

10.22092/ijmapr.2022.359419.3210

شناسه دیجیتال (DOI):

نشریه علمی تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران

20.1001.1.17350905.1402.39.1.8.3

شناسه دیجیتال (DOR):

جلد ۳۹، شماره ۱، صفحه ۱۲۱-۱۰۶ (۱۴۰۲)

## تأثیر اسید هیومیک و نانوذرات دی اکسید تیتانیوم بر برخی ویژگی های فیتوشیمیایی و شاخص های رشد *Withania coagulans* (Stocks) Dunal

محمد رضا ریگی<sup>۱\*</sup> و محرم ولی زاده<sup>۲</sup><sup>۱\*</sup> - نویسنده مسئول، استادیار، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، مجتمع آموزش عالی سراوان، سراوان، ایران

پست الکترونیک: mr.rigi@saravan.ac.ir

<sup>۲</sup> - استادیار، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، مجتمع آموزش عالی سراوان، سراوان، ایران

تاریخ پذیرش: آذر ۱۴۰۱

تاریخ اصلاح نهایی: آذر ۱۴۰۱

تاریخ دریافت: تیر ۱۴۰۱

### چکیده

گیاه دارویی پنیرباد (*Withania coagulans* (Stocks) Dunal) از تیره سیب زمینیان، گونه ای است چندمنظوره که از نظر پراکنش در ایران نیز منحصراً در مناطق محدودی از رویشگاه های طبیعی استان سیستان و بلوچستان دیده می شود. اندام های مختلف این گیاه دارای اثرات بیولوژیک آنتی اکسیدانی، ضد میکروبی و ضد تومور است. به منظور بررسی تأثیر اسید هیومیک و نانوذرات دی اکسید تیتانیوم بر میزان ترکیب های فیتوشیمیایی و همچنین برخی پارامترهای رشد این گیاه، آزمایشی گلدانی به صورت فاکتوریل بر پایه طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار اجرا شد. عوامل آزمایشی شامل اسید هیومیک در چهار سطح (H0: صفر، H1: ۱۰ و H2: ۳۰ گرم در کیلوگرم خاک) و نانو ذرات دی اکسید تیتانیوم در سه سطح (T0: صفر، T1: ۴۵ و T2: ۹۰ میلی گرم در لیتر) بودند. نتایج نشان داد که تیمار H2T2 سبب افزایش معنی دار وزن تر، وزن خشک، تعداد شاخه جانبی، ارتفاع، فسفر، پتاسیم و محتوی نسبی آب نسبت به شاهد گردید. با افزایش میزان اسید هیومیک تا ۳۰ گرم، میزان فنل از ۴۸/۵۹ در H0 به ۳۹/۸۸ میلی گرم بر گرم وزن تر در H2 کاهش یافت. در تیمار T2، میزان فنل به میزان ۲/۳۷٪ نسبت به T0 افزایش یافت که دارای اختلاف معنی دار با سایر تیمارها بود. همچنین، روند مشابهی برای پارامترهای فلاونوئیدهای کل و پرولین مشاهده شد. اما افزایش مصرف اسید هیومیک تا ۳۰ گرم سبب افزایش ۷۰/۷۹ درصدی میزان فلورسانس کلروفیل نسبت به شاهد گردید. به طور کلی نتایج حکایت از آن داشت که مصرف توأم اسید هیومیک و نانو ذرات دی اکسید تیتانیوم توانست سبب بهبود پارامترهای رشد و عملکرد گیاهی شود.

واژه های کلیدی: اسید هیومیک، پنیرباد (*Withania coagulans* (Stocks) Dunal)، محتوی فنولی، عملکرد، دی اکسید تیتانیوم.

### مقدمه

گیاه دارویی پنیرباد با نام علمی *Withania coagulans* (Stocks) Dunal متعلق به خانواده Solanaceae به صورت دو پایه بوده و یکی از گونه های اندمیک بلوچستان است. در جنس *Withania*، ۲۳ گونه گیاهی وجود دارد که دو گونه

آن شامل *W. coagulans* و *W. somnifera* از نظر دارویی و اقتصادی حائز اهمیت است و در برخی کشورها مانند هند و پاکستان به طور وسیع کشت می شوند (Panwar & Tarafdar, 2006). گونه *W. coagulans* گونه گیاهی باارزشی است که پراکندگی و رویش آن عمدتاً محدود به



۴۰۰ میلی‌گرم در لیتر اسید هیومیک و آبیاری در حد ظرفیت زراعی حاصل شد (Gorgini Shabankareh *et al.*, 2017). نتایج پژوهشی دیگر نشان داد که کاربرد ۵۰۰، ۱۰۰۰ و ۲۰۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم اسید هیومیک منجر به افزایش طول و قطر ساقه، وزن خشک، میزان عناصر غذایی و عملکرد گیاه فلفل شد (Turkmen *et al.*, 2005). Abedini و همکاران (۲۰۱۵) با بررسی مصرف کود آلی و اسید هیومیک بر عملکرد گیاه همیشه‌بهار نشان دادند که کاربرد ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر اسید هیومیک سبب افزایش ارتفاع، تعداد گل در بوته، عملکرد دانه و وزن هزاردانه نسبت به شاهد گردید.

Goel و Duhan (۲۰۱۴) با بررسی تأثیر کود دامی و کود فسفره بر رشد گیاه پنیرباد به این نتیجه رسیدند که مصرف کود دامی به میزان ۱۲/۵ تن در هکتار در ترکیب با کود فسفره به میزان ۱۲/۵ میلی‌گرم در کیلوگرم خاک بهترین تیمار برای جذب عناصر غذایی توسط ریشه و بیشترین میزان آلکالوئیدها نیز در همین تیمار بدست آمد. Raja و Veerakumari (۲۰۱۳) با بررسی تأثیر ورمی‌کمپوست بر عملکرد و میزان آلکالوئیدهای گیاه پنیرباد بیان کردند که بیشترین میزان رشد اندام هوایی و وزن خشک ریشه و اندام هوایی در تیمار مصرف ورمی‌کمپوست حاصل از کود مرغی بدست آمد.

از راهکارهای افزایش متابولیت‌های ثانویه گیاهی، استفاده از محرک‌های زنده و غیرزنده‌ای است که می‌توانند مسیرهای سنتز متابولیت‌های ثانویه را تحت تأثیر قرار داده و میزان تولید آنها را افزایش دهند (Neumann *et al.*, 2009). یکی از محرک‌های مورد استفاده در این ارتباط نانو ذرات بوده که از این ذرات برای بالا بردن ارزش محصولات کشاورزی و رفع مشکلات محیطی نیز استفاده می‌شود (Reynolds, 2002). در بین نانو ذرات، نانو ذره دی‌اکسید تیتانیوم کاربرد بیشتری دارد. برتری این ترکیب نسبت به سایر ذرات شامل مقاومت شیمیایی بالا، غیر سمی بودن آن، طول عمر بالای این ماده، در دسترس بودن و هزینه کم آن می‌باشد (Sungkaworn *et al.*, 2007). Kamalizadeh

مناطق شرقی مدیترانه تا جنوب آسیا از جمله پاکستان، شمال‌غربی هند، افغانستان و ایران می‌باشد. رویشگاه این گونه گیاهی در ایران محدود به استان سیستان و بلوچستان بوده و به‌طور عمده در اطراف سراوان، خاش، ایرانشهر، نیک‌شهر، قصرقند و سرباز پراکنش دارد (Preethi *et al.*, 2014؛ Valizadeh & Valizadeh, 2011). این گیاه به‌صورت بوته‌ای و همیشه سبز به ارتفاع ۱۲۰-۳۰ سانتی‌متر، برگ‌هایی به رنگ سبز کدر و با جام گلی به رنگ زرد بوده و گل‌های ماده با پرچم‌های رشد نکرده دیده می‌شود. میوه در این گونه از نوع سته و به‌رنگ کرم یا قهوه‌ای روشن است (Ghahreman, 1999). پنیرباد گیاهی است چند منظوره که به‌دلیل داشتن ویژگی تحمل به گرما و خشکی و توانایی استقرار در برخی رویشگاه‌های مختلف، از ظرفیت قابل توجهی در تثبیت شن‌های روان برخوردار است. از نظر فارماکولوژیکی نیز این گونه دارای ترکیب‌های دارویی قابل توجهی است، به‌طوری که قسمت‌های مختلف این گیاه دارای اثرهای آنتی‌اکسیدانی، ضد التهابی، ضد استرس، ضد تومور و ضد میکروبی می‌باشد (Bharti *et al.*, 2012).

امروزه رویکرد روزافزون بشر به استفاده از گیاهان دارویی در سطح جهانی، اهمیت کشت، تولید و فرآوری این گیاهان را افزایش داده است. تحقیقات در زمینه این گیاهان نشان داده که کودهای آلی در کشت گیاهان دارویی، با فراهم کردن عناصر غذایی مورد نیاز آنها، تولید زیست‌توده و ترکیب‌های استخراج شده از این گیاهان را افزایش می‌دهند (Wettasinghe & Shahidi, 2000). Sabouri و همکاران (۲۰۱۸) با بررسی اثر اسید هیومیک بر خصوصیات مورفولوژیکی و فیزیولوژیکی گیاه مرزه، بیان کردند که مصرف ۳۰۰ میلی‌گرم در لیتر اسید هیومیک بیشترین تأثیر را در افزایش پارامترهای رشد مانند ارتفاع گیاهی، وزن تر و خشک داشته و سبب کاهش میزان پرولین شده است. بررسی اثر سطوح مختلف اسید هیومیک بر شاخص‌های رشد گیاه دارویی بادرنجبویه نشان داد که بیشترین مقدار ارتفاع، وزن تر و وزن خشک بوته و قطر ساقه در برهم‌کنش

همکاران (۲۰۱۵) با بررسی تأثیر نانو ذره دی‌اکسید تیتانیوم بر میزان دو ترکیب فنولی رزمارینیک اسید و کلروژنیک اسید در گیاه دارویی بادرشبو، به این نتیجه رسیدند که میزان تولید این دو ترکیب در غلظت‌های کم نانو ذره تا تیمار ۳۰ ppm افزایش یافت. میانگین تولید رزمارینیک اسید و کلروژنیک اسید در گیاه به ترتیب ۱۲/۳۲ و ۵/۴ میکروگرم در گرم عصاره گزارش شده است. Samadi و همکاران (۲۰۱۴) با بررسی اثر دی‌اکسید تیتانیوم و نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم بر جوانه‌زنی، طول ریشه و اندام هوایی و رنگدانه‌های فتوسنتزی گیاه نعنا به این نتیجه دست یافتند که غلظت‌های مختلف دی‌اکسید تیتانیوم و نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم اثر منفی بر جوانه‌زنی و طول ریشه گیاه داشته است. در صورتی که نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم با غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر تأثیر بیشتری از دی‌اکسید تیتانیوم داشته است. بیشترین تأثیر بر میزان رنگدانه‌های فتوسنتزی در مورد دی‌اکسید تیتانیوم در سطح ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر و برای نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم در سطح ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر مشاهده شده است. Ghorbani و همکاران (۲۰۲۱) نشان دادند که مصرف نانو ذرات دی‌اکسید تیتانیوم سبب بهبود ویژگی‌های مورفولوژیکی و فیزیولوژیکی نخود شده است.

تیتانیوم (صفر، ۴۵ و ۹۰ میلی‌گرم در لیتر) هستند. خاک مورد استفاده از زمین‌های مزرعه تحقیقاتی مجتمع آموزش عالی سراوان از عمق ۳۰-۰ سانتی‌متری نمونه‌برداری و بعد از خشک کردن در هوای آزاد، کوبیده و از الک ۲ میلی‌متری عبور داده شد. پس از آماده‌سازی خاک گلدان‌ها، با توجه به وزن خاک برای هر گلدان میزان اسید هیومیک مورد نیاز محاسبه و به خاک اضافه و بعد تعداد ۵ عدد بذر گیاه پنیرباد در عمق یک سانتی‌متر در هر گلدان کشت گردید. آبیاری بلافاصله بعد از کشت و در حد ظرفیت زراعی انجام شد. برای حصول تراکم مناسب، گیاهان پس از استقرار کامل، در مرحله سه برگی تنک و به ۲ عدد در هر گلدان کاهش یافت. برای اعمال تیمار مربوط به نانو ذرات دی‌اکسید تیتانیوم، این ذرات به مدت ۱۵ دقیقه قبل اعمال تیمار به صورت سوسپانسیون در آب استریل آماده شد. یک ماه بعد از تنک کردن گیاه مقادیر در نظر گرفته شده از این سوسپانسیون با فاصله زمانی ۱۰ روزه به مدت یک ماه بر روی گیاه اسپری شد. در کل محلول‌پاشی ۳ مرحله انجام گردید و برای دقت کار در موقع اسپری نیز گیاهان اطراف با پوشش پلاستیکی پوشانده شدند.

پس از گذشت ۱۲۰ روز از کاشت، ارتفاع گیاه و تعداد ساقه فرعی اندازه‌گیری و گیاه از سطح هر گلدان برداشت و پس از جداسازی ریشه و اندام هوایی، وزن تر اندازه‌گیری شد. نمونه‌های گیاهی به صورت جداگانه در داخل آون با دمای ۷۵ درجه سلسیوس به مدت ۷۲ ساعت خشک و وزن ماده خشک اندام هوایی توسط ترازوی دیجیتالی اندازه‌گیری شد. برخی ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی خاک مورد استفاده در آزمایش به شرح جدول ۱ است. بافت خاک به روش هیدرومتری (Bouyoucos, 1997)، pH در گل اشباع به وسیله pH متر (Richards, 1954)، قابلیت هدایت الکتریکی با هدایت‌سنج الکتریکی (Rhoades, 1982)، ماده آلی به روش تر سوزانی (Walkley & Black, 1934)، کربنات کلسیم معادل (Richards, 1954)، فسفر قابل استفاده به روش اولسن (Olsen et al., 1954) و پتاسیم عصاره‌گیری شده با استات آمونیوم (Helmke & Sparks, 1996) توسط دستگاه فلیم‌فتومتر تعیین شد.

با توجه به اینکه پژوهش‌های بسیار کمی در مورد تعیین خصوصیات فیزیولوژیکی در گونه *W. coagulans* انجام شده است و اطلاعاتی در مورد اثر نانوذرات و مواد اصلاح‌کننده خاک بر میزان این ترکیب‌ها در این گونه گیاهی وجود ندارد، از این رو در این راستا این تحقیق به منظور بررسی اثر سطوح مختلف اسید هیومیک و نانوذرات اکسید تیتانیوم بر میزان ترکیب‌های فیتوشیمیایی و برخی از پارامترهای رشد گیاه دارویی پنیرباد انجام شد.

## مواد و روش‌ها

این پژوهش در قالب آزمایش فاکتوریل بر پایه طرح کامل تصادفی با ۳ تکرار به صورت کشت گلدانی گیاه پنیرباد اجرا شد. تیمارهای آزمایش شامل ۳ سطح اسید هیومیک (صفر، ۱۰ و ۳۰ گرم در کیلوگرم خاک) و ۳ سطح نانو ذرات دی‌اکسید

## جدول ۱- ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی خاک مورد مطالعه

Table 1. Physical and chemical properties of studied soil

Soil texture	Sand	Silt	Clay	Equivalent calcium carbonate	Organic carbon	pH	EC	P	K
	(% )						dS.m <sup>-1</sup>	mg.kg <sup>-1</sup>	
Clay Loam	42	30	28	19	0.78	7.82	2.56	12.48	137

گرفت. سپس نمونه‌ها به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شده و به یک میلی‌لیتر از عصاره رویی یک میلی‌لیتر معرف فولین و ۲ میلی‌لیتر کربنات سدیم ۲۰٪ اضافه و در نهایت به مدت یک دقیقه در حمام آب‌گرم با دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. پس از سرد شدن میزان جذب نمونه‌ها در ۶۵۰ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری گردید. برای محاسبه میزان فنول کل از منحنی استاندارد تهیه شده با غلظت‌های مختلف اسید گالیک استفاده شد.

## اندازه‌گیری میزان فلاونوئیدهای کل

برای سنجش غلظت فلاونوئیدهای کل موجود در نمونه‌های گیاهی، از روش Krizek و همکاران (۱۹۹۸) با کمی تغییرات استفاده شد. بدین‌منظور ۰/۱ گرم در ۱۰ میلی‌لیتر متانول اسیدی (متانول: اسید کلریدریک یا اسید استیک به نسبت ۱:۹۹) هموژنیزه شده به مدت ۲۴ ساعت در تاریکی و دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. سپس عصاره حاصل به مدت ۱۰ دقیقه در ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ و میزان جذب محلول رویی در طول موج ۳۰۰ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شد. برای تعیین مقدار فلاونوئیدها از منحنی استاندارد تهیه شده با غلظت‌های مختلف کروستین استفاده شد.

## اندازه‌گیری فلورسانس کلروفیل (Fv/Fm)

شاخص فلورسانس کلروفیل به روش Maxwell و Johnson (۲۰۰۰) با استفاده از دستگاه فلورومتر کلروفیل اندازه‌گیری شد. در هر گلدان دو برگ جوان انتخاب گردید

## اندازه‌گیری فسفر گیاه

ابتدا یک گرم از نمونه‌های خشک گیاهی در کروزه‌های چینی و روی صفحه حرارتی قرار داده شد و به‌منظور هضم مرطوب، نیتریک اسید و سولفوریک اسید غلیظ با نسبت برابر روی آنها ریخته شد و در دمای ۲۰۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. پس از کامل شدن عمل هضم، نمونه‌ها با آب دوبار تقطیر به حجم ۲۵ میلی‌لیتر رسانده شد. سنجش فسفر با استفاده از معرف زرد رنگ آمونیوم-وانادات-مولیبدات انجام شد. پس از افزودن معرف به عصاره حاصل از نمونه‌ها، ۱۰ دقیقه بعد واکنش رنگی کامل شده و جذب در ۴۷۰ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر تعیین گردید (Jaiswal, 2018).

## اندازه‌گیری پتاسیم گیاه

ابتدا یک گرم از نمونه گیاهی در کروزه چینی به مدت ۴ ساعت در دمای ۵۵۰ درجه سانتی‌گراد در کوره الکتریکی سوزانده شده و پس از سرد شدن و به‌منظور هضم مرطوب، ۱۰ میلی‌لیتر اسید کلریدریک یک مولار روی نمونه ریخته و عصاره‌گیری گردید. غلظت پتاسیم در عصاره گیاه به‌وسیله دستگاه فلیم‌فتومتر اندازه‌گیری شد (Rowell, 1999).

## اندازه‌گیری محتوی فنول کل

برای تعیین محتوی ترکیب‌های فنولی از روش فولین-سیوکالتیو (Folin-Ciocalteus) استفاده شد (Matta & Giai, 1969). در این روش ۰/۵ گرم نمونه بافت گیاهی با استفاده از ۱۰ میلی‌لیتر متانول ۸۰٪ هموژنیزه شده و به مدت یک ساعت بر روی شیکر و در دمای آزمایشگاه قرار

مقایسه میانگین‌ها با آزمون دانکن در سطح احتمال ۵٪ انجام شد. همچنین برای رسم گراف‌ها از نرم‌افزار Excel استفاده شد.

### نتایج

#### وزن تر

نتایج تجزیه واریانس داده‌های حاصل از پژوهش نشان داد که اثر سطوح مختلف اسید هیومیک (HA) و نانو ذرات دی اکسید تیتانیوم ( $TiO_2$ ) بر میزان وزن تر در سطح احتمال ۱٪ معنی‌دار بود (جدول ۲). مقایسه میانگین داده‌ها نشان داد که با افزایش میزان اسید هیومیک و نانو ذرات دی اکسید تیتانیوم میزان وزن تر گیاه افزایش یافته، به طوری که در تیمار مصرف ۳۰ گرم اسید هیومیک در کیلوگرم خاک، میزان وزن تر ۱۹/۹۶ گرم بوده که نسبت به تیمار شاهد افزایش معنی‌داری داشته است. همچنین با مصرف نانوذرات دی اکسید تیتانیوم وزن تر افزایش معنی‌داری نسبت به تیمار شاهد نشان داد، به طوری که میزان آن از ۱۴/۸۳ در تیمار شاهد به ۳۰/۹۳ گرم در تیمار ۹۰ میلی‌گرم در لیتر نانو ذرات دی اکسید تیتانیوم افزایش یافت. بیشترین مقدار آن در تیمار ۳۰ گرم اسید هیومیک در کیلوگرم خاک و ۹۰ میلی‌گرم در لیتر نانو ذرات دی اکسید تیتانیوم به مقدار ۳۸/۰۶ گرم بدست آمد که دارای افزایش ۶۱ درصدی نسبت به شاهد بود (جدول ۳).

#### وزن خشک

نتایج حاصل از تجزیه واریانس (جدول ۲) نشان داد که وزن خشک گیاه تحت تأثیر تیمار اسید هیومیک و نانو ذرات دی اکسید تیتانیوم قرار گرفت و اختلاف از نظر آماری در سطح ۱٪ معنی‌دار شد. مقایسه میانگین داده‌ها نشان داد که با افزایش مصرف اسید هیومیک تا ۳۰ گرم در کیلوگرم خاک، وزن خشک گیاه نسبت به تیمار شاهد به میزان ۳۱/۷٪ افزایش یافته است. همچنین در تیمار مصرف نانو ذرات دی اکسید تیتانیوم، میزان وزن خشک

و مؤلفه‌های فلورسانس کلروفیل شامل کمینه فلورسانس کلروفیل (Fo)، بیشینه فلورسانس کلروفیل (Fm) و بیشینه عملکرد کوانتومی فتوسیستم دو (Fv/Fm) با استفاده از رابطه ۱ بدست آمد.

$$Fv/Fm = (Fm - Fo) / Fm \quad \text{رابطه ۱}$$

#### اندازه‌گیری میزان پرولین

میزان پرولین برگ با استفاده از روش Bates و همکاران (۱۹۷۳) تعیین شد. به این منظور ۰/۵ گرم بافت برگ با ۱۰ میلی‌لیتر سولفوسالیسیلیک اسید ۳٪ در هاون ساییده و به‌خوبی مخلوط گردید، سپس به مدت ۱۰ دقیقه در ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. در یک لوله دیگر ۲ میلی‌لیتر از مایع رویی را با ۲ میلی‌لیتر معرف ناین‌هیدرین و ۲ میلی‌لیتر اسید گلاسیال استیک خالص مخلوط کرده و به مدت یک ساعت در بن‌ماری در ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد، پس از اضافه کردن ۴ میلی‌لیتر تولوئن به هر یک از لوله‌ها، به مدت ۲۰ ثانیه ورتکس گردیدند. پس از تشکیل دو بخش جداگانه، میزان جذب نمونه لایه سطحی قرمز و نمونه‌های استاندارد با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۲۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. مقدار پرولین (میکرومول بر گرم وزن تر) با استفاده از معادلات رگرسیون و منحنی استاندارد محاسبه گردید.

#### اندازه‌گیری محتوی آب نسبی

محتوی آب نسبی (Relative Water Content: RWC) همانند روش Sangwan و همکاران (۲۰۰۴) با استفاده از رابطه ۲ محاسبه شد.

$$RWC (\%) = \frac{(\text{وزن خشک} - \text{وزن تر}) \times 100}{\text{وزن خشک} - \text{وزن آماس}} \quad \text{رابطه ۲}$$

#### محاسبات آماری

داده‌های بدست آمده از این پژوهش، با استفاده از نرم‌افزار SAS 9.1 مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفته و

اسید هیومیک بر تعداد شاخه‌های جانبی معنی‌دار نبوده اما سطوح نانو ذرات دی‌اکسید تیتانیوم بر تعداد شاخه‌های جانبی در سطح احتمال ۵٪ معنی‌دار بود (جدول ۲). مقایسه میانگین داده‌ها نشان داد که در تیمارهای مصرف اسید هیومیک و نانو ذرات دی‌اکسید تیتانیوم به صورت جداگانه، تعداد شاخه‌های جانبی افزایش یافته اما نسبت به تیمار شاهد افزایش معنی‌داری نداشته است. در تیمار مصرف همزمان اسید هیومیک و نانو ذرات دی‌اکسید تیتانیوم تعداد شاخه‌های جانبی از ۲ در تیمار شاهد به ۳/۶۶ در تیمار مصرف همزمان ۳۰ گرم اسید هیومیک در کیلوگرم خاک و ۹۰ میلی‌گرم در لیتر نانو ذرات دی‌اکسید تیتانیوم رسیده است که اختلاف معنی‌داری را نشان می‌دهد (جدول ۳).

پنیرباد از ۵/۰۲ در تیمار شاهد به ۱۰/۴۲ گرم در تیمار مصرف ۹۰ میلی‌گرم در لیتر نانو ذرات دی‌اکسید تیتانیوم به طور معنی‌داری افزایش یافته است. برهم‌کنش مصرف اسید هیومیک و نانو ذرات دی‌اکسید تیتانیوم سبب افزایش میزان وزن خشک شده، به طوری که بیشترین مقدار آن در تیمار ۳۰ گرم اسید هیومیک در کیلوگرم خاک و ۹۰ میلی‌گرم در لیتر نانو ذرات دی‌اکسید تیتانیوم به مقدار ۱۲/۳۵ گرم بدست آمد که دارای اختلاف معنی‌داری با سایر تیمارها می‌باشد (جدول ۳).

#### شاخه جانبی

نتایج تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که اثر مصرف

جدول ۲- تجزیه واریانس برخی خصوصیات مورفولوژیک و مقدار پتاسیم و فسفر گیاه پنیرباد (*Withania coagulans*) تحت تأثیر

تیمارهای اسید هیومیک و نانو ذرات دی‌اکسید تیتانیوم

Table 2. ANOVA of some morphological characteristics and content of potassium and phosphorus in *Withania coagulans* affected by humic acid and titanium dioxide nanoparticles treatments

S.O.V.	d.f.	Mean Square					
		Fresh weight	Dry weight	Number of lateral branches	Height	P	K
Humic acid (H)	2	103.24**	12.12**	1 <sup>ns</sup>	118.31**	40.65**	0.002**
Titanium dioxide nanoparticles (T)	2	680.36**	64.64**	2.3*	354.09**	3.99**	0.0004**
H*T	4	0.96 <sup>ns</sup>	0.19 <sup>ns</sup>	0.0001 <sup>ns</sup>	0.108 <sup>ns</sup>	0.74**	0.0001**
Experimental error	18	2.76	0.22	0.33	0.86	0.01	0.00001
C.V. (%)	-	6.31	5.37	19.98	5.09	0.45	5.87

n.s., \*, and \*\*: non-significant, significant at 5%, and 1% probability levels, respectively.

جدول ۳- مقایسه میانگین برخی خصوصیات مورفولوژیک و مقدار پتاسیم و فسفر گیاه پنیرباد (*Withania coagulans*) تحت تأثیر تیمارهای اسید هیومیک و نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم

**Table 3. Means comparison of some morphological characteristics and content of potassium and phosphorus in *Withania coagulans* affected by humic acid and titanium dioxide nanoparticles treatments**

Parameters	Humic acid (g.kg <sup>-1</sup> )	Titanium dioxide nanoparticles (mg.l <sup>-1</sup> )		
		0	45	90
Fresh weight (g)	0	14.83f	22.63d	<b>30.93b</b>
	10	17.92e	27.76c	<b>35.50a</b>
	30	19.96ed	30.03bc	<b>38.06a</b>
Dry weight (g)	0	5.02f	7.52e	<b>10.42bc</b>
	10	5.52f	8.77d	<b>11.19b</b>
	30	7.35e	10.14c	<b>12.35a</b>
Number of lateral branches	0	2c	2.66abc	<b>3abc</b>
	10	2.33bc	3abc	<b>3.33ab</b>
	30	2.66abc	3.33ab	<b>3.66a</b>
Height (cm)	0	10.50f	11.23f	<b>21.40c</b>
	10	14.70e	15.36e	<b>25.86b</b>
	30	17.43d	18.30d	<b>20.03a</b>
K (μg.g <sup>-1</sup> )	0	19.67h	19.99g	<b>20.35e</b>
	10	20.10fg	20.25ef	<b>21.12d</b>
	30	22.58c	24.26b	<b>24.87a</b>
P (μg.g <sup>-1</sup> )	0	0.042d	0.043d	<b>0.052c</b>
	10	0.054c	0.056c	<b>0.057c</b>
	30	0.064b	0.068b	<b>0.088a</b>

Similar letters in each column indicate the absence of significant differences between treatments (Duncan test).

#### ارتفاع گیاه

یافت. بیشترین مقدار این پارامتر در تیمار مصرف همزمان ۳۰ گرم اسید هیومیک در کیلوگرم خاک و ۹۰ میلی‌گرم در لیتر نانو ذرات دی‌اکسید تیتانیوم به مقدار ۲۹/۰۳ سانتی‌متر بدست آمد که دارای اختلاف معنی‌داری با سایر تیمارها می‌باشد (جدول ۳).

#### میزان پتاسیم گیاه

نتایج تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که اثر سطوح مختلف اسید هیومیک، نانو ذرات دی‌اکسید تیتانیوم و اثر متقابل آنها بر میزان پتاسیم گیاه در سطح احتمال ۱٪

نتایج تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که اثر سطوح مختلف اسید هیومیک و نانو ذرات دی‌اکسید تیتانیوم بر میزان ارتفاع گیاهی در سطح احتمال ۱٪ معنی‌دار بود (جدول ۲). با افزایش میزان اسید هیومیک میانگین ارتفاع گیاهی از ۱۰/۵۰ در تیمار شاهد به ۱۷/۴۳ سانتی‌متر در تیمار مصرف ۳۰ گرم اسید هیومیک در کیلوگرم خاک به‌طور معنی‌داری افزایش یافته است، همچنین با مصرف نانو ذرات دی‌اکسید تیتانیوم تا ۹۰ میلی‌گرم در لیتر، متوسط ارتفاع گیاه پنیرباد به میزان ۵۰/۹٪ نسبت به شاهد افزایش

معنی‌دار می‌باشد (جدول ۲). با بررسی مقایسه میانگین داده‌ها مشاهده شد که با افزایش میزان مصرف اسید هیومیک، میزان جذب گیاهی پتاسیم افزایش یافته، به طوری که در تیمار مصرف ۳۰ گرم در کیلوگرم میزان جذب پتاسیم افزایش ۱۴/۷۹ درصدی را نسبت به تیمار شاهد نشان داد. در تیمار مصرف نانو ذرات دی‌اکسید تیتانیوم نیز این پارامتر دارای افزایش معنی‌داری نسبت به تیمار شاهد می‌باشد. بیشترین میزان جذب پتاسیم توسط گیاه دارویی پنیرباد در تیمار ۳۰ گرم اسید هیومیک در کیلوگرم خاک و ۹۰ میلی‌گرم در لیتر نانو ذرات دی‌اکسید تیتانیوم به مقدار ۲۴/۸۷ میکروگرم در گرم بدست آمد که دارای افزایش ۲۱ درصدی نسبت به تیمار شاهد است (جدول ۳).

#### میزان فنول کل

نتایج تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که سطوح مختلف اسید هیومیک، نانو ذرات دی‌اکسید تیتانیوم و اثر متقابل آنها بر میزان فنول کل در سطح احتمال ۱٪ معنی‌دار است (جدول ۴)، به طوری که با افزایش میزان مصرف اسید هیومیک تا ۳۰ گرم در کیلوگرم خاک میزان فنول گیاهی از ۴۸/۵۹ در تیمار شاهد به ۳۹/۸۸ میلی‌گرم بر گرم وزن تر کاهش یافته است. همچنین با افزایش مصرف نانو ذرات دی‌اکسید تیتانیوم تا ۹۰ میلی‌گرم در لیتر، میزان فنول به مقدار ۲/۳۷٪ نسبت به شاهد افزایش یافته است که دارای اختلاف معنی‌داری با سایر تیمارها می‌باشد (جدول ۵).

میزان فسفر گیاه  
نتایج حاصل از تجزیه واریانس (جدول ۲) نشان داد که اثر سطوح مختلف اسید هیومیک، نانو ذرات دی‌اکسید تیتانیوم و اثر متقابل آنها بر میزان فسفر گیاه در سطح احتمال ۱٪ معنی‌دار است. مقایسه میانگین داده‌های جذب فسفر توسط پنیرباد نشان می‌دهد که مصرف اسید هیومیک و نانو ذرات دی‌اکسید تیتانیوم هر یک به تنهایی به طور

جدول ۴- تجزیه واریانس برخی خصوصیات فیزیولوژیک گیاه پنیرباد (*Withania coagulans*) تحت تأثیر تیمارهای اسید هیومیک و نانو ذرات دی‌اکسید تیتانیوم

Table 4. ANOVA of some physiological characteristics in *Withania coagulans* affected by humic acid and titanium dioxide nanoparticles treatments

S.O.V.	d.f.	Mean Square				
		Total phenols	Total flavonoids	Chlorophyll fluorescence	Proline	Relative water content
Humic acid (H)	2	177.89**	6.76**	6.15**	0.32**	20.64**
Titanium dioxide nanoparticles (T)	2	3.01**	2.94**	0.30**	0.20**	0.67**
H*T	4	0.08**	0.01**	0.05**	0.001**	0.06**
Experimental error	18	0.002	0.001	0.01	0.0001	0.003
C.V. (%)	-	0.1	1.20	3.64	2.55	0.07

\*\* : significant at 1% probability level.



جدول ۵- مقایسه میانگین برخی خصوصیات فیزیولوژیک گیاه پنیرباد (*Withania coagulans*) تحت تأثیر تیمارهای اسید هیومیک و نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم

**Table 5. Means comparison of some physiological characteristics in *Withania coagulans* affected by humic acid and titanium dioxide nanoparticles treatments**

Parameters	Humic acid (g.kg <sup>-1</sup> )	Titanium dioxide nanoparticles (mg.l <sup>-1</sup> )		
		0	45	90
Total phenols (mg gallic acid.g <sup>-1</sup> fresh weight)	0	48.59c	49.35b	<b>49.77a</b>
	10	44.08f	45.23e	<b>45.37d</b>
	30	39.88i	40.38h	<b>40.77g</b>
Total flavonoids (mg crocin.g <sup>-1</sup> fresh weight)	0	2.77c	3.56b	<b>3.84a</b>
	10	1.55h	2.32e	<b>2.69d</b>
	30	1.04i	1.98g	<b>2.13f</b>
Chlorophyll fluorescence	0	0.78e	0.63f	<b>0.59f</b>
	10	1.64c	1.55c	<b>1.32d</b>
	30	2.67a	2.17b	<b>2.12b</b>
Proline (μmol.g <sup>-1</sup> fresh weight)	0	0.65c	0.68b	<b>0.72a</b>
	10	0.41f	0.47e	<b>0.54d</b>
	30	0.27i	0.30h	<b>0.35g</b>
Relative water content	0	72.93i	73.24h	<b>73.34g</b>
	10	73.49f	73.66e	<b>74.28d</b>
	30	75.85c	76.03b	<b>76.28a</b>

Similar letters in each column indicate the absence of significant differences between treatments (Duncan test).

#### میزان فلاونوئیدها

نتایج تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که سطوح مختلف اسید هیومیک، نانو ذرات دی‌اکسید تیتانیوم و اثر متقابل آنها بر میزان فلاونوئیدهای گیاه پنیرباد در سطح احتمال ۱٪ معنی‌دار است (جدول ۴). مقایسه میانگین داده‌ها نشان داد که با افزایش میزان اسید هیومیک تا ۳۰ گرم در کیلوگرم خاک میزان فلاونوئیدهای گیاهی از ۲/۷۷ در تیمار شاهد به ۱/۰۴ میلی‌گرم بر گرم وزن تر کاهش یافته است. در تیمار مصرف ۹۰ میلی‌گرم در لیتر نانو ذرات دی‌اکسید تیتانیوم میزان فلاونوئیدها ۳/۸۴ میلی‌گرم بر گرم وزن تر بدست آمد که نسبت به تیمار شاهد افزایش ۲۷/۸۶ درصدی را نشان می‌دهد. در تیمارهای مصرف همزمان اسید هیومیک و نانو

ذرات دی‌اکسید تیتانیوم میزان فلاونوئیدهای گیاه پنیرباد کاهش یافت (جدول ۵).

#### میزان فلورسانس کلروفیل

نتایج حاصل از تجزیه واریانس (جدول ۴) نشان داد که سطوح مختلف اسید هیومیک، نانو ذرات دی‌اکسید تیتانیوم و اثر متقابل آنها بر میزان فلورسانس کلروفیل در سطح احتمال ۱٪ معنی‌دار است. با بررسی مقادیر میانگین داده‌های میزان فلورسانس کلروفیل ملاحظه گردید که با افزایش مصرف اسید هیومیک تا ۳۰ گرم در کیلوگرم خاک مقدار این پارامتر به میزان ۷۰/۷۹٪ نسبت به تیمار شاهد افزایش یافت. همچنین در تیمار مصرف نانو ذرات دی‌اکسید تیتانیوم

به طوری که در تیمار مصرف ۳۰ گرم اسید هیومیک در کیلوگرم خاک مقدار این پارامتر از ۷۲/۹۳٪ به ۷۵/۸۵٪ افزایش یافته و در تیمار مصرف نانو ذرات دی اکسید تیتانیوم تا ۹۰ میلی گرم در لیتر مقدار محتوی نسبی آب به ۷۳/۳۴٪ افزایش یافته است.

### بحث

نتایج این پژوهش نشان داد که مصرف اسید هیومیک سبب افزایش وزن تر، وزن خشک، تعداد شاخه های جانبی و ارتفاع گیاه پنیرباد نسبت به تیمار شاهد شد. کاربرد کودهای آلی سبب بهبود ساختمان و تهویه مناسب خاک شده و با گسترش بهتر ریشه در خاک، رشد رویشی و زایشی گیاه را دربردارد (Arancon et al., 2004). اسید هیومیک نیز می تواند از طریق اثر هورمونی و قدرت کلات کنندگی و جذب بیشتر عناصر غذایی، سبب افزایش وزن تر، وزن خشک و ارتفاع گیاهی شود (Akbari & Gorgini, 2016; Rahgoshahi et al., 2020). همکاران (Shabankareh و همکاران (۲۰۱۷) نشان دادند که مصرف ۴۰۰ میلی گرم در لیتر اسید هیومیک در شرایط رطوبتی ظرفیت زراعی بیشترین مقادیر ارتفاع، وزن تر و خشک بوته، قطر ساقه، وزن تر و خشک ریشه گیاه بادرنجبویه نسبت به مصرف ۲۰۰ میلی گرم در لیتر اسید هیومیک و تیمار شاهد بدست آمد. کاربرد اسید هیومیک به علت جذب عناصر مختلف از قبیل نیتروژن، فسفر، کلسیم، پتاسیم، منگنز، روی، مس و آهن باعث رشد اندام های هوایی می شود (Erkossa et al., 2002). Taleh Farahi و همکاران (۲۰۱۹) نشان دادند که مصرف خاکی اسید هیومیک باعث افزایش معنی دار ارتفاع گیاهی، وزن خشک و تعداد برگ نسبت به تیمار شاهد شده است. Askari و همکاران (۲۰۱۲) در تحقیقی که روی گیاه دارویی نعنا فلفلی انجام دادند، نشان دادند که مصرف اسید هیومیک بر ارتفاع بوته، وزن خشک برگ، وزن خشک اندام هوایی و عملکرد ماده تر و خشک افزایش معنی داری داشته است. نتایج بدست آمده در این تحقیق با نتایج پژوهش های مذکور

تا ۹۰ میلی گرم در لیتر میزان فلورسانس کلروفیل گیاهی از ۷۸/۰٪ در تیمار شاهد به ۵۹/۰٪ کاهش یافت. در تیمار مصرف همزمان اسید هیومیک و نانو ذرات دی اکسید تیتانیوم مقدار این پارامتر دارای اختلاف معنی داری با تیمار شاهد می باشد (جدول ۵).

### میزان پرولین

نتایج تجزیه واریانس داده ها نشان داد که سطوح مختلف اسید هیومیک، نانو ذرات دی اکسید تیتانیوم و اثر متقابل آنها بر میزان پرولین گیاه پنیرباد در سطح احتمال ۱٪ معنی دار است (جدول ۴). مصرف نانو ذرات دی اکسید تیتانیوم تا ۹۰ میلی گرم در لیتر سبب افزایش معنی داری مقدار پرولین گیاهی گردید، به طوری که مقدار آن از ۶۵/۰٪ در تیمار شاهد به ۷۲/۰٪ میکرومول بر گرم وزن تر رسیده است. همچنین با افزایش میزان اسید هیومیک تا ۳۰ گرم در کیلوگرم خاک میزان پرولین گیاهی از ۶۵/۰٪ در تیمار شاهد به ۲۷/۰٪ میکرومول بر گرم وزن تر کاهش یافته است. بیشترین میزان پرولین در تیمار مصرف ۹۰ میلی گرم در لیتر نانو ذرات دی اکسید تیتانیوم به میزان ۷۲/۰٪ میکرومول بر گرم وزن تر بدست آمد که دارای اختلاف معنی داری با سایر تیمارها می باشد (جدول ۵).

### محتوی نسبی آب

نتایج تجزیه واریانس داده ها نشان داد که سطوح مختلف اسید هیومیک، نانو ذرات دی اکسید تیتانیوم و اثر متقابل آنها بر محتوی نسبی آب گیاه در سطح احتمال ۱٪ معنی دار است (جدول ۴). با بررسی مقایسه میانگین داده های محتوی نسبی آب مشخص شد که بیشترین میزان محتوی نسبی آب به میزان ۷۶/۲۸٪ در تیمار مصرف ۳۰ گرم اسید هیومیک در کیلوگرم خاک و ۹۰ میلی گرم در لیتر بدست آمد که به میزان ۴/۳۹٪ نسبت به تیمار شاهد افزایش نشان می دهد (جدول ۵). همچنین مصرف اسید هیومیک و نانو ذرات دی اکسید تیتانیوم هر یک به تنهایی سبب افزایش معنی داری در میزان محتوی نسبی آب گیاه نسبت به تیمار شاهد شدند،

ردوکنناز شده و همین موضوع موجب تسریع مصرف نیتروژن برای ساخت ترکیب‌های آلی مانند پروتئین، اسیدهای آمینه و کلروفیل شده و در اثر تحریک ریشه‌ای و افزایش جذب مواد غذایی، رشد گیاه را در پی داشته است (Lyu et al., 2017؛ Manivannan et al., 2008؛ Yang & Hong, 2006).

نتایج نشان داد که با افزایش سطوح مصرف اسید هیومیک و نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم به تنهایی و در صورت مصرف همزمان با هم، میزان فسفر و پتاسیم گیاهی به‌طور معنی‌داری نسبت به شاهد افزایش یافته است که با نتایج Khater (۲۰۱۵) در مورد تأثیر نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم بر جذب فسفر و پتاسیم توسط گشنیز مطابقت دارد. Taleh Farahi و همکاران (۲۰۱۹) نیز گزارش کردند که بیشترین غلظت پتاسیم به مقدار ۲۶/۷۵ میکروگرم در گرم در تیمار مصرف اسید هیومیک بوده که دارای افزایش ۳۶ درصدی نسبت به شاهد می‌باشد. در تیمار مصرف اسید هیومیک غلظت فسفر از ۰/۰۴ میکروگرم در گرم در تیمار شاهد به ۰/۰۹ میکروگرم در گرم رسیده است که دارای افزایش معنی‌داری می‌باشد. همچنین نتایج سایر تحقیقات نشان داد که با افزایش غلظت اسید هیومیک، مقدار پتاسیم اندام هوایی به‌طور معنی‌داری افزایش یافته است (Abootalebi Jahromi & Hassanzadeh Khankahdani, 2016؛ Khaled & Fawy, 2011). افزایش مقدار پتاسیم مصرف اسید هیومیک در اندام هوایی گیاه نیز توسط محققان گزارش شده است که با این تحقیق همخوانی دارد (Daur, 2014؛ Daur & Bakhshwain, 2013).

نتایج نشان داد که مقادیر فنول و فلاونوئیدهای گیاهی با افزایش مصرف اسید هیومیک، به‌طور معنی‌داری کاهش یافت اما مصرف سطوح مختلف نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم سبب افزایش معنی‌دار این دو پارامتر نسبت به شاهد شد. تأثیر نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم بر محتوای فنول گیاه گل‌ناز نشان داد که بیشترین مقدار فنول در تیمار شاهد به مقدار ۴۰۱/۱۴ و کمترین مقدار به میزان ۳۸۶/۱۳ میکروگرم در گرم وزن تر در تیمار مصرف نانوذرات

مطابقت دارد. افزایش میزان رشد و بیومس گیاهی در تیمار مصرف اسید هیومیک را می‌توان به تحریک رشد گیاه از طریق فعال‌سازی آنزیم‌ها و سنتز پروتئین نسبت داد (Ulukan, 2008).

همچنین به‌طور مشابهی نیز در این پژوهش اثر مثبت محلول‌پاشی نانو ذرات دی‌اکسید تیتانیوم بر پارامترهای رشد مانند وزن تر، وزن خشک، تعداد شاخه‌های جانبی و ارتفاع گیاه نیز نشان داده شد. Ghorbani و همکاران (۲۰۲۱) نشان دادند که در تیمارهای ۴۰، ۶۰ و ۹۰ درصد ظرفیت زراعی با افزایش غلظت نانو ذرات دی‌اکسید تیتانیوم از صفر به ۲۰ میلی‌گرم در لیتر به ترتیب وزن خشک ۲، ۷ و ۸۶ درصد نسبت به عدم کاربرد آن افزایش یافت. Amooaghaie و Majidi (۲۰۲۰) با بررسی تأثیر سطوح مختلف مصرف نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم بر رشد و عملکرد زنیان نشان دادند که مصرف این ترکیب با غلظت ۲۰ و ۴۰ میلی‌گرم در لیتر بیشترین تأثیر مثبت را نسبت به تیمار شاهد بر ارتفاع گیاه، وزن خشک و عملکرد دانه داشت. همچنین در پژوهشی دیگر، مصرف ۲، ۴ و ۶ میلی‌گرم در لیتر نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم سبب افزایش معنی‌دار ارتفاع، تعداد شاخه‌های جانبی و عملکرد گیاه گشنیز نسبت به تیمار شاهد گردید (Khater, 2015). Gerami و همکاران (۲۰۲۱) نشان دادند که با افزایش سطوح نانوذره تیتانیوم، وزن تر اندام هوایی نسبت به نمونه شاهد افزایش یافت که این روند فقط در سطح ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر نانوذره دی‌اکسید تیتانیوم معنی‌دار بود. همچنین با افزایش غلظت نانوذره دی‌اکسید تیتانیوم، وزن خشک ریشه افزایش معنی‌دار یافت اما در مورد وزن تر ریشه این مقدار معنی‌دار نبود. نتایج تحقیقات دیگر نشان داد که مصرف نانو ذره دی‌اکسید تیتانیوم با تحریک ریشه سبب افزایش توانایی جذب آب و مواد غذایی شده است که به‌دنبال آن ارتفاع، وزن تر و خشک گیاه آویشن و گل‌گاوزبان افزایش یافته است (Fazeli-Nasab et al., 2018؛ Heydari et al., 2017). نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم سبب افزایش جذب و متابولیسم نیتروژن و فعالیت آنزیم نترات

مقادیر پرولین در گیاه پنیرباد در اثر اعمال تیمارهای آزمایشی نشان داد که مصرف سطوح مختلف اسید هیومیک سبب کاهش غلظت پرولین و افزایش مصرف نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم سبب افزایش غلظت پرولین گیاهی به طور معنی‌داری نسبت به تیمار شاهد گردید. در شرایط تنش غلظت اسید آمینه پرولین نسبت به سایر اسیدهای آمینه افزایش یافته که تحمل گیاه را به تنش بیشتر می‌کند (Shawquat *et al.*, 2015)، به طوری که پرولین ذخیره شده در سیتوپلاسم در حفاظت از ساختمان ماکرومولکول‌های درون سلول نقش مؤثری دارد (Rajeshwari & Bhuvaneshwari, 2017). Zarafshar و همکاران (۲۰۱۵) نشان دادند که میزان پرولین در نهال‌های تحت تنش افزایش پیدا کرد، اما محلول‌پاشی نانو ذرات تیتانیوم تأثیر چندانی بر میزان پرولین نداشت. Mazarie و همکاران (۲۰۱۹) بیان کردند که محلول‌پاشی با ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر نانو دی‌اکسید تیتانیوم سبب افزایش ۴۷/۹۶ درصدی میزان پرولین در گیاهان نسبت به شاهد گردید. همچنین نتایج این مطالعه با یافته‌های Amirjani و همکاران (۲۰۱۴) که بیان کردند افزایش مصرف نانوذرات مقدار پرولین را در اندام هوایی گیاه دارویی پریوش افزایش می‌دهد، مطابقت دارد.

به طور کلی براساس نتایج بدست آمده در این پژوهش می‌توان بیان کرد که مصرف اسید هیومیک و نانو ذرات دی‌اکسید تیتانیوم اثر قابل ملاحظه‌ای بر بهبود رشد و ویژگی‌های بیوشیمیایی پنیرباد داشت. مصرف اسید هیومیک به میزان ۳۰ گرم در کیلوگرم خاک سبب افزایش معنی‌دار وزن تر، وزن خشک، ارتفاع گیاه، تعداد شاخه‌های جانبی، میزان پتاسیم، فسفر گیاه، فلورسانس کلروفیل و محتوی نسبی آب گردید. نتایج نشان داد که میزان فنول، فلاونوئید و پرولین با افزایش مصرف اسید هیومیک کاهش یافته اما با افزایش مصرف نانو ذرات دی‌اکسید تیتانیوم تا ۹۰ میلی‌گرم در لیتر، مقدار این پارامترها به طور معنی‌داری نسبت به تیمار شاهد افزایش یافت. بنابراین مصرف خاکی ۳۰ گرم اسید هیومیک در کیلوگرم خاک و محلول‌پاشی ۹۰ میلی‌گرم نانو ذرات دی‌اکسید تیتانیوم در لیتر می‌تواند در بهبود

دی‌اکسید تیتانیوم بدست آمد (Ahmadi *et al.*, 2020). نتایج این تحقیق با نتایج Mazarie و همکاران (۲۰۱۹) و Ghorbanpour (۲۰۱۵) در مورد تغییرات مقدار فنول کل با مصرف نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم مطابقت داشت. همچنین Ahmadi و همکاران (۲۰۲۰) در مورد مقدار فلاونوئیدهای گیاهی نشان دادند که بیشترین مقدار مربوط به تیمار شاهد به میزان ۸۰ و کمترین مقدار به گیاهان تحت تیمار نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم به میزان ۷۵ میکروگرم در گرم وزن تر تعلق دارد.

نتایج میزان فلورسانس کلروفیل گیاه پنیرباد نشان داد که با افزایش مصرف اسید هیومیک، این پارامتر به طور معنی‌داری افزایش یافت اما مصرف سطوح مختلف نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم و مصرف همزمان اسید هیومیک و نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم مقدار فلورسانس کلروفیل را نسبت به شاهد کاهش داد. اسید هیومیک با قدرت کلات‌کنندگی عناصر غذایی و با کاهش تبخیر، تعرق و در نتیجه قرار دادن 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 (Nasuti *et al.*, 2010). Miandoab و همکاران (۲۰۲۱) گزارش کردند که کاربرد ۴۰ میلی‌گرم در لیتر نانو ذره دی‌اکسید تیتانیوم، موجب کاهش شاخص کلروفیل برگ گیاهی گردید. نانو ذرات می‌توانند وارد فضای داخلی سلول و غشای پلاسمایی شده و به علت ویژگی فتوکاتالیستی و افزایش آنزیم نیترات ردوکتاز دارای اثرهای فیزیولوژیکی و مورفولوژیکی بر رشد گیاه است (Lei *et al.*, 2007). Taleh Farahi و همکاران (۲۰۱۹) نشان دادند که در تیمار مصرف اسید هیومیک میزان کلروفیل کل از ۱۳/۰۱ به ۱۷/۵۵ میلی‌گرم بر گرم افزایش یافت. اسید هیومیک سبب افزایش معنی‌دار سرعت فتوسنتز، توسعه ریشه‌ها و محتوای غذایی در گیاهان می‌شود (Liu *et al.*, 1996). همچنین Ahmadi و همکاران (۲۰۱۷)، Rahi و همکاران (۲۰۱۳) و Rutan و Schnitzer (۲۰۱۱) به نتایج مشابهی دست پیدا کردند که با نتایج بدست آمده در این تحقیق مطابقت دارد.

- produced from food waste on greenhouse peppers. *Bioresource Technology*, 93: 139-144.
- Askari, M., Habibi, D. and Naderi Brujerdi, G., 2012. Effect of vermicompost, plant growth, porpmiting rhizobacteria and humic acid on grieth factor of *Mentha piperata* L. in Central province. *Journal of Agriculture and Plant Breeding*, 4: 41-54.
  - Bates, L.S., Waldren, R.P. and Teare, I.D., 1973. Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant and Soil*, 39: 205-207.
  - Bharti, S.K., Kumar, A., Sharma, N.K., Krishnan, S., Gupta, A.K. and Padamdeo, S.R., 2012. Antidiabetic effect of aqueous extract of *Withania coagulans* flower in Poloxamer-407 induced type 2 diabetic rats. *Journal of Medicinal Plants Research*, 6(45): 5706-5713.
  - Bouyoucos, C.J., 1997. Hydrometer method improved for making particle size analysis of soil. *Agronomy Journal*, 54: 464-465.
  - Daur, I. and Bakhshwain, A., 2013. Effect of humic acid on growth and quality of maize fodder production. *Pakistan Journal of Botany*, 45: 21-25.
  - Daur, I., 2014. Effect of humic acid on growth, protein and mineral composition of pearl millet [*Pennisetum glaucum* (L.) r.br.] fodder. *Pakistan Journal of Botany*, 46: 505-509.
  - Erkossa, T., Stahr, K. and Tabor, G., 2002. Integration of organic and inorganic fertilizers: effect on vegetable productivity. *Ethiopian Agricultural Research Organization, DebreZeit Agricultural Research Centre*, 82: 247-256.
  - Fazeli-Nasab, B., Sirousmehr, A.R. and Azad, H., 2018. Effect of titanium dioxide nanoparticles on essential oil quantity and quality in *Thymus vulgaris* under water deficit. *Journal of Medicinal Plants and By-product*, 7: 125-133.
  - Gerami, M., Majidian, P., Ghorbanpour, A. and Barati, N., 2021. Response of *Aloysia citriodora* L. to treatments of titanium dioxide nanoparticle and salt stress. *Environmental Stresses in Crop Sciences*, 14(2): 557-567.
  - Ghahreman, A., 1999. *Colored Flora of Iran (Volume 19)*. Research Institute of Forests and Rangelands Press, Tehran. 252p.
  - Ghorbani, R., Movafeghi, A., Gangeali, A. and Nabati, J., 2021. Effects of TiO<sub>2</sub> nanoparticles on morphological characteristics of chickpea (*Cicer arietinum* L.) under drought stress. *Environmental Stresses in Crop Sciences*, 14(1): 85-98.
  - Ghorbanpour, M., 2015. Major essential oil constituents, total phenolics and flavonoids content and antioxidant activity of *Salvia officinalis* plant in response to nano-titanium dioxide. *Journal of Plant Physiology*, 20: 249-256.
  - Goel, V. and Duhan, B.S., 2014. Ashwagandha (*Withania somnifera* L. Dunal) crop as affected by

پارامترهای رشد و برخی از ویژگی‌های بیوشیمیایی پنیرباد مفید باشد.

## سپاسگزاری

این مقاله مستخرج از طرح پژوهشی با کد ۹۵۰۱ بوده و نویسندگان این مقاله از مدیریت پژوهشی مجتمع آموزش عالی سراوان به دلیل تأمین هزینه‌های این پژوهش تشکر و قدردانی می‌نمایند.

## References

- 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*, 10: 1100-1103.
- Abootalebi Jahromi, A.H. and Hassanzadeh Khankahdani, H., 2016. Effect of humic acid on some vegetative traits and ion concentrations of Mexican Lime (*Citrus aurantifolia* Swingle) seedlings under salt stress. *International Journal of Horticultural Science and Technology*, 3(2): 255-264.
- Ahmadi, F., Aminifard, M.H., Khayyat, M. and Samadzade, A.R., 2017. Evaluation of humic acid and planting density on flower yield and vegetative characteristics of saffron (*Crocus sativus* L.). *Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants Research*, 33(2): 293-303.
- Ahmadi, L., Kolahi, M., Mohajjel Shoja, H. and Mohajel Kazemi, E., 2020. Effect of TiO<sub>2</sub> nanoparticles on physiological and anatomical characteristics of Baby sun rose (*Aptenia cordifolia*). *Journal of cell and Tissue*, 11(3): 188-204.
- Akbari, I. and Gholami, A., 2016. Evaluation of mycorrhizal fungi, vermicompost and humic acid on essence yield and root colonization of fennel. *Iranian Journal of Field Crops Research*, 13(4): 840-853.
- Amirjani, M.R., Askari, M. and Askari, P., 2014. The effect nano oxide zinc on the amount of alkaloids, enzymatic and non-enzymatic antioxidants and some indicators of Physiology *Catharantus roseu*. *Cells and Tissues Journal*, 5(2): 173-183.
- Amooaghaie, R. and Majidi, M., 2020. The effect of foliar spraying TiO<sub>2</sub> nanoparticles on biochemical responses, growth, yield and essential oil content of Ajowan (*Carum copticum*) under salinity stress. *Journal Soil and Plant Interactions*, 12 (3): 33-51.
- Arancon, N.Q., Edwards, C.A., Atiyeh, R.M. and Metzger, J.D., 2004. Effects of vermicomposts

- Lyu, S., Wei, X., Chen, J., Wang, C., Wang, X. and Pan, D., 2017. Titanium as a beneficial element for crop production. *Frontiers in Plant Science*, 8: 597.
- Manivannan, P., Jaleel, C.A., Zhao, C.X., Somasundaram, R., Azooz, M.M. and Panneerselvam, R., 2008. Variations in growth and pigment composition of sunflower varieties under early season drought stress. *Journal of Molecular Sciences*, 3: 50-56.
- Matta, A.J. and Giai, I., 1969. Accumulation of phenol in tomato plant is affected by different forms of *Fusariumoxysporum*. *Planta Medica*, 50: 512-513.
- Maxwell, K. and Johnson, G.N., 2000. Chlorophyll fluorescence- a practical guide. *Journal of Experimental Botany*, 51: 659-668.
- Mazarie, A., Mousavinik, S.M., Ghanbari, A. and Fahmideh, L., 2019. Effect of titanium dioxide spraying on physiological characteristics of sage (*Salvia officinalis* L.) under water stress. *Environmental Stresses in Crop Sciences*, 12(2): 539-553.
- Nasuti Miandoab, R., Samavat, S. and Tehrani, M.M., 2010. Humic acid fertilizer on plants and soil properties. *Food Agriculture*, 101: 53-55.
- Neumann, K.H., Kumar, A. and Imani, J., 2009. *Plant Cell and Tissue Culture. A Tool in Biotechnology*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 333p.
- Olsen, S.R., Cole, C.V., Watanabe, F.S. and Dean, L.A., 1954. Estimation of available phosphorus in soils by extraction with sodium bicarbonate. *Circular*, 939: 1-19.
- Panwar, J. and Tarafdar, J.C., 2006. Distribution of three endangered medicinal plant species and their colonization with arbuscular mycorrhizal fungi. *Journal of Arid Environments*, 5: 337-350.
- Preethi, M.P., Sangeetha, U., Pradeepa, A., Valizadeh, M. and Senthil, K., 2014. Principal component analysis and HPTLC fingerprint of *in vitro* and field grown root extract of *Withania coagulans*. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 6(5): 480-488.
- Rahgoshahi, M., Panahi Kordlaghari, Kh. and Rahimi, M.M., 2020. Study on humic acid and algae effects on grain yield and agronomical characteristics of cumin (*Cuminum cyminum* L.) under drought stress conditions. *Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants Research*, 38(2): 286-300.
- Rahi, A.R., Mohammad Hadi, F., Safari Daulatabad, S. and Azizi, F., 2013. Studying the trend of changes in response curves and the relationship between the morphological traits of *Agropyron cristatum* species under equally spaced amounts of humic acid fertilizer. *Plant and Ecosystem*, 32(8): 29-44.
- Raja, G. and Veerakumari, L., 2013. Influence of vermicompost on the yield and alkaloid content of the application of farm yard manure (FYM) and inorganic phosphorus in typic Torripsamment of Hisar. *African Journal of Biotechnology*, 13(6): 743-748.
- Gorgini Shabankareh, H., Sabouri, F., Saedi, F. and Fakheri, B.A., 2017. Effects of different levels of humic acid on growth indices and essential oil of lemon balm (*Melissa officinalis* L.) under different irrigation regimes. *Journal of Crop Science Research in Arid Regions*, 1(2): 166-176.
- Helmke, P.A. and Sparks, D.L., 1996. Lithium, sodium, potassium, cesium, and rubidium: 551-574. In: Sparks, D.L., Page, A.L., Helmke, P.A. and Loeppert, R.H., (Eds.). *Methods of Soil Analysis. Part 3. Chemical Methods and Processes*. Madison: Soil Science Society of America, Madison, WI, 1424p.
- Heydari, R.R., Moaveni, P., Hoseinpour, D.H. and Arefrad, M., 2017. Response of some morphophysiological characteristics of *Borago (Borago officinalis)* to nano particles of titanium spraying. *Journal of Crop Ecophysiology*, 10: 875-890.
- Jaiswal, P.C., 2018. *Soil, Plant and Water Analysis*. Kalyani Publishers, New Delhi, 450p.
- Kamalizadeh, M., Bihanta, M.R., Peyghambari, S.A. and Hadian, J., 2015. The effect of different levels of titanium dioxide nanoparticle on production of two major phenolic compounds in dragonhead herb (*Dracocephalum moldavica* L.). *Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants Research*, 31(3): 428-435.
- Khaled, H. and Fawy, H., 2011. Effect of different levels of humic acids on the nutrient content, plant growth, and soil properties under conditions of salinity. *Soil and Water Research*, 6: 21-29.
- Khater, M.S., 2015. Effect of titanium nanoparticles (TiO<sub>2</sub>) on growth, yield and chemical constituents of coriander plants. *Arab Journal of Nuclear Science and Applications*, 48(4): 187-194.
- Krizek, D.T., Britz, S.J. and Mirecki, R.M., 1998. Inhibitory effects of ambient levels of solar UV-A and UV-B radiation on growth of cv. New Red Fire Lettuce. *Physiologia Plantarum*, 103: 1-7.
- Lei, Z., Mingyu, S., Chao, L., Liang, C., Hao, H., Xiao, W., Xiaoqing, L., Fan, Y., Fengqing, G. and Fashui, H., 2007. Effects of nanoanatase TiO<sub>2</sub> on photosynthesis of spinach chloroplasts under different light illumination. *Biological Trace Element Research*, 119(1): 68-76.
- Liu, C., Cooper, R.J. and Bowman, D.C., 1996. Humic acid application affects photosynthesis, root development and nutrient content of creeping bentgrass. *Crop Science*, 33: 1023-1025.

- soybean under salt and water stress environment. *Journal of Plant Sciences*, 3(5): 272-278.
- Sungkaworn, T., Triampo, W., Nalakarn, P., Triampo, D., Tang, I.M. and Lenbury, Y., 2007. The effects of TiO<sub>2</sub> nanoparticles on tumor cell colonies: fractal dimension and morphological properties. *International Journal of Biomedical Science*, 2(1): 67-74.
  - Taleh Farahi, F., Gholamalizadeh, A. and Hemati A., 2019. The effect of extracted humic acid from different sources on the characteristics of sunflower grown in a calcareous soil. *Environmental Stresses in Crop Sciences*, 12(2): 617-630.
  - Turkmen, O., Demir, S., Sensoy, S. and Dursum, A., 2005. Effect of arbuscular mycorrhizal fungus and humic acid on the seedling development and nutrient content of pepper grown under saline soil conditions. *Journal of Biological Sciences*, 5: 565-574.
  - Ulukan, H., 2008. Effect of soil applied humic acid at different sowing times on some yield components in wheat (*Triticum* sp.) hybrids. *International Journal of Botany*, 4: 164-175.
  - Valizadeh, J. and Valizadeh, M., 2011. Development of efficient micropropagation protocol for *Withania coagulans* (Stocks) Dunal. *African Journal of Biotechnology*, 10(39): 7611-7616.
  - Walkley, A. and Black, L.A., 1934. Chromic acid titration for determination of soil organic matter. *Soil Science*, 63: 251.
  - Wettasinghe, M. and Shahidi, F., 2000. Scavenging of reactive oxygen species and DPPT free radicals by extract of *Borago* and 14 evening primrose meals. *Food Chemistry*, 70: 17-26.
  - Yang, F. and Hong, S., 2006. Influence of nano anatase TiO<sub>2</sub> on the nitrogen metabolism of growing spinach. *Biological Trace Element Research*, 110: 179-190.
  - Zarafshar, M., Akbarinia, M., Askary, H., Hosseini, S.M. and Rahaie, M., 2015. Effects of TiO<sub>2</sub> NPs on alleviation of drought negative effects in wild pear (*Pyrus biosseriana* buhse.) seedlings. *Journal of Plant Ecosystem Conservation*, 3(6): 81-94.
  - *Withania somnifera* DUNAL. *International Journal of Advanced Biological Research*, 3(2): 223-226.
  - Rajeshwari, V. and Bhuvaneshwari, V., 2017. Salicylic acid induced salt stress tolerance in plants. *International Journal of Plant Biology and Research*, 5(3): 1067-1072.
  - Reynolds, G.H., 2002. *Forward to the Future Nanotechnology and Regulatory Policy*. Pacific Research Institute, 200p.
  - Rhoades, J.D., 1982. Soluble salts: 167-179. In: Page, A.L. (ed.), *Methods of Soil Analysis. Part 2: Chemical and Microbiological Properties*. Monograph Number 9. ASA, Madison, WI, 1159p.
  - Richards, L.A., 1954. *Diagnosis and Improvement of Saline and Alkali Soils*. Government Printing Office, Washington, 160p.
  - Rowell, D.L., 1999. *Methods and Applications*. Longman Group, Harlow. *Soil Science*, 345p.
  - Rutan, B.S. and Schnitzer, M., 2011. Effects of soil fulvic acid on the growth and nutrient content of cucumber (*Curcumas sativus*) plants. *Plant and Soil*, 63: 491-495.
  - Sabouri, F., Sirousmehr, A. and Gorgini Shabankareh, H., 2018. Effect of irrigation regimes and application of humic acid on some morphological and physiological characteristics of Savory (*Satureja hortensis* L.). *Iranian Journal of Plant Biology*, 9(34): 13-24.
  - Samadi, N., Yahyaabadi, S. and Rezayatmand, Z., 2014. Effect of TiO<sub>2</sub> and TiO<sub>2</sub> Nanoparticle on germination, root and shoot length and photosynthetic pigments of *Mentha piperita*. *International Journal of Plant and Soil Science*, 3(4): 408-418.
  - Sangwan, R., Chaurasiya, N., Misra, L., Lal, P., Uniyal, G. and Sharma, R., 2004. Phytochemical variability in commercial herbal products and preparations of *Withania somnifera* (Ashwagandha). *Current Science*, 10: 461-465.
  - Shawquat, A.K.M., Abdul Karim, M., Abullah, A.M., Shahana, P., Mahfuz, M.B. and Altaf, M.H., 2015. Plant water relations and proline accumulations in

## Effects of humic acid and titanium dioxide nanoparticles on some phytochemical properties and growth parameters in *Withania coagulans* (Stocks) Dunal

M. Rigi<sup>1\*</sup> and M. Valizadeh<sup>2</sup>

1\*- Corresponding author, Faculty of Agricultural and Natural Resources, Higher Education Complex of Saravan, Saravan, Iran  
E-mail: mr.rigi@saravan.ac.ir

2- Faculty of Agricultural and Natural Resources, Higher Education Complex of Saravan, Saravan, Iran

Received: July 2022

Revised: December 2022

Accepted: December 2022

### Abstract

*Withania coagulans* (Stocks) Dunal from solanaceae family is a multi-purpose species that is distributed in Iran only in limited areas of natural habitats in Sistan and Baluchestan province. Different organs of this plant have antioxidant, antimicrobial, and anti-tumor biological effects. To investigate the effects of humic acid and titanium dioxide nanoparticles on the amount of phytochemical compounds and some growth parameters of this species, a pot factorial experiment was performed based on a randomized complete design with three replications. Experimental factors included humic acid at four levels (H0: 0, H1: 10, and H2: 30 g.kg<sup>-1</sup> soil) and titanium dioxide nanoparticles at three levels (T0: 0, T1: 45, and T2: 90 mg.l<sup>-1</sup>). The results showed that the H2T2 treatment increased fresh weight, dry weight, number of lateral branches, height, phosphorus, potassium, and relative water content compared to the control, significantly. Increasing humic acid up to 30 g decreased the phenols content from 48.59 in H0 to 39.88 mg.g<sup>-1</sup> fresh weight in H2. In T2, the phenols content increased by 2.37% compared to T0, which had a significant difference with the other treatments. Also, a similar trend was observed for the parameters like total flavonoids and proline. But increasing humic acid up to 30 g increased the amount of chlorophyll fluorescence by 70.79% compared to the control. Overall, the results indicated that the interaction of humic acid and titanium dioxide nanoparticles could improve the growth and plant yield parameters.

**Keywords:** Humic acid, *Withania coagulans* (Stocks) Dunal, phenolic content, yield, titanium dioxide.