گیاهان در مقابل آسیب‌های اکسیداتیوی است که در اثر طیف وسیعی از تنش‌های محیطی شامل شوری، خشکی، فلزات سنگین، سرما و کمبود عناصر غذایی خاک ایجاد می‌شود [۱۷]، بنابراین به نظر می‌رسد که نهادهای بوم‌سازگار مورد مطالعه احتمالاً از طریق تأمین عناصر غذایی کافی و همچنین افزایش ظرفیت نگهداری آب تنش‌های محیطی را کاهش داده و در نتیجه با کاربرد آنها میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی گیاه افزایش یافته است. در برخی مطالعات به نقش اسیدهای آلی و کودهای بیولوژیک در کاهش جمعیت پاتوژن‌ها و بیماری‌های خاکزاد اشاره شده است و از آنجاییکه میزان ترکیبات فنولیک در بوته‌های سالم بیشتر از بوته‌های بیمار است [۴]، به نظر می‌رسد نهادهای اکولوژیک مورد مطالعه از این طریق منجر به افزایش میزان فنول کل شدند.

### میزان فلاونوئید کل و آنتوسیانین کل

اثر اسیدهای آلی و کودهای بیولوژیک مختلف بر میزان فلاونوئید کل و آنتوسیانین کل معنی‌دار بود (جدول ۱). اسیدهای آلی هیومیک و فولویک به ترتیب منجر به افزایش ۳۶ و ۴۴ درصدی میزان فلاونوئید کل نسبت به شاهد شدند، ضمن این‌که میزان آنتوسیانین کل نیز در شرایط استفاده از اسید هیومیک و اسید فولویک به ترتیب ۳۸ و ۳۳ درصد نسبت به شاهد ارتقاء پیدا کرد (جدول ۲). کودهای بیولوژیک بیوسولفور و بیوسولفور به ترتیب افزایش ۵۸ و ۵۹ درصدی میزان فلاونوئید کل را در مقایسه با شاهد سبب شدند (جدول ۲). میزان فلاونوئید کل تحت تأثیر کود میکوریزا (*Glomus mosseae*) ۲۰ درصد نسبت به شاهد افزایش یافت (جدول ۲). کود بیولوژیک نیتروکسین افزایش ۲۹ درصدی میزان آنتوسیانین کل را در مقایسه با شاهد در پی داشت (جدول ۲).

آنزیم فنیل آلانین آمونیا لایز به عنوان اولین آنزیم در مسیر فنیل پروپانوئید موجب تبدیل فنیل آلانین به ۴- کوماریل کوآنزیم A می‌شود که این ترکیب پیش‌ساز فعال در تولید ترکیبات فلاونوئیدی است و از طرفی فنیل آلانین آمونیا لایز و کالون سینتاز هر دو در مسیر بیوسنتز آنتوسیانین‌ها استفاده می‌شوند [۶]، لذا به نظر می‌رسد نهادهای اکولوژیک مورد مطالعه احتمالاً از طریق مکانیسم‌هایی نظیر انحلال ویتامین‌ها، ایزوآنزیم‌ها، هورمون‌ها و آنتی‌بیوتیک‌های طبیعی [۲۲] و افزایش مقاومت گیاه به تنش‌های محیطی [۱۶]، سنتز آنزیم فنیل آلانین آمونیا لایز را فعال و در نتیجه منجر به افزایش میزان فلاونوئید و آنتوسیانین در گاو زبان ایرانی شدند.

یکی از راهکارهای مؤثر در زمینه‌ی بهبود فراهمی و افزایش دسترسی به این عنصر پرمصرف، تلقیح گیاه با چارج میکوریزا می‌باشد. برخی محققان [۳، ۱۴] گزارش کردند که به دلیل کمبود گوگرد، سنتز برخی پروتئین‌ها و ویتامین‌های ضروری گیاهان با مشکل مواجه می‌شود، از این رو استفاده از نهادهای گوگردی بوم‌سازگار نظیر گوگرد گرانوله برای بهبود خصوصیات کمی و کیفی گیاهان ضروری به نظر می‌رسد. همچنین گزارش شده است که مصرف گوگرد و تولید اسید سولفوریک حاصل از اکسایش آن، باعث کاهش pH خاک و افزایش دسترسی فسفر می‌شود [۲۵].

### میزان روغن و پروتئین دانه

اثر اسیدهای آلی و کودهای بیولوژیک بر میزان روغن و پروتئین دانه معنی‌دار بود (جدول ۱)، به طوری که تمامی کودهای مورد مطالعه منجر به افزایش روغن و پروتئین دانه شدند، که البته بیشترین میزان روغن (۲۲ درصد) و پروتئین دانه (۱۱ درصد) در نتیجه‌ی کاربرد بیوسولفور به دست آمد (جدول ۲). اسیدهای آلی هیومیک و فولویک روغن دانه را به ترتیب ۱۱ و ۸ درصد و پروتئین دانه را به ترتیب ۲۱ و ۲۴ درصد نسبت به شاهد افزایش دادند، کودهای بیولوژیک نیتروکسین، بیوسولفور و بیوسولفور به ترتیب افزایش ۹، ۹ و ۲۲ درصدی روغن دانه و افزایش ۱۰، ۲۳ و ۳۵ درصدی پروتئین دانه را نسبت به شاهد

سبب شدند، هر دو میکوریزای مورد مطالعه (*Rhizophagus intraradices* و *Glomus mosseae*) به ترتیب افزایش ۲۰ و ۱۵ درصدی روغن دانه و افزایش ۳۰ و ۱۸ درصدی پروتئین دانه را در مقایسه با شاهد به همراه داشتند (جدول ۲). بین دو سال زراعی از نظر میزان روغن دانه تفاوت معنی داری وجود نداشت، ولی میزان پروتئین دانه در سال زراعی سوم ۶ درصد بیشتر از سال زراعی دوم بود (جدول ۲). بیشترین میزان روغن دانه در سال‌های زراعی دوم و سوم به ترتیب در تیمارهای بیوسولفور و میکوریزا (*Glomus mosseae*) به دست آمد، ضمن این‌که در هر دو سال زراعی تیمار بیوسولفور دارای بیشترین میزان پروتئین دانه بود (جدول ۲). کودهای هیومیکی با اکثر کودهای شیمیایی سازگار بوده و قابل اختلاط می‌باشند، در آب به خوبی حل شده و می‌توان آن‌ها را از طریق محلول پاشی، مصرف خاکی و سیستم‌های آبیاری تحت فشار مورد استفاده قرار داد. تأثیر این کودها بر رشد گیاه ممکن است به صورت مستقیم (افزایش کل وزن خشک گیاه) و یا به صورت غیرمستقیم (افزایش راندمان مصرف کود و کاهش فشردگی خاک) باشد [۲۲].

مهم‌ترین نقشی که گوگرد در گیاهان ایفا می‌کند شرکت در ساخت اسیدهای آمینه ضروری سیستین، سیتین و متیونین است، بنابراین نقش اساسی در سنتز پروتئین ایفا نموده و حضور گوگرد و استفاده از تیوباسیلوس برای جذب بهتر این عنصر باعث افزایش پروتئین دانه می‌گردد. باکتری‌های موجود در کود بیولوژیک بیوسولفور با اکسایش گوگرد، می‌توانند در اصلاح خاک، تأمین سولفات مورد نیاز گیاه، انحلال برخی از عناصر غذایی و افزایش قابلیت جذب آن‌ها مؤثر واقع شوند و احتمالاً از این طریق منجر به بهبود خصوصیات کمی و کیفی گاو زبان ایرانی شدند. به نظر می‌رسد باکتری‌های موجود در بیوسفتر احتمالاً با انحلال فسفات نامحلول و افزایش مقدار فسفر در دسترس گیاه، باعث افزایش تثبیت نیتروژن شده [۲۰] و با توجه به نقش کلیدی عنصر نیتروژن در میزان پروتئین دانه، از این طریق منجر به افزایش پروتئین دانه شده است. در یک پژوهش گزارش شد که اسید هیومیک در افزایش جذب فسفر، افزایش مقادیر رنگدانه‌های فتوسنتزی و بهبود عملکرد و اجزای عملکرد گیاه دارویی چای ترش (*Hibiscus sabdariffa* L.) مؤثر بود [۱۲]. برخی محققان اثر بیوسولفور را در بهبود عملکرد روغن و پروتئین دانه‌ی کنجد [۸] و پروتئین دانه‌ی گندم (*Triticum aestivum*) [۲۴] مثبت گزارش کردند.

### نتیجه‌گیری

به طور کلی، نتایج این آزمایش نشان داد که میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی تحت تأثیر تیمارهای بیوسفتر و بیوسولفور نسبت به شاهد افزایش یافت. کودهای نیتروکسین، بیوسولفور و میکوریزا (*Rhizophagus intraradices*) میزان فنول کل را در مقایسه با شاهد افزایش دادند و تیمارهای اسید هیومیک و اسید فولویک از میزان آنتوسیانین کل بیشتری نسبت به شاهد برخوردار بودند، ضمن این‌که تمامی نهادهای اکولوژیک مورد مطالعه به جز نیتروکسین و میکوریزا (*Rhizophagus intraradices*) افزایش میزان فلاونوئید کل را در مقایسه با شاهد سبب شدند. به طور کلی با توجه به نتایج آزمایش، به نظر می‌رسد که با استفاده از اسیدهای آلی و کودهای بیولوژیک می‌توان ضمن بهبود عملکرد کیفی گل و دانه گاو زبان ایرانی، سلامت محصول و محیط‌زیست را تضمین کرد و خسارات ناشی از نهادهای شیمیایی را به حداقل رساند.

### مراجع

- [1] C. Abdul Jaleel, P. Manivannan, B. Sankar, A. Kishorekumar, R. Gopi, R. Somasundaram and R. Panneerselvam. *Pseudomonas fluorescens* enhances biomass yield and ajmalicine production in *Catharanthus roseus* under water deficit stress. (2007) *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 60:7-11.
- [2] M. Agha Alikhani, A. Iranpoor and H. Naghdibadi. Variation of agronomic and phytochemistry of *Echinacea purpurea* (L.) Moench affected by urea and biofertilizer. (2013) *Journal of Medicinal Plant*, 12: 121-138. (In Persian).
- [3] R. Anandham, R. Sridar, P. Nalayini, S. Poonguzhali, M. Madhaiyan and S. Tongmin. Potential for plant growth promotion in groundnut (*Arachis hypogaea* L.) cv. ALR-2 by co-inoculation of sulfur-oxidizing bacteria and Rhizobium. (2007) *Microbiological Research*, 162: 139-153.

- [4] T. Anjum, S. Fatima and S. Amjad. Physiological changes in wheat during development of loose smut. (2012) *Trop Plant Pathol*, 37: 102-107.
- [5] Y.L. Chang. Vitamin C equivalent antioxidant capacity (VCEAC) of phenolic phytochemicals. (2002) *Journal Agricultural Food Chemistry*, 50: 3713-3717.
- [6] L. Clive, S. Sze-Chung and R. Nicholson. Reduction of light induced anthocyanin accumulation in inoculated sorghum mesocotyls implication for a compensatory role in the defense response. (1998) *Plant Physiology*, 116: 979-989.
- [7] D. Egamberdiyeva. Plant-growth-promoting rhizobacteria isolated from a Calcisol in a semi-arid region of Uzbekistan: Biochemical characterization and effectiveness. (2005) *Journal of the Plant Nutrition and Soil Science*, 168: 94-99.
- [8] S.F. El-Habbasha, M.S. Abdel Salam and M.O. Kabesh. Response of two sesame varieties (*Sesamum indicum* L.) to partial replacement of chemical fertilizers by bio-organic fertilizers. Research (2007) *Journal of Agriculture and Biology Sciences*, 3: 563-571.
- [9] J. Ghenaat. Isolation and study of quantitative and qualitative ingredients aromatic essential oils of several plant species of the Boraginaceae family. (2006) *M.S. Thesis of Mazandaran University*. (In Persian).
- [10] M.L. Gupta, A. Prasad, M. Ram and S. Kumar. Effect of the vesicular-arbuscular mycorrhizal (VAM) fungus *Glomus fasciculatum* on the essential oil yield related characters and nutrient acquisition in the crops of different cultivars of menthol mint (*Mentha arvensis*) under field conditions. (2002) *Bioresource Technology*, 81: 77-79.
- [11] E.M. Hamidi, M. Khaksari and Kh. Hojabri. The effects of aqueous extracts of *Echium amoenum* and *Citrus aurantifolia* on blood pressure and heart rate before and after phenylephrine injection in rat. (2011) *Journal of Kerman University of Medical Science*, 18: 349-357. (In Persian).
- [12] M. Heidari and S. Khalil. Effect of humic acid and phosphorus fertilizer on seed and flower yield, photosynthetic pigments and mineral elements concentration in sour tea (*Hibiscus sabdariffa* L.). (2014) *Iranian Journal of Field Crop Science*, 45: 191-199. (In Persian).
- [13] M. Jahan, A. Koocheki and M. Nasiri Mahallati. The effects of arbuscular mycorrhizal fungus and free living nitrogen fixing bacteria on growth, photosynthesis and yield of corn. (2007) *Iranian Journal of Field Crops Research*, 5: 53-67. (In Persian).
- [14] M.A. Kertesz and K. Mirleau. The role of soil microbes in plant sulfur nutrition. (2004) *Journal of Experimental Botany*, 55: 1-7.
- [15] R. Kizilkaya. Yield response and nitrogen concentrations of springwheat inoculated with *Azotobacter chroococcum* strains. (2008) *Ecological Engineering*, 33: 150-156.
- [16] A. Marulanda, R. Porcel, J.M. Barea and R. Azcon. Drought tolerance and antioxidant activities in laundier plants colonized by native drought-tolerant of drought-sensitive *Glomus* species. (2007) *Microbial Ecology*, 54: 543-552.
- [17] R. Mittler, S. Vanderauwera, M. Gollery and F. Vanbreusegem. Reactive oxygen network of plants. (2004) *Trends Plant Science*, 9: 490-498.
- [18] E. Mohammadipour, A. Golchin, J. Mohammadi, N. Negahdar and M. Zarchini. Effecto of humic acid on yield and quality of marigold. (2012) *Annals of Biological Research*, 3: 5095-5098.
- [19] F.N. Muanda, R. Soulimani, B. Diop and A. Dicko. 2011. Study on chemical composition and biological activities of essential oil and extracts from *stevia rebaudiana* Bertoni leaves. (2011) *Journal of Food Science and Technology*, 44: 1865-1872.
- [20] M. Olivera, C. Iribarne and C. Liuch. Effect of phosphorus on nodulation and N<sub>2</sub> fixation by bean (*Phaseolus vulgaris*). (2002) *Proceedings of the 15<sup>th</sup> international Meeting on Microbial Phosphate Solubilization*. Salamanca University, 16-19 July, Salamanca, Spain.
- [21] A.A.L. Ordone. Antioxidant activities of *sechium edule* swartz extracts. (2008) *Journal Agricultural Food Chemistry*, 97: 452-458.
- [22] S. Samavat and M. Malakooti. The necessity of using organic acids to increase the quality and quantity of agricultural products. Technical Journal, 463. (2005) *Sana Press, Tehran*. (In Persian).
- [23] K. Shimada, K. Fujikawa, K. Yahara and T. Nakamura. Antioxidative properties of xanthin on autoxidation of soybean oil in *cyclodextrin emulsion*. (1992) *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 40: 945-948.
- [24] D.B. Shinde, R.M. Kadam and A.C. Jadhav. Effect of sulfur oxidizing micro-organism on growth of soybean. (2004) *Journal of Maharashtra Agriculture University*, 29: 305-307.
- [25] F. Zapata and R.N. Roy. 2004. Use of phosphate rocks for sustainable agriculture. (2004) *Publication of the FAO Land and Water Development Division*, Pp: 117 - 122.