Journal of Agroecology
Homepage: http://agry.um.ac.ir

Research Article
Vol. 16, No. 1, 2024, p. 97-113

The Effect of Animal Manure and Humic Acid on Some Physiological Traits of Cotton (*Gossypium hirsutum* L.) Under Irrigation Water Salinity Conditions

Mahboobeh Sardar[1], Mohammad Ali Behdani[2*], Seyd Vahid Eslami[3] and Gholam Reza Zamani[3]

1, PhD Student, 2 and 3, Professor and Associate Professor, Department of Plant Production and Genetics, Faculty of Agriculture, University of Birjand, Birjand, Iran, respectively.
(*- Corresponding author's Email: mabehdani@birjand.ac.ir)

Received: 19-07-2022
Revised: 17-09-2022
Accepted: 25-10-2022
Available Online: 25-10-2022

How to cite this article:
Sardar, M., Behdani, M. A., Eslami, S.V., & Zamani G. (2024). The Effect of Animal Manure and Humic Acid on Some Physiological Traits of Cotton (*Gossypium hirsutum* L.) Under Irrigation Water Salinity Conditions. *Journal of Agroecology*, *16*(1), 97-113. (In Persian with English abstract)
https://doi.org/10.22067/agry.2022.77656.1118

Introduction

Salinity stress is an important abiotic stress threatening the production of cotton in arid and semi-arid regions of the country and the world, which can be reduced by the proper use of organic materials. Cotton is the most important fiber product, which is widely cultivated for agricultural and industrial purposes in temperate and hot regions of more than 15 countries of the world. Although cotton is known as a salinity-tolerant plant, not only is the resistance to salinity limited in this plant, but different stages of development also show different reactions to salinity. One of the effects of stress is disturbing the nutritional balance in the plant. Proper nutrition during times of stress can partially help the plant deal with various environmental stresses. In this regard, by using fertilizers containing micronutrient elements, firstly, plant yield increases, secondly, increasing the concentration of these elements in agricultural products plays an important role in improving the quality of food consumption. Using organic fertilizers, especially organic and animal manure such as humic acid, can improve the performance and performance components of different products under stress conditions.

Materials and Methods

To study the effect of manure and humic acid on some of the physiological qualities of cotton under salt water salinity stress, an experiment was conducted as factorial split plots (factorial split plot) in which different levels of irrigation water salinity at three levels (2.5, 5.5 and 8.5 $ds.m^{-1}$) as the main factor and two treatments of manure at two levels (0 and 20 t/h) and humic acid at two levels (0 and 200 gr/100 kg of seeds) as sub-factor in 4 replications in a farm located in Boshrouyeh city in 1398 years. The software SAS (V9.1) and Excel were used to analyze the data and draw the figures. Means were compared using the FLSD test at a 5% probability level.

Results and Discussion

Analysis of variance results showed that the simple effects of three experimental factors (salinity stress, manure, and humic acid) were significant on all studied traits (on the relative water content, Electrical conductivity and membrane stability, chlorophyll a and b contents, and proline content). With increasing salinity level, increased proline content (286.5%), membrane Electrical conductivity (4.2%) and carotenoids (88.79%)

©2023 The author(s). This is an open access article distributed under Creative Commons Attribution 4.0 International License (CC BY 4.0), which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source.

https://doi.org/10.22067/agry.2022.77656.1118

and decreased chlorophyll a (20.7 1 %) and b content (39.38%), relative water content (23.16%) and membrane stability (13.54%). The application of animal manure and humic acid increased the relative water content, membrane stability and chlorophyll content under stress conditions, which indicates the modifying effect of these fertilizers in reducing the adverse effects of salinity stress. The interaction effects were significant, too.

Conclusion

The results of this research showed that the use of water with high salinity, such as salinity of 8 $ds.m^{-1}$, caused significant changes in the physiological traits of the plant, including relative leaf water content, membrane stability, membrane electrolyte leakage, chlorophylls, and proline. With increasing salinity levels, the amount of proline, membrane electrolyte leakage, and carotenoid increased, and the content of chlorophyll a and b, relative water content, and membrane stability decreased. The application of animal manure and humic acid increased the relative water content, membrane stability, and chlorophyll content under stress conditions, which indicates the moderating effect of these fertilizers in reducing the adverse effects of salinity stress. Considering the positive effects of using organic fertilizers in this experiment, it is recommended to test and investigate the use of humic acid during the growing season in addition to the use of animal manure before planting and the use of humic acid in bulk Thus, it is suggested to use humic acid and animal manure in cotton cultivation to adjust the salinity levels.

Keywords: Chlorophyll, Electrical conductivity, Proline, Relative water content

نشریه بوم شناسی کشاورزی
Homepage: http://agry.um.ac.ir

مقاله پژوهشی

جلد ۱۶، شماره ۱، بهار ۱۴۰۳، ص ۱۱۳-۹۷

تأثیر کود دامی و اسید هیومیک بر برخی صفات فیزیولوژیک پنبه (*Gossypium hirsutum* L.) در شرایط شوری آب آبیاری

محبوبه سردار[۱]، محمدعلی بهدانی[۲*]، سیدوحید اسلامی[۳] و غلامرضا زمانی[۳]

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۴/۲۸
تاریخ بازنگری: ۱۴۰۱/۰۶/۲۶
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۸/۰۳

چکیده

تنش شوری، یکی از مهم‌ترین تنش‌های غیر زیستی تهدیدکننده تولید پنبه در مناطق خشک و نیمه‌خشک کشور و جهان می‌باشد که با کاربرد مناسب مواد آلی می‌توان از تبعات آن کاست. به‌همین منظور، آزمایشی به‌صورت کرت‌های خرد شده در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی با چهار تکرار در مزرعه‌ای واقع در شهرستان بشرویه در سال ۱۳۹۸ انجام شد. سطوح مختلف شوری آب آبیاری در سه سطح (۲/۵، ۵/۵ و ۸/۵ دسی زیمنس بر متر) به‌عنوان فاکتور اصلی و دو تیمار کود دامی در دو سطح (صفر و ۲۰ تن در هکتار) و اسید هیومیک در دو سطح (صفر و ۲۰۰ گرم برای ۱۰۰ کیلوگرم بذر به‌صورت بذرمال) به‌عنوان فاکتورهای فرعی مورد بررسی قرار گرفتند. با توجه به نتایج، اثرات اصلی تنش شوری، کود دامی و اسید هیومیک بر محتوای نسبی آب، نشت الکترولیت و پایداری غشا، کلروفیل‌ها و پرولین معنی‌دار شد. با افزایش سطح شوری، میزان پرولین، نشت الکترولیت غشا و کارتنوئید افزایش و محتوای کلروفیل a و b، محتوای نسبی آب و پایداری غشا کاهش یافت. کاربرد کود دامی و اسید هیومیک موجب افزایش محتوای نسبی آب، پایداری غشا و میزان کلروفیل در شرایط تنش شد که نشان‌گر اثر تعدیلی این کودها در کاهش اثرات نامطلوب تنش شوری است. بنابراین، لستفاده از اسید هیومیک و کود دامی می‌توانند جهت تعدیل اثرات نامطلوب تنش شوری بر گیاه پنبه در اقلیم‌های گرم و خشک مورد استفاده قرار گیرند.

واژه‌های کلیدی: پرولین، کلروفیل، محتوای نسبی آب، نشت الکترولیت غشا

مقدمه

امروزه کشاورزی با مشکلات متعددی از قبیل کمبود آب آبیاری، شوری آب و خاک، کمبود مواد غذایی روبرو است که تنش شوری یکی از مهم‌ترین این تهدیدات برای کشاورزی است. تحت شرایط تنش شوری، جوانه‌زنی، رشد و نمو و تولید محصولات گیاهی تحت تأثیر قرار می‌گیرد و با کاهش مواجه می‌شود (Sun et al., 2018). بررسی آستانه تحمل شوری آب و خاک برای گیاهان مختلف و همچنین، نرخ متفاوت کاهش عملکرد به‌ازای هر واحد افزایش شوری نسبت به آستانه تحمل، نشان می‌دهد که گیاهان راهبردهای متفاوتی برای تحمل شوری دارند (Chinnusamy et al., 2005). طبق مطالعه انجام شده توسط مانس و تستر (Mouns & Tester, 2008)، آستانه تحمل شوری برای گیاه پنبه ۷/۷ دسی زیمنس بر متر عصاره اشباع و درصد کاهش عملکرد محصول به‌ازای هر واحد افزایش شوری ۵/۲ دسی‌زیمنس تخمین زده شده و بر این اساس، پنبه را جزو گیاهان مقاوم به شوری معرفی نمودند. بررسی‌های صورت گرفته، نشان می‌دهد که پنبه نسبت به شوری در مرحله جوانه‌زنی، ظهور گیاهچه و مراحل اولیه رشد و گل‌دهی در مقایسه با سایر مراحل رشد حساس‌تر است (Chen et al., 2010). شوری منابع آب و خاک باعث

۱، ۲ و ۳- به‌ترتیب دانشجوی دکترای، استاد و دانشیاران، گروه مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی. دانشگاه بیرجند، بیرجند، ایران.
(*- نویسنده مسئول: Email: mabehdani@birjand.ac.ir)
https://doi.org/10.22067/agry.2022.77656.1118

بروز تغییرات متعددی در گیاهان می‌شود. رشد گیاهان در شرایط تنش شوری ممکن است از طریق تغییرات پتانسیل اسمزی بر اثر پایین رفتن پتانسیل آب در محیط ریشه، یا بر اثر تاثیرات ویژه یون‌ها در فرایندهای متابولیکی، کاهش یابد (Narimani et al., 2016). از جمله تغییرات بیوشیمیایی که تحت تنش شوری رخ می‌دهد، افزایش تولید گونه‌های فعال اکسیژن است که باعث آسیب اکسیداتیو و آسیب غشای سلولی می‌شود (Jafari et al., 2022).

کاهش محتوای نسبی آب برگ نیز یکی پاسخ‌های عمومی گیاه به شرایط تنش اسمزی ناشی از تنش شوری می‌باشد (Mousavian Kalat et al., 2016). صدمه ناشی از عوامل تنش‌زای محیطی نظیر گرما، سرما، خشکی، شوری و بسیاری از عوامل تنش‌زای محیطی در مرحله اول بر روی غشاهای سلولی قابل مشاهده است. به‌طوری‌که در اثر اعمال تنش شوری نفوذپذیری غشا نیز تحت تأثیر قرار می‌گیرد. افزایش نشت الکترولیکی مواد نشانه‌ای از آسیب غشاها می‌باشد که احتمالاً نتیجه تنش اکسیداتیو منتج از تنش شوری است (Alilou et al., 2022). مطالعات بیوشیمیایی نشان داده است که در گیاهان تحت تنش شوری، تعدادی از ترکیبات آلی (محلول‌های سازگارکننده) تجمع می‌یابند. این ترکیبات تداخلی در فرایندهای شیمیایی گیاه وارد نمی‌کنند. از این ترکیبات می‌توان کربوهیدرات‌های محلول (مانیتول، ساکارز، رافینوز و الیگوساکاریدها) و ترکیبات نیتروژنه (اسید آمینه، پرولین و گلیسین) اشاره کرد (Narimani et al., 2016). با این حال، روش‌های مختلفی برای مقابله با شوری می‌توان بیان نمود که از جمله آن مدیریت صحیح زراعی در شرایط شور برای استفاده بهینه از منابع خاک و اب شور می‌باشد (Ardakani et al., 2015).

یکی از اثرات تنش، برهم زدن تعادل تغذیه‌ای در گیاه است. تغذیه مناسب در زمان تنش می‌تواند تا حدی به گیاه در مقابله با تنش‌های مختلف محیطی کمک کند. در این راستا، با مصرف کودهای محتوی عناصر ریزمغذی اولاً عملکرد گیاه افزایش می‌یابد، ثانیاً افزایش غلظت این عناصر در محصولات کشاورزی نقش مهمی در بهبود کیفیت مصرف غذایی دارد (Hashemi Fadaki et al., 2017). یکی از منابع مهم کودهای آلی، کود دامی می‌باشد که با آزادسازی تدریجی عناصر در خاک منجر به تقویت خاک و بهبود خواص فیزیکی خاک شده، لذا جذب مواد غذایی و آب در چنین شرایطی توسط ریشه‌های گیاه افزایش می‌یابد و از این طریقریال منجر به تعدیل اثرات تنش‌های محیطی بر گیاه می‌گردد (Rahmati et al., 2016). همچنینریال مصرف کود دامی باعث افزایش مقدار مواد آلی خاک می‌شود و در بهسازی خاک‌های شور و سدیمی به‌دلیل ایجاد شرایط فیزیکی بهتر سبب افزایش کارایی آبشویی در خاک‌های شور و بهسازی خاک‌های قلیا می‌گردد (Rezaei, 2012).

در بین کودهای سازگار با طبیعت، اسید هیومیک به‌عنوان یک اسید آلی بدون اثرات مخرب زیست‌محیطی باعث بهبود ساختار فیزیکی، شیمیایی و بیولوژیکی خاک شده و به‌دلیل دارا بودن ترکیبات هورمونی، اثرات مثبت قابل ملاحظه‌ای بر شاخص‌های کمّی و کیفی محصولات کشاورزی دارد (Ahmadi et al., 2021 ; Sabzevari et al., 2018). اسید هیومیک ترکیب پلیمری طبیعی آلی است که در نتیجه پوسیدگی مواد آلی خاک، پیت، لیگنین و غیره به‌وجود می‌آید که می‌تواند موجب افزایش عملکرد وکیفیت محصول شود (Ghorbani et al., 2018). کاربرد اسید هیومیک باعث بهبود خصوصیات شیمیایی خاک از طریق افزایش شمار ریزجانداران مفید خاک شده و موجب افزایش چرخش مواد ریزمغذی و کاهش pH خاک در کشت پنبه (Osman & Rady, 2012)، بهبود دسترسی مواد غذایی ضروری در محدوده ریزوسفر ریشه، آزادسازی اسیدهای آلی و افزایش اثربخشی مواد غذایی و شیمیایی، موجب افزایش جذب مواد ریزمغذی توسط گیاه پنبه و کاهش محتوای سدیم، قندهای محلول و پرولین در برگ پنبه تحت تنش شوری (Rady et al., 2016) شده است. تدین و همکاران (Tadin et al .,2017) بیان داشتند که کاربرد اسید هیومیک تأثیر مثبتی بر صفات مورفولوژیکی، فیزیولوژیکی و عملکرد ارقام پنبه در خاک‌های شور دارد. در پژوهش انجام شده توسط شریعتی‌نیا (Shariatinia et al., 2013) اسید هیومیک به‌طور معنی‌داری مقدار کلروفیل a، کارتنوئید، محتوای نسبی آب برگ و وزن خشک ساقه پنبه را در شرایط شوری آب آبیاری تحت تأثیر قرار داد. با توجه به اثرات منفی مصرف نهاده‌های شیمیایی بر شاخص‌های کیفی خاک با مصرف کودهای آلی به‌ویژه کود دامی و ارگانیک نظیر اسید هیومیک می‌توان موجب بهبود عملکرد و اجزای عملکرد محصولات مختلف در شرایط تنش گردید. بنابراین، هدف از آزمایش حاضر، استفاده از کود دامی (کود شتر) و اسید هیومیک تحت شرایط تنش شوری بر گیاه پنبه بر بود تا نقش این کودها در تعدیل اثرات تنش شوری مورد بررسی قرار گیرد و بهترین شرایط کاشت پنبه در مناطق گرم و خشک با کمبود آب و خاک‌های شور معرفی گردد.

مواد و روش‌ها

آزمایش در مزرعه‌ای واقع در شهرستان بشرویه استان خراسان جنوبی با عرض جغرافیایی۳۳/۵۴ درجه شمالی و طول جغرافیایی ۵۷/۲۷ درجه شرقی و ارتفاع ۸۸۵ متر از سطح دریا انجام گرفت. آزمایش مزرعه ای به‌صورت کرت‌های خرد شده (اسپلیت پلات فاکتوریل) در قالب بلوک‌های کامل تصادفی با چهار تکرار انجام شد که در آن سطوح مختلف شوری آب آبیاری در سه سطح (۲/۵، ۵/۵ و ۸/۵ دسی زیمنس بر متر) به‌عنوان فاکتور اصلی و دو تیمار کود دامی (در دو سطح: صفر و ۲۰ تن در هکتار بر اساس نیاز خاک‌های مناطق خشک و نیمه‌خشک) و اسید هیومیک (در دو سطح: صفر و ۲۰۰ گرم برای ۱۰۰ کیلوگرم بذر) نیز به‌صورت فاکتوریل در کرت‌های فرعی قرار گرفتند. از آنجا که آستانه تحمل شوری برای گیاه پنبه ۷/۷ دسی زیمنس بر متر عصاره اشباع و درصد کاهش عملکرد محصول به‌ازای هر واحد افزایش شوری ۵/۲ تخمین زده شده (Mouns & Tester., 2008)؛ در این آزمایش، سه سطح (یک سطح پایین‌تر، یک سطح در استانه تنش و یک سطح بالاتر) در نظر گرفته شد. در این آزمایش ابعاد کرت‌های فرعی سه در چهار متر و فاصله دو متر، فاصله تکرارها از هم نیز سه متر در نظر گرفته شد و گیاه پنبه با تراکم ۱۰ بوته در مترمربع کاشته شد. اسید هیومیک مورد استفاده با نام تجاری هیومیکس WSG-95 ساخت کشور آمریکا و دارای هیومات پتاسیم= ۸۰ درصد، اسید فولیک= ۱۵ درصد و اکسید پتاسیم=۱۲ درصد بود. برای تعیین خصوصیات فیزیکی و شیمیایی خاک مزرعه مورد مطالعه، قبل از کاشت از عمق ۰-۳۰ سانتی متر به‌منظور آزمون خاک و تعیین میزان کود مورد نیاز، نمونه‌برداری انجام شد و سپس، مقدار کودهای نیتروژن از نوع اوره، فسفر از نوع سوپر فسفات تریپل و پتاسیم از نوع سولفات پتاسیم بر اساس توصیه کودی مؤسسه تحقیقات پنبه کشور برای تمام تیمارها به‌صورت یکنواخت اضافه شد. تمام کود پتاسیم و فسفر قبل از کاشت و کود نیتروژن (اوره) در سه نوبت (شامل: هم زمان با کاشت، مرحله چهار برگی حقیقی و قبل از گل‌دهی به‌صورت مساوی) مصرف شد. جهت تعیین تغییرات شوری خاک، میزان EC خاک قبل و بعد از پایان آزمایش از عمق ۰-۳۰ سانتی متر اندازه‌گیری شد. قبل از انجام آزمایش، تجزیه آب آبیاری در هر سه سطح، جهت تعیین نوع نمک و pH انجام گرفت. از کود دامی نیز نمونه‌برداری و جهت تعیین EC آن مورد آزمایش قرار گرفت. مراحل آماده‌سازی زمین مطابق با عرف منطقه (شامل شخم عمیق، دیسک و تسطیح زمین) در اردیبهشت ماه سال ۱۳۹۸ انجام و کشت در نیمه دوم خرداد ماه ۱۳۹۸ به‌صورت دستی و کرتی انجام شد. با توجه به کشت غالب منطقه، در این آزمایش بذر رقم خرداد به‌میزان ۲۰ کیلوگرم بذر در هکتار استفاده شد. به‌دلیل افزایش سرعت جوانه‌زنی بذور پنبه بر اثر سهولت جذب آب و رطوبت اطراف و کاهش خسارت آفات و بیماری‌ها در هنگام جوانه‌زنی و خروج گیاهچه از خاک و در نتیجه، بهبود درصد جوانه‌زنی در خاک و ظهور یکنواخت گیاهچه، از بذرهای بدون کرک (دلینته) استفاده شد. تیمار کود گاوی در مراحل آماده‌سازی زمین قبل از کشت پنبه اعمال شد. تیمار اسید هیومیک به‌صورت بذرمال اعمال شد. بر اساس بروشور کود، مقدار اسید هیومیک مورد نظر (۲۰۰ گرم اسید هیومیک به‌ازای ۱۰۰ کیلوگرم بذر گیاه زراعی) در سه لیتر آب حل و بذور با آن آغشته شد و پس از خشک شدن در سایه، بلافاصله کشت انجام گرفت. آب مورد نیاز با شوری‌های مورد نظر از سه چاه موتور در اطراف مزرعه تأمین و با تانکر به محل مزرعه حمل و با استفاده از شلنگ به ابتدای هر کرت انتقال داده شد. حجم آب مورد نیاز در هر مرحله از آبیاری با استفاده از کنتور حجمی نصب شده در مسیر شلنگ انتقال آب در اختیار تیمارهای آزمایشی مورد نظر قرار گرفت و جهت تسریع انجام آبیاری از پمپ استفاده شد. به‌منظور جلوگیری از سله بستن خاک و بهبود وضعیت سبز گیاهچه‌های پنبه آبیاری دوم با فاصله ۱۰ روز بعد انجام گرفت. پس از استقرار کامل و در مرحله پنج تا شش برگی بوته‌ها، عملیات تنک کردن بوته‌ها به‌منظور دستیابی به تراکم مطلوب انجام شد. عملیات وجین جهت حذف علف‌های هرز به‌صورت دستی صورت گرفت. همچنین کنترل شیمیایی آفاتی نظیر تریپس، برای تمام تیمارها انجام شد. نمونه‌برداری جهت انجام صفات کیفی از برگ سبز گیاه در مرحله ابتدای غوزه‌دهی صورت گرفت.

جدول ۱- برخی خصوصیات فیزیکی و شیمیایی خاک محل اجرای آزمایش

Table 1- Some fundamental physical and chemical properties of the experimental site

بافت Texture	هدایت الکتریکی EC ($dS.m^{-1}$)	اسیدیته pH	نیتروژن کل Total N (%)	مواد آلی OM (%)	فسفر قابل جذب P ($mg.kg^{-1}$)	پتاسیم قابل دسترس K ($mg.kg^{-1}$)
لومی-رسی Loam-clay	2.5	7.8	0.024	0.2	8.4	135

محتوای نسبی آب: با استفاده از روش کامرون و همکاران (Cameron et al., 1999) تعیین شد. برای این منظور، یک گرم برگ سبز گیاه (آخرین برگ‌های گسترش یافته گیاه در مرحله ابتدای غوزه‌دهی) در یک استوانه مدرج حاوی ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر قرار داده و سپس، برای مدت ۲۴ ساعت در دمای اطاق نگهداری شد. پس از این مدت، برگ‌ها به‌دقت توسط دستمال کاغذی خشک و بلافاصله وزن آماس آن‌ها مورد سنجش قرار گرفت (TW[1]). سپس، برگ‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد در آون تا رسیدن به وزن ثابت خشکانده و وزن خشک آن‌ها تعیین شد (DW[2]). با قرار دادن اعداد در معادله ۱، میزان RWC محاسبه شد.FW[3] بیانگر وزن تازه برگ می‌باشد (Cameron et al., 1999).

معادله (۱) $RWC^{4}\ (\%) = [(FW-DW)/(TW-DW)]\times 100$

نشت الکترولیت غشا: با استفاده از روش شی و همکاران (Shi et al., 2008) تعیین شد. جهت تعیین میزان نشت الکترولیت سلول‌های برگ، یک گرم از نمونه‌های برگ سبز گیاه (آخرین برگ‌های گسترش یافته گیاه در مرحله ابتدای غوزه‌دهی) به‌طول یک سانتیمتر با آب مقطر شستشو و به‌مدت ۲۴ ساعت در دمای اتاق در ظروف شیشه ای ۷۵ میلی لیتری، حاوی ۲۰ میلی‌لیتر آب مقطر نگهداری شد. سپس هدایت الکتریکی محلول با استفاده از دستگاه سنجش هدایت الکتریکی تعیین شد (C1). پس از آن ظروف حاوی نمونه به‌مدت یک ساعت در بن ماری در دمای ۱۰۰ درجه سانتیگراد قرار گرفت و پس از سرد شدن، مجدداً هدایت الکتریکی آن تعیین شد (C2). در نهایت، با قرار دادن اعداد در معادله ۲، میزان نشت الکترولیت غشا برحسب درصد محاسبه شد.

معادله (۲) نشت الکترولیت از غشا (درصد) = $(C1/C2)\times 100$

اندازه‌گیری پایداری غشا: بر اساس روش سیرام و همکاران (Sairam et al., 2001) انجام شد. لوله ازمایش اول که حاوی ۱۰ میلی‌لیتر آب دیونیزه و ۰/۱ گرم نمونه برگ سبز گیاه (آخرین برگ‌های گسترش یافته گیاه در مرحله ابتدای غوزه‌دهی) می‌باشد، به مدت ۳۰ دقیقه در بن ماری ۴۰ درجه سانتی‌گراد (EC_{40}) و لوله آزمایش دوم که حاوی ۱۰ میلی‌لیتر اب دیونیزه و ۰/۱ گرم برگ می-باشد، به‌مدت ۱۰ دقیقه در بن ماری ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد (EC_{100}) قرار گرفتند. سپس لوله‌ها را جهت کاهش دما و رسیدن دما به دمای محیط در یخچال گذاشته و پس از تعدیل دما، میزان نشت الکترولیت آن‌ها را با دستگاه EC متر خوانده و طبق معادله ۳ میزان پایداری غشا (MSI) آن‌ها سنجیده شد (Sairam et al., 2001):

معادله (۳) $MSI^{a}= 1- (EC40/ EC100)$

رنگیزه‌های فتوسنتزی: ۰/۱ گرم برگ به‌دقت توزین و در هاون چینی با استفاده از نیتروژن مایع خرد گردید. سپس با افزودن ۱۰ میلی لیتر استون ۸۰ درصد در دستگاه سانتریفیوژ با سرعت ۶۰۰۰ دور در دقیقه به‌مدت ۱۰ دقیقه قرار داده شدند. عصاره جدا شده حاصل از سانتریفیوژ در داخل لوله آزمایش ریخته شد، پس از آن جذب محلول با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج‌های ۴۷۰، ۶۴۷، ۶۶۳ نانومتر اندازه‌گیری شد. از استون ۸۰ درصد نیز به عنوان محلول شاهد برای تنظیم صفر جذب نوری اسپکتروفتومتر استفاده شد. اندازه‌گیری کلروفیل a، b و کاروتنوئید در مرحله گل‌دهی کامل انجام گرفت. واحد اندازه‌گیری میلی‌گرم در میلی لیتر عصاره گیاهی بود (Lichtenthder, 1987).

معادله (۴) $Cha^{6}=11.5A663-2.79A647$

$Chb^{7}=21.5A647-5.7A663$

$C(X+C)^{8}= (1000A470-1.8Ca-85.02Cb)/198$

1- Total weight
2- Dry weight
3- Fresh weight
4- Relative Water Content

5- Membrane Stability Index
6- Chlorophyll a
7- Chlorophyll b
8- Carotenoids

در معادله‌های فوق، Cha: کلروفیل a، Chb: کلروفیل b، $C(x+c)$: میزان کاروتنوئیدها و A: میزان جذب در طول موج‌های مختلف است.

پرولین: برای سنجش اسید آمینه پرولین از هر تیمار نمونه‌هایی را به‌صورت تازه برداشت شد و به‌مدت ۲۴ ساعت در فریزر با دمای منفی ۲۰ درجه قرار داده شد. جهت سنجش، مقدار پرولین با روش بیز و همکاران (Bates et al., 1973) استخراج شد. در این روش، با استفاده از سولفوسالسیلیک اسید سه درصد، اسید آمینه پرولین از بافت خشک گیاهی استخراج و با معرف ناین هیدرین رنگ‌آمیزی شد، سپس میزان جذب نوری محلول حاصل در طول موج ۵۲۰ نانومتر با دستگاه طیف‌سنج نوری قرائت شد. غلظت نهایی پرولین با استفاده از منحنی استاندارد محاسبه گردید .

تحلیل آماری: محاسبات آماری با استفاده از نرم‌افزار SAS (9.3)، مقایسه میانگین‌ها نیز از توسط آزمون حداقل تفاوت معنی‌دار (LSD) در سطح احتمال پنج درصد انجام شد. جهت رسم نمودارها نیز از نرم‌افزار Excel استفاده شد.

نتایج و بحث:

محتوای نسبی آب

نتایج تجزیه واریانس داده‌ها (جدول ۲) نشان داد که اثر شوری، کود دامی و اسید هیومیک هرکدام به‌تنهایی بر صفت محتوای نسبی آب معنی‌دار شد ($p\leq0.01$). با توجه به نتایج جدول ۳، افزایش شدت شوری آب آبیاری (دسی زیمنس بر متر) سبب کاهش محتوای نسبی آب برگ شد. بیشترین مقدار این صفت در تیمار شوری ۲/۵ دسی زیمنس بر متر (۸۲/۸۸) و کمترین مقدار آن در تیمار شوری ۸/۵ دسی زیمنس بر متر (۶۳/۶۸) مشاهده گردید. این کاهش میزان رطوبت نسبی اندام‌های هوایی یک پاسخ عمومی به شرایط تنش اسمزی است. میزان رطوبت اندام‌های هوایی به‌عنوان فاکتوری برای تعیین سطح آب گیاه شناخته شده است که منعکس‌کننده فعالیت‌های متابولیکی در بافت گیاهی است (Taghizadeh, 2016). کاهش میزان رطوبت نسبی اندام‌های هوایی یک فشار تورژسانسی است که سبب کاهش آب مورد نیاز برای فرایندهای مورفولوژیکی و فیزیولوژیکی از قبیل طویل شدن سلولی، باز شدن روزنه‌ها و فرایندهای وابسته به فتوسنتز است (Jafari et al., 2022). نتایج آزمایش تقی‌زاده (Taghizadeh, 2016) مؤید کاهش محتوای نسبی آب برگ با افزایش شدت تنش شوری در ارقام مختلف گیاه پنبه بود. جعفرآقایی و همکاران (JafarAqhaei et al., 2016) در تأیید نتایج به‌دست آمده بیان کردند که اثر تنش شوری بر محتوای نسبی آب برگ در گیاه پنبه، در روزهای مشخصی پس از کاشت معنی‌دار بود و کمترین میزان آن در تیمار شوری ۱۲ دسی زیمنس بر متر و بیشترین میزان آن در تیمار شوری ۴ دسی زیمنس بر متر حاصل شد.

از طرفی، کاربرد کود دامی و اسید هیومیک به‌عنوان تعدیل‌کننده‌های تنش شوری به‌ترتیب موجب افزایش ۵/۰۵ و ۵/۱۵ درصدی محتوای نسبی آب برگ در مقایسه با شاهد (عدم کاربرد کود) شد (جدول۲). اثرات متقابل دو و سه فاکتوره تأثیر معنی‌داری بر صفت مورد نظر نداشت. مقایسه میانگین اثرات اصلی نشان داد که هرچند با افزایش سطوح شوری محتوای نسبی آب کاهش پیدا کرد، امّا کاربرد کود دامی و اسید هیومیک منجر به افزایش محتوای نسبی آب نسبت به شرایط شاهد گردید. در همین رابطه، نریمانی و همکاران (Narimani et al., 2016) کاهش محتوای نسبی آب برگ گیاه بادرشبی را گزارش کردند و بیان کردند که کاربرد اسید هیومیک توانست تا حدودی منجر به تعدیل اثرات ناشی از تنش شوری گردید.

نشت الکترولیت غشا و پایداری غشا

نتایج تجزیه واریانس داده‌ها (جدول ۲) نشان داد که اثر شوری، کود دامی و اسید هیومیک بر صفت نشت الکترولیت غشا و پایداری غشا معنی‌دار شد($p\leq0.01$). با افزایش شوری آب آبیاری از ۲/۵ دسی زیمنس بر متر به ۵/۵ و ۸/۵ دسی زیمنس بر متر، میزان نشت الکترولیت غشا افزایش و پایداری غشا کاهش پیدا کرد. صدمه ناشی از عوامل تنش زای محیطی نظیر گرما، سرما، خشکی، شوری و آبیاری از عوامل تنش‌زای محیطی در مرحله اول بر روی غشاهای سلولی قابل مشاهده است. به‌طوری‌که در اثر اعمال تنش شوری، نفوذپذیری غشا نیز تحت تأثیر قرار می‌گیرد. با توجه به نتایج، می‌توان گفت که با افزایش شوری، غشای سیتوپلاسمی آسیب می‌بینند و به همین خاطر، پایداری آن کم و میزان نشت الکترولیت غشا از آن افزایش می‌یابد. تقی‌زاده (Taghizadeh, 2016) نیز بیان داشتند با افزایش سطوح شوری، میزان نشت الکترولیتی مواد از غشا در ارقام مختلف پنبه افزایش یافته است. افزایش نشت الکترولیتی مواد نشاسته‌ای از آسیب غشاها و کاهش پایداری غشا می‌باشد که احتمالاً نتیجه تنش اکسیداتیو منتج از شوری است (Besma & Denden., 2012). افزایش نشت الکترولیتی غشا در نتیجه افزایش شوری، در

اسفناج (*Spinacia oleracea*) (Kaya et al., 2017)، گندم (*Triticumn aestivum* V.) (Farhoudi., 2011)، پنبه (*Gossypium herbaceum* L.) (JafarAghayi et al., 2016) بادرشبی (*Dracocephalum moldavica* L.) (Narimani et al., 2016) نیز گزارش شده است. نتایج مشابه اثر تنش شوری روی کاهش پایداری غشا در گیاهان کلزا (*Brassica napus* L.) (Alilou et al., 2022)، گندم (*Triticumn aestivum* V) (Davoudifard et al., 2013)، گوجه‌فرنگی (*Lycopersicon esculentum* Mill) (Tabatabaian., 2013)، کاهو (*Lactuca sativa*) (Fatahi et al., 2016)، اسپرس (*Onobrychis altissima*) (Ramek et al., 2013) و چغندرقند (*Beta vulgaris*) (Mohammadi Chiragabadi et al., 2014) گزارش شده است.

جدول ۳- مقایسه میانگین اثر سطوح مختلف تنش شوری، کود دامی و اسید هیومیک بر صفات پنبه

Table 3- The mean comparison of the effect of different levels of salinity stress, manure, and humic acid on cotton traits

تیمار Treatments	محتوای نسبی آب Relative water content (%)	نشت الکترولیت غشا Membrane electrolyte leakage (%)	پایداری غشا Membrane stability	کلروفیل a Chlorophyll a (mg.g FW^{-1})	کلروفیل b Chlorophyll b (mg.g FW^{-1})	کارتنوئید Carotenoid (mg.g FW^{-1})	پرولین Proline
S_1	82.87	36.9	75.18	3.708	13.56	0.857	5.75
S_2	72.62	37.9	69.37	3.116	9.51	0.988	14.20
S_3	63.68	38.48	65	2.94	8.22	1.618	29.96
LSD (5%)	0.944	0.097	0.433	0.044	0.051	0.22	0.29
A_1	71.16	38.53	66.87	3.14	10.56	1.105	17.66
A_2	74.95	37.05	72.83	3.37	10.95	1.204	15.61
LSD (5%)	0.516	0.197	0.423	0.025	0.031	0.033	0.233
H_1	71.02	38.17	68.45	3.164	10.6	1.12	17.30
H_2	74.88	36.42	71.25	3.35	10.91	1.18	15.98
LSD (5%)	0.516	0.197	0.423	0.025	0.031	0.023	0.23
S_1A_1	76.25	37.7	61.25	3.52	14.22	0.83	6.6
S_1A_2	78	36.95	65.25	3.69	14.54	0.86	5.62
S_2A_1	71.5	38.87	66.75	3.02	9.04	096	15.97
S_2A_2	75.5	37.52	70.25	3.14	9.59	0.98	13.9
S_3A_1	62.25	40.1	71	2.76	8.07	1.45	23.8
S_3A_2	67	37.87	76.25	2.84	8.26	1.62	28.9
LSD (5%)	0.309	0.92	0.918	0.041	0.051	0.038	0.413
A_1H_1	70.33	38.89	6.33	3.10	10.44	1.08	18.45
A_1H_2	73.91	38.17	67.41	3.17	10.68	1.12	16.86
A_2H_1	72.85	37.45	70.58	3.22	10.76	1.15	16.14
A_2H_2	76	36.66	75.08	3.52	11.13	1.25	15.09
LSD (5%)	0.259	0.259	0.759	0.036	0.044	0.029	0.239
S_1H_1	81.87	81.87	37.32	3.6	14.38	0.85	6.11
S_1H_2	83.87	36.66	66.75	3.8	14.69	0.863	5.4
S_2H_1	71.75	37.32	38.20	3.83	9.32	0.976	14.93
S_2H_2	73.5	36.66	37.61	3.38	3.70	1	13.46
S_3H_1	62.75	38.20	38.98	2.8	8.11	1.537	30.85
S_3H_2	64.62	37.61	37.98	3.098	8.33	1.70	29.07
LSD (5%)	0.317	0.914	0.929	0.044	0.054	0.036	0.430

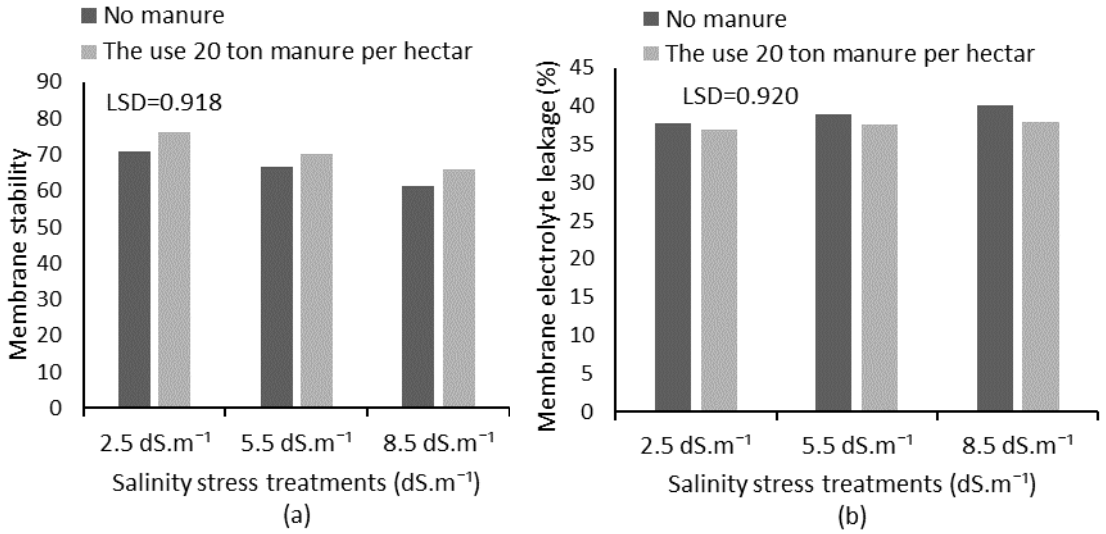
S_1 (تنش شوری ۲/۵ دسی زیمنس بر متر) S_2 (تنش شوری ۵/۵ دسی زیمنس بر متر)؛ S_3 (تنش شوری ۸/۵ دسی زیمنس بر متر) A_1 (عدم مصرف کود دامی) A_2 (کود دامی ۲۰ تن در هکتار) H_1 (عدم مصرف اسید هیومیک) H_2 (مصرف ۱۰۰ گرم اسید هیومیک برای ۱۰۰ کیلوگرم بذر)

S_1 (salinity Stress 2.5 deciSiemens/meter) S_2 (salinity Stress 5.5 deciSiemens/meter) S_3 (salinity Stress 8.5 deciSiemens/meter) A_1 (no use of manure), A_2 (use of manure 20 tons per hectare) H_1 (No use of humic acid) H_2 (Use of 100 grams of humic acid for 100 kg of seeds)

اثر اصلی کود دامی و اسید هیومیک بر هر دو صفت مورد نظر در سطح احتمال پنج درصد معنی‌دار شد (جدول ۲). استفاده از کود دامی موجب افزایش پایداری غشا و کاهش نشت الکترولیت غشا شد که خود در افزایش مقاومت گیاه به شرایط تنش بسیار مؤثر است (جدول

۲). استفاده از اسید هیومیک نیز تأثیر مثبتی در تعدیل تنش شوری با کاهش میزان نشت الکترولیت غشا (۴/۵۸ درصد) و افزایش پایداری غشا (۴/۰۹ درصدی) داشت (جدول ۳). اثرات تعدیلی تیمار اسید هیومیک بر پایداری غشا در سطوح مختلف تنش شوری در گیاهان ذرت (*Zea mays* L.) (Kaya et al., 2018)، آرابیدوپسیس (*Arabidopsis thaliana*) (Khan et al., 2013)، کلزا (*Brassica napus* L.) (Alilou et al., 2022) و بادام (*Amygdalus communis* L) (Hatami et al., 2018) گزارش شده است.

اثر متقابل تنش شوری و کاربرد کود دامی بر صفت نشت الکترولیت غشا معنی‌دار شد. نتایج مقایسه میانگین نشان داد که کاربرد کود دامی تا حدودی منجر به کاهش میزان نشت الکترولیت غشا شده است (شکل ۱)



شکل ۱- اثر متقابل کود دامی و تنش شوری بر میزان پایداری غشا (a) و میزان نشت الکترولیت غشا (b) در پنبه

Fig. 1- The interaction effect of animal manure and salinity stress on membrane stability (a) and membrane electrolyte leakage (b) in cotton (b) in cotton

با توجه به جدول تجزیه واریانس (جدول ۲)، اثر متقابل شوری × کود دامی، شوری × اسید هیومیک و کود دامی × اسید هیومیک نیز بر صفت پایداری غشا معنی‌دار بود. نتایج مقایسه میانگین داده‌های حاصل از آزمایش نشان دادکه کمترین (۳۶/۹۵) و بیشترین (۴۰/۱) میزان پایداری غشا به‌ترتیب از تیمارهای عدم مصرف کود دامی و سطح تنش شوری ۸/۵ دسی زیمنس بر متر و مصرف کود دامی و سطح تنش شوری ۲/۵ دسی زیمنس بر متر به‌دست آمد (جدول ۲). استفاده از اسید هیومیک در شوری ۸/۵ دسی زیمنس بر متر موجب افزایش ۴/۰۸ درصدی پایداری غشا در مقایسه با عدم کاربرد آن شد (جدول ۲). کاربرد هم زمان کود دامی و اسید هیومیک نیز موجب بهبود پایداری غشا شد، بیشترین میزان آن در تیمار کاربرد کود دامی و اسید هیومیک (۷۵/۰۸) و کمترین میزان آن در تیمار عدم کاربرد آن‌ها (۶۶/۳۳) حاصل شد.

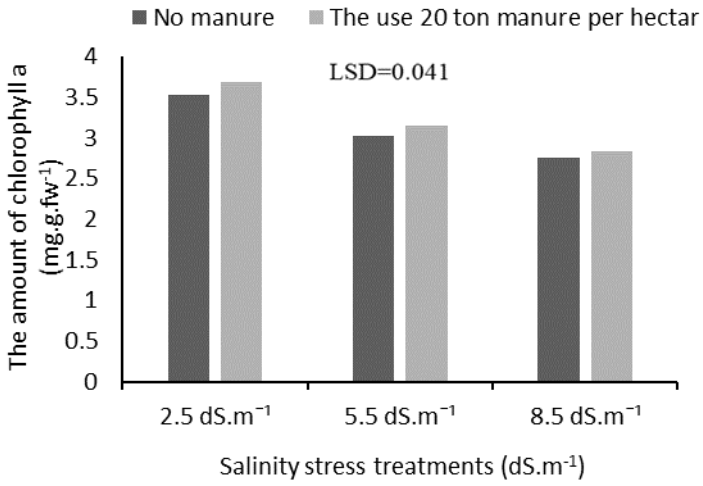
رنگیزه‌های فتوسنتزی (کلروفیل a، کلروفیل b و کارتنوئید)

نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده‌ها (جدول ۲) نشان داد که اثر شوری بر کلروفیل a در سطح احتمال آماری یک درصد معنی‌دار شد. بیشترین میزان کلروفیل a در تیمار تنش شوری ۲/۵ دسی زیمنس بر متر (۳/۷) و کمترین میزان آن در تیمار شوری ۸/۵ دسی زیمنس بر متر (۲/۹۴) به‌دست آمد (شکل ۲). یکی از مهم‌ترین دلایل کاهش کلروفیل‌ها با افزایش شوری، تخریب آن‌ها احتمالاً به‌وسیله گونه‌های فعال اکسیژن حاصل شده در شرایط تنش می‌باشد (Karimzadeh et al., 2014). تقی‌زاده و همکاران (Taghizadeh, 2016)، کاهش کلروفیل a را در ارقام مختلف پنبه با افزایش سطوح تنش شوری، گزارش کردند. کاهش مقدار کلروفیل a برگ در حضور شوری در گیاهان ماش (*Vigna radiata* L.) (Saha et al., 2010)، خیار (*Cucumis sativus*) (Khan et al., 2013) و کلزا (*Brassica*

napus L.) (Alilou et al., 2022) گزارش شده است.

مصرف کود دامی موجب افزایش ۶/۸ درصدی میزان کلروفیل a در مقایسه با تیمار عدم کاربرد کود دامی شد که نشان‌دهنده اثر معنی‌دار این تیمار می‌باشد(جدول ۲ و ۳). از طرفی، کاربرد اسید هیومیک نیز موجب افزایش معنی‌دار میزان کلروفیل a نسبت به شرایط عدم مصرف اسید هیومیک شد. در گیاه کلزا (*Brassica napus* L.) (Alilou et al., 2022) و گندم (*Triticumn aestivum* V) (Farhoudi, 2012) نیز افزایش میزان کلروفیل a با مصرف اسید هیومیک بیان شده است.

نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که اثر متقابل کود دامی و تنش شوری، اسید هیومیک و تنش شوری، کود دامی و اسید هیومیک بر صفت مورد نظر معنی‌دار شده است ($p\leq0.1$). بیشترین میزان کلروفیل a در تیمار کاربرد کود دامی و تنش شوری ۲/۵ دسی زیمنس بر متر (۳/۶۹ میلی‌گرم بر گرم وزن تر) و کمترین میزان آن در تیمار عدم کاربرد کود دامی در تنش شوری ۸/۵ دسی زیمنس بر متر (۲/۷۶ میلی‌گرم بر گرم وزن تر) حاصل شد (شکل ۲).



شکل ۲- تأثیر کود دامی و تنش شوری بر میزان کلروفیل a برگ در پنبه

Fig. 2- The effect of animal manure and salinity stress on leaf chlorophyll a content in cotton

استفاده از اسید هیومیک در شرایط شوری آب آبیاری موجب افزایش معنی‌دار میزان کلروفیل a شد (جدول ۳). با مصرف اسید هیومیک در شرایط شوری آب ۲/۵، ۵/۵ و ۸,۵ دسی زیمنس بر متر به‌ترتیب ۵/۲۵، ۸/۹۸ و ۹/۶۲ درصد افزایش در میزان کلروفیل a نسبت به تیمار عدم کاربرد اسید هیومیک در همان تیمار شوری حاصل شد (جدول ۳). در گیاه کلزا نیز با مصرف اسید هیومیک در شرایط تنش شوری موجب افزایش میزان کلروفیل a در برگ‌ها شد (Alilou et al., 2022). اسید هیومیک به‌عنوان یک ماده آلی علاوه‌بر بهبود شرایط خاک و جذب بهتر مواد غذایی توسط گیاه موجب افزایش سبزینگی گیاه و کلروفیل برگ می‌شود (Roshni et al., 2013).

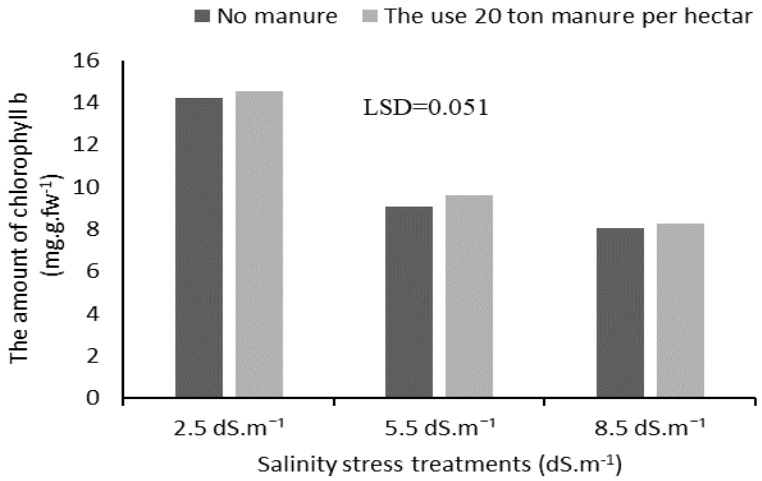
کلروفیل b

نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که اثر شوری بر کلروفیل b در سطح احتمال آماری یک درصد معنی‌دار شد (جدول ۲). بیشترین میزان کلروفیل b در تیمار تنش شوری ۲/۵ دسی زیمنس بر متر (۱۴/۵۶ میلی‌گرم بر گرم وزن تر) و کمترین میزان آن در تیمار شوری ۸/۵ دسی زیمنس بر متر (۸/۲۲ میلی‌گرم بر گرم وزن تر) به‌دست آمد (جدول ۳). یکی از آثار شوری در گیاه، کاهش فعالیت فتوسنتزی است که موجب کاهش بیوسنتز کلروفیل (a و b)، کاهش کارایی دستگاه فتوسنتزی می‌گردد (Roshni et al., 2013; Jafari et al., 2022).

اثر اصلی کود دامی و اسید هیومیک نیز بر این صفت معنی‌دار شد (جدول ۲). مصرف کود دامی موجب افزایش ۳/۶۹ درصدی میزان کلروفیل b در مقایسه با تیمار عدم کاربرد کود دامی شد که نشان‌دهنده اثر معنی‌دار این تیمار می‌باشد (جدول ۲ و ۳). از طرفی، کاربرد اسید هیومیک نیز موجب افزایش معنی‌دار میزان کلروفیل b نسبت به شرایط عدم مصرف اسید هیومیک شد. بیشترین کلروفیل b

از تیمار کاربرد اسید هیومیک با (۱۰/۹۱ میلی‌گرم بر گرم وزن تر) و کمترین میزان آن از تیمار عدم کاربرد اسید هیومیک (۱۰/۶۰ میلی‌گرم بر گرم وزن تر) به‌دست آمد (جدول ۳). افزایش میزان کلروفیل در اثر کاربرد اسید هیومیک را می‌توان به‌دلیل افزایش جذب عناصر غذایی توسط گیاه نسبت داد (Rashidi Fard et al., 2019). مشاهدات آیدین و همکاران (Aydin et al., 2012) نشان داد که کاربرد اسید هیومیک در شرایط تنش شوری، باعث افزایش مقدار کلروفیل گیاه لوبیا می‌شود. به‌طور مشابه با این پژوهش، کایا و همکاران (Kaya et al., 2017)، رشیدی فرد و همکاران (Rashidi Fard et al., 2019) نیز افزایش مقدار کلروفیل ذرت در اثر کاربرد اسید هیومیک را در شرایط تنش شوری گزارش کردند. کاربرد اسید هیومیک در شرایط تنش شوری در گیاه گندم نیز موجب افزایش میزان کلروفیل تولیدی شد (Davoudifard et al., 2013).

با توجه به جدول تجزیه واریانس، اثر متقابل شوری و کود دامی بر صفت مورد نظر معنی‌دار شد (جدول ۲). همان‌طور که در نمودار نیز دیده می‌شود، با افزایش شدت تنش شوری، میزان کلروفیل b به‌شدت کاهش پیدا می‌کند، امّا مصرف کود دامی تا حدودی توانست موجب بهبود این صفت در شرایط تنش شود (شکل ۳).



شکل ۳- اثر متقابل کود دامی و شوری بر میزان کلروفیل b در برگ پنبه

Fig. 3- The interaction effect of animal manure and salinity on the amount of chlorophyll b in cotton leaves

نتایج تجزیه واریانس داده‌ها (جدول ۲) نشان داد، اثر متقابل کود دامی، اسید هیومیک در شرایط اعمال تیمار شوری، در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار شد (جدول ۲). بیشترین میزان کلروفیل b در تیمار مصرف کود دامی و اسید هیومیک در شرایط تنش شوری ۲/۵ دسی زیمنس بر متر (۱۴/۹۶ میلی‌گرم بر گرم وزن تر) و کمترین میزان کلروفیل b در تیمار عدم مصرف کود دامی و اسید هیومیک در شرایط تنش شوری ۸/۵ دسی زیمنس بر متر (۸/۰۷ میلی‌گرم بر گرم وزن تر) حاصل شد. در هر تیمار شوری، کاربرد هم زمان کود دامی و اسید هیومیک موجب بهبود تولید کلروفیل b در مقایسه با شاهد در همان شوری شده است (جدول ۳ و شکل ۴).

کارتنوئیدها

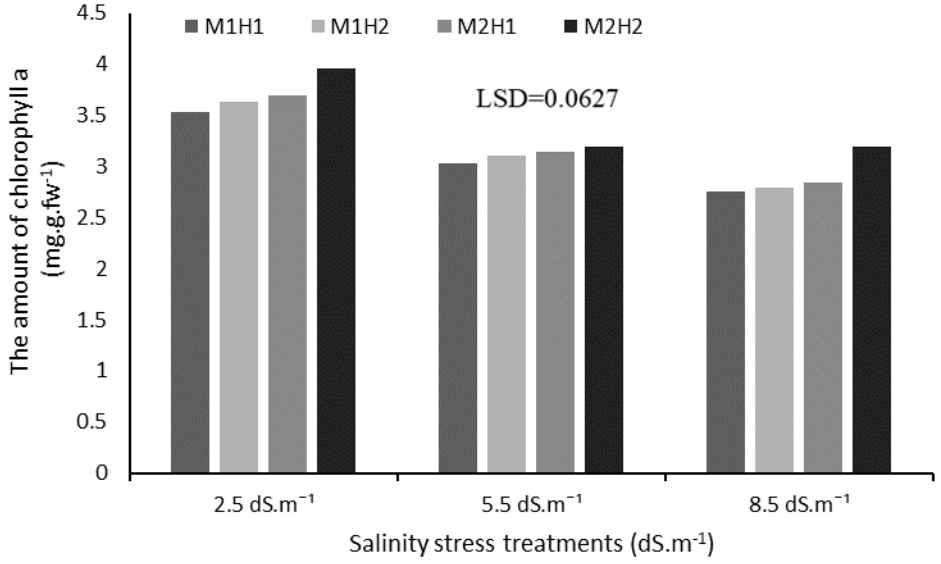
مطابق جدول مقایسه میانگین، با افزایش شوری، میزان کارتنوئیدها افزایش پیدا کرد (جدول ۳). این افزایش معنی‌دار بود (جدول ۲). بیشترین میزان کارتنوئید در تیمار شوری ۸/۵ دسی زیمنس بر متر با ۱/۶۱ میلی‌گرم بر گرم وزن تر مشاهده شد که نسبت به تیمارهای شوری ۲/۵ و ۵/۵ دسی زیمنس بر متر به‌ترتیب ۴۷/۰۳ و ۳۸/۹۴ درصد افزایش داشت (جدول ۲). اثر اصلی اسید هیومیک و کود دامی نیز بر صفت مورد نظر معنی‌دار بود (جدول ۱). برخلاف کلروفیل‌ها، کارتنوئید یک روند افزایشی در هر دو رقم پنبه تحت تنش شوری مورد مطالعه در آزمایش تقی‌زاده و همکاران (Taghizadeh, 2016) نشان دادند که مؤید نتایج این تحقیق می‌باشد. گزارش شده است که کارتنوئیدها نقش مهمی در از بین

بردن ROS ایفا می‌کنند، بنابراین از غشا در برابر تنش شوری محافظت می‌کنند (Fathi Saadabadi et al., 2016).

با کاربرد کود دامی، میزان کارتنوئید تولیدی، ۸/۲۴ درصد افزایش نسبت به تیمار عدم کاربرد آن نشان داد (شکل ۵ ب). مصرف اسید هیومیک نیز موجب افزایش معنی‌دار (۵/۰۸ درصد) صفت مورد نظر نسبت به شاهد شد (شکل ۵ الف). اثر متقابل کود دامی و تنش شوری، اسید هیومیک و تنش شوری بر میزان کارتنوئید در سطح احتمال یک درصد نیز معنی‌دار شد (جدول ۳). کمترین میزان کارتنوئید در تیمار عدم مصرف کود دامی در شرایط شوری ۲/۵ دسی زیمنس بر متر (۰/۸۳ میلی‌گرم بر گرم وزن تر برگ) و بیشترین میزان آن در تیمار کاربرد کود دامی در تیمار شوری ۸/۵ دسی زیمنس بر متر (۱/۶۲ میلی‌گرم بر گرم وزن تر) مشاهده شد (جدول ۳ و شکل ۵ ب). مصرف اسید هیومیک نیز موجب افزایش میزان کارتنوئید تولید شده توسط گیاه با افزایش میزان شوری شد، بیشترین میزان کارتنوئید در تیمار کاربرد اسید هیومیک در شوری ۸/۵ دسی زیمنس بر متر (۱/۷ میلی‌گرم بر گرم وزن تر) مشاهده شد (جدول ۳، شکل ۵ الف).

میزان پرولین

میزان پرولین با افزایش شوری، به‌طور معنی‌داری ($p<0.001$) افزایش یافت (جدول ۲). بشترین میزان آن، در تیمار شوری ۸/۵ دسی زیمنس بر متر (۲۹/۹۶ میلی‌گرم در گرم وزن خشک) و کمترین میزان آن در تیمار شوری ۲/۵ دسی زیمنس بر متر (۵/۷۵ میلی‌گرم در گرم وزن خشک) مشاهده شد. همان‌طور که مشخص است، افزایش پرولین در گیاهان به‌هنگام تنش، نوعی سازوکار دفاعی است. پرولین با چندین سازوکار مانند تنظیم اسمزی، جلوگیری از تخریب آنزیم‌ها، حفظ و سنتز پروتئین و پرولین، مقاومت گیاه را در برابر تنش‌ها بالا می‌برد (Narimani et al., 2016). میرقاسمی و همکاران (Mirghasemi et al., 2013)، علت افزایش قابل توجه میزان پرولین سه رقم پنبه را در شوری ۲۹/۹ دسی زیمنس بر متر را، پاسخ گیاه به تنش به‌عنوان یک مکانیزم مقاومت در ارقام مختلف پنبه گزارش کردند. اثر شوری بر تجمع پرولین در بسیاری از گونه‌های گیاهی نظیر چغندقند، گوجه‌فرنگی، برنج و توت گزارش شده است (Wanichan et al., 2003). با افزایش شوری از ۵۰ میلی مول به ۱۰۰ میلی‌مول، محتوای پرولین برگ‌ها در گیاه پنبه، سه برابرافزایش یافت (Elbaz et al., 2003).

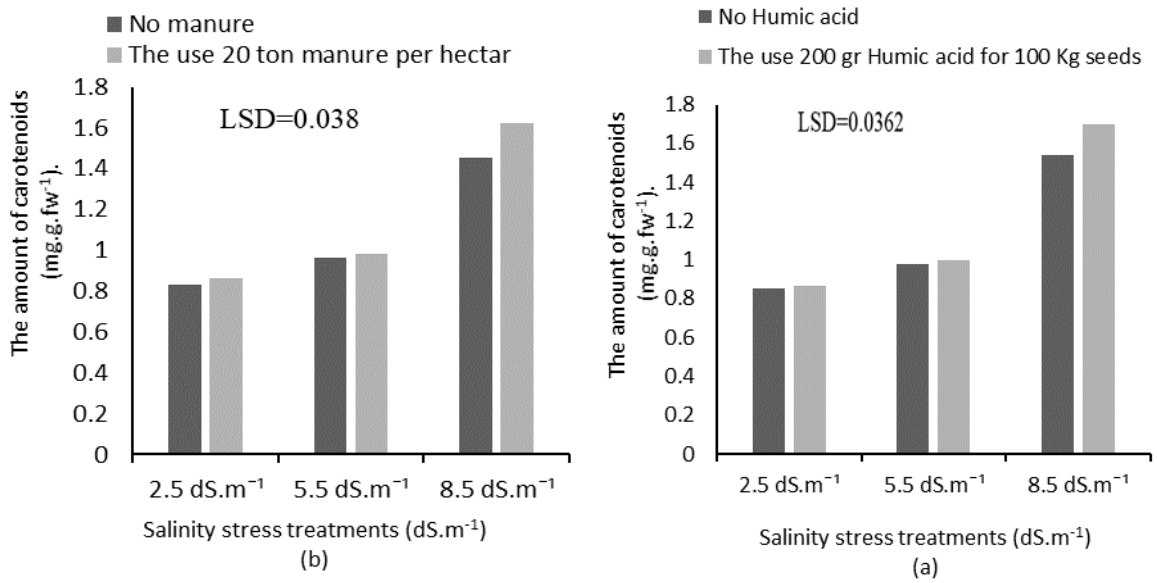


شکل ۴- اثر هم زمان سه فاکتور اصلی بر میزان کلروفیل a در گیاه پنبه

Fig. 4- The effect of three main factors on the amount of chlorophyll a in cotton plants

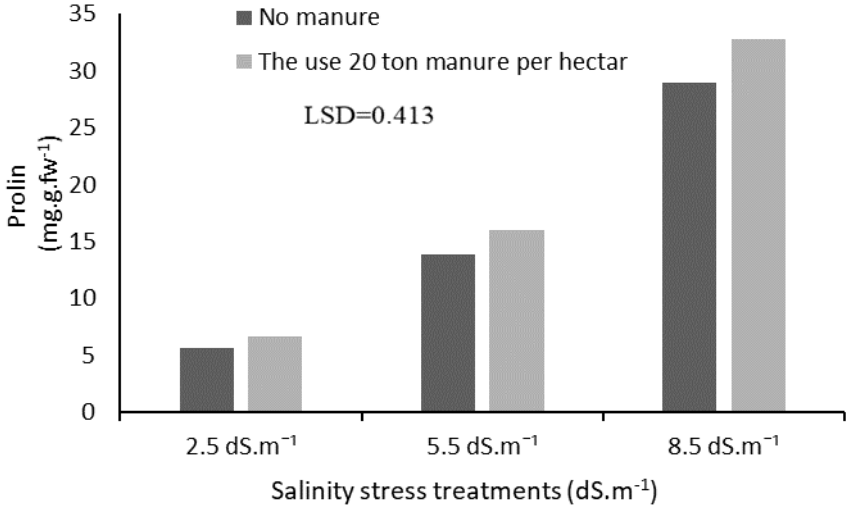
M_1: عدم مصرف کود دامی، M_2: مصرف ۲۰ تن کود دامی در هکتار، H_1: عدم مصرف اسید هیومیک، H_2: مصرف ۲۰۰گرم اسید هیومیک برای ۱۰۰کیلوگرم بذر

M_1: No use of animal manure, M_2: The use of 20 tons of animal manure per hectare, H_1: No use of humic acid, H_2: The use of 200 grams of humic acid for 100 kg seeds



شکل ۵- تأثیر تیمارهای مختلف اسید هیومیک(الف) و کود دامی (ب) بر میزان کارتنوئید برگ پنبه

Fig. 5- The effect of different treatments of humic acid (a) and animal manure (b) on the amount of carotenoids in cotton leaves



شکل ٦- تأثیر تیمارهای مختلف کود دامی در شرایط تنش شوری آب آبیاری بر میزان پرولین در گیاه پنبه

Fig. 6- The effect of different manure treatments on the amount of proline in cotton plants under the conditions of irrigation water salinity stress

با توجه به نتایج تجزیه واریانس، کاربرد کود دامی در شرایط اعمال تنش شوری، موجب افزایش معنی‌دار پرولین شد. با توجه به جدول مقایسه میانگین، بیشترین میزان پرولین در تیمار کاربرد کود دامی (۱۷/۶۶ میلی‌گرم در گرم وزن خشک) مشاهده شد که نسبت به تیمار عدم کاربرد کود، ۱۳/۱۳درصد افزایش داشت که نشان‌دهنده اثرات مثبت این کود آلی در تعدیل شرایط تنش شوری می‌باشد (جدول ۳). مصرف اسید هیومیک نیز موجب افزایش ۸/۲۶ درصدی میزان پرولین تولید شده توسط گیاه نسبت به شرایط عدم مصرف اسید هیومیک شد (جدول ۳). اثر متقابل شوری و کود دامی نیز بر میزان پرولین تولیدی، معنی‌دار شد (جدول ۲). مصرف کود دامی در شرایط شوری ۸/۵ دسی زیمنس بر متر در مقایسه با عدم مصرف آن در تیمارهای شوری مورد نظر ۱۳/۴۹ درصد افزایش نشان داد. در

شوری‌های ۵/۵ و ۲/۵ دسی زیمنس بر متر نیز افزایش ۱۴/۸۹ و ۱۷/۴۴ درصدی میزان پرولین نسبت به تیمار عدم مصرف کود مشاهده شد (شکل ۶).

نتیجه‌گیری

به‌طور کلی، نتایج این پژوهش نشان داد که استفاده از آب‌هایی با شوری بالا نظیر شوری ۸ دسی زیمنس بر متر موجب ایجاد تغییرات چشمگیری در صفات فیزیولوژیکی گیاه از جمله محتوای نسبی آب برگ، پایداری غشا، نشت الکترولیت غشا، کلروفیل‌ها و پرولین شد. با افزایش سطح شوری، میزان پرولین، نشت الکترولیت غشا و کارتنوئید افزایش و محتوای کلروفیل a و b، محتوای نسبی آب و پایداری غشا کاهش یافت. کاربرد کود دامی و اسید هیومیک موجب افزایش محتوای نسبی آب، پایداری غشا و میزان کلروفیل در شرایط تنش شد که نشانگر اثر تعدیلی این کودها در کاهش اثرات نامطلوب تنش شوری است. با توجه به اثرات مثبت مصرف کودهای آلی در این آزمایش، توصیه می‌شود علاوه‌بر مصرف کود دامی قبل از کاشت و مصرف اسید هیومیک به‌صورت بذرمال، استفاده از اسید هیومیک در طول فصل رویشی نیز مورد آزمایش و بررسی قرار گیرد.

References

1. Ahmadi, M., Astarai, A.R., Lekzian, A., & Emami, H. (1400). Investigating the response of millet plant to the application of humic acid, silicon and mycorrhiza under sodium salt stress conditions of irrigation water. *Environmental Stresses in Agricultural Sciences*, *3*, 836-823. (In Persian with English abstract)
2. Alilou, A.A., Shiri Azar, Z., Dashti, S., Shahabi Vand, S., & Pourmohamed, A.R. (1400). Modulating effects of humic acid on germination and vegetative growth of canola plant under salt stress. *Journal of Plant Research (Iranian Journal of Biology)*, *4*, 1-12. (In Persian with English abstract) https://doi.org/20.1001.1.23832592.1399.33.4.1.7
3. Ardakani, A., Armin, M., & Fille Kash, A. (2015). The effect of the amount and method of potassium application onfaM yield and yield components of cotton under saline conditions. *Iranian Agricultural Research Journal*, *14*(3): 525-514. (In Persian with English abstract) https://doi.org/10.22067/GSC.V14I3.46135
4. Arnon, A.N. (1967). Method of extraction of chlorophyll in the plants. *Agronomy Journal*, *23*, 112-121.
5. Aydin, A., Kant, C., & Tayrn, M. (2012). Humic acid application alleviate salinity stress of bean (*Phaseolus vulgaris* L.) plants decreasing membrane leakage. *African Journal of Agriculture Researches*, 7, 1073–1086. http://dx.doi.org/10.5897/AJAR10.274
6. Bates, L.S., Walden, I.R.P., & Tear, I.D. (1973). Rapid determination of free proline for water stress studies. *Plant and Soil*, *39*, 205-207. https://doi.org/10.1007/BF00018060
7. Besma, B.D., Denden, M. (2012). Effect of salt stress on growth, anthocyanins, membrane permeability and chlorophyll fluorescence okra (*Abelmoschus esculentus* L.) seedlings. *American Journal of Plant Physiology*, *7*, 174-183. https://doi.org/10.3923/ajpp.2012.174.183
8. Cameron, R.W.F., Harrison-Murray, R.S., & Scott, M.A. (1999). The use of controlled water stress to manipulate growth of container grown Rhododendron cv. Hoppy. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology, 74(2)*, 161–169. https://doi.org/10.1080/14620316.1999.11511089
9. Chen, W., Hou, Z., Wu, L., Liang, Y., & Wei, C. (2010). Evaluating salinity distribution in soil irrigated with saline water in arid regions of northwest china. *Agricultural Water Management*, *97*, 2001–2008. http://dx.doi.org/10.1016/j.agwat.2010.03.008
10. Chinnusamy, V., Jagendorf, A., & Zhu, J. k. (2005). Understanding and improving salt tolerance in plants. *Crop Science*, *45*, 437-448. https://doi.org/10.2135/cropsci2005.0437
11. Davoudifard, M., Habibi, D., & Davoudifard, F. (2013). Investigating the effect of salt stress on cytoplasmic membrane stability, chlorophyll content and yield components in wheat inoculated with growth promoting bacteria and humic acid. *Journal of Agriculture and Plant Breeding*, *8*(2), 71-86. (In Persian with English abstract)
12. Dong, H., Li, W., Tang, W., & Zhang, D. (2009). Early plastic mulching increases stand establishment and lint yield of cotton in saline fields. *Field Crops Research, 111*, 269-275. http://dx.doi.org/10.1016/j.fcr.2009.01.001
13. El-Baz, F.K., Mahamed, A.A., & Aly, A.A. (2003). Development of biochemical markes for salt stress tolerance in cucumber Plants. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, *1*, 16-22. https://doi.org/10.3923/pjbs.2003.16.22

14. Farhoudi, R. (2012). Investigating the effect of salinity stress on the yield and physiological characteristics of nine wheat cultivars in the vegetative growth stage. *Crop Physiology Research Quarterly, 20*, 86-71.
15. Fatahi, S., Saidi, M., & Zare, M.J. (2016). Investigating the morphological and physiological responses of lettuce in combination with mushrooms. Piriformospora indica under salinity stress. *Agricultural Agronomy, 2*, 255-243. (In Persian with English abstract)
16. Fathi Saadabadi, M., Ranjbar, Gha. A., Zangi, M., Kazemi-Tabar, S.K., & Najafi Zarini, H. (2016). Evaluation of salinity tolerance of early cotton genotypes at the seedling stage. *Crop Breeding Research Paper*, *9*(22), 109-116. https://sid.ir/paper/367236/fa (In Persian with English abstract) https://sid.ir/paper/367236/fa
17. Lichtenthaler, H. K., & Wellburn, A.R. (1983). Determinations of total carotenoids and chlorophylls a and b of leaf extracts in different solvents. *Biochemical Society Transactions, 11*, 591 - 592. https://doi.org/10.1042/bst0110591
18. Ghorbani, S., Khazaei, H., R., Kafi, M., & Banyan Ol, M. (2018). The effect of humic acid application in irrigation water on yield and relative yield of corn (*Zea mays* L.). *Agricultural ecology*, *2*(1), 123-131. (In Persian with English abstract) https://doi.org/10.22067/jag.v2i1.7608
19. Gilik, B.R., Penrose, D., & Wenbo, M. (2001). Bacterial promotion of plant growth. *Biotechnology Advances, 19*, 135-138. https://doi.org/10.1016/S0734-9750(00)00065-3
20. Hasanuzzaman M, Oku H, Nahar K, Bhuyan MHMB, Mahmud JA, & Baluska, F. (2018). Nitric oxide -induced salt stress tolerance in plants: ROS metabolism, signaling, and molecular interactions. *Plant Biotechnol Report scienc*, *12*(2), 77 –92. (In Persian with English abstract) https://doi.org/10.1007/s11816 -018 - 0480 - 0 .
21. Hashemi Fadaki, S.A., Fakheri, B., Mahdinejad, N., Mohammadpour & Vashwai, R. (2017). The effects of nano and nano biological fertilizers on the physiological, biochemical and yield characteristics of *Hibisicus sabdariffa* L.) under stress dryness to arable agriculture. *Journal Crop Improvement, 20*(1), 45-66. (In Persian with English abstract)
22. Hatami, E., Shokouhian, A.A., Ghanbari, A.R., & Naseri, L.A. (2018). Alleviating salt stress in almond rootstocks using of humic acid. *Journal of Scientia Horticulturae*, *237*, 296-302. (In Persian with English abstract) https://civilica.com/doc/874769
23. JafarAghaei, M., & Jalali, A. H. (2013). The reaction of cotton genotypes to salinity stress in the conditions of Isfahan province. *Journal of Production and Processing of Agricultural and Horticultural Products, 3*(10), 1-10. (In Persian with English abstract) https://sid.ir/paper/521582/fa
24. JafarAqhaei, M., Zinli, A., Galshi, S., & Soltani, A. (2016). Study of some biochemical changes in cotton genotypes under saline water irrigation conditions. *Iranian Cotton Research Journal*, *4*(2), 27-44. (In Persian with English abstract) https://doi.org//10.22092/IJCR.2017.112855
25. Jafari T., Iranbakhsh A., Kamali K., & Daneshmand, F. (2021). Seifati. Effect of salinity stress levels on some Growth parameters, Mineral ion concentration, Osmolytes, Non-enzymatic antioxidants and phenylalanine ammonialyase activity in three genotypes of (*Chenopodium quinoa* Willd). *New Cellular and Molecular Biotechnology Journal*, *12* (45), 63-85. (In Persian with English abstract) https://doi.org//20.1001.1.24764531.1402.10.1.7.5
26. Karimzadeh, J., & Yavarzadeh, M. (2014). Chlorophyll a and b changes under the influence of ascorbic acid and salinity stress, the second international research conference in engineering. *Science and Technology Journal*, *2*(1), 12-28. (In Persian with English abstract) https://sid.ir/paper/855310/fa
27. Kaya, M., Atak, M., Ciftci, C. Y., & Unver, S. (2005). Effects of zinc and humic acid applications on yield and some yield components of bread wheat (*Triticum aestivum* L.). South Dakota State University. *Journal of Graduate School of Natural and Applied Sciences, 9*, 116–126.
28. Khan, M.M., Al-Mas'oudi, R.S.M., Al-Said, F., & Khan, I. (2013). Salinity effects on growth, electrolyteleakage, chlorophyll content and lipid peroxidation in cucumber (*Cucumis sativus* L.*). International Conference on Food and Agricultural Sciences*, 55. http://doi:10.7763/IPCBEE.2013 .
29. Mane, A.V., Karadge, B.A., & Samant, J. S. (2010). Salinity induced changes in photosynthetic pigments and polyphenols of *Cymbopogon nardus* (L.) Rendle. *Journal of Chem Pharm Research, 2*, 238-242.
30. Mirghasemi, S. J., Shabdin, M., Rezaei, M.A., & Alishah, A. (2014). Investigating the effect of salinity stress on the activity of some antioxidant enzymes, sodium and chlorine content of leaves in seven cotton genotypes. *Iranian Journal of Plant Ecophysiology Research, 33*(1): 29-37. (In Persian with English abstract)

https://civilica.com/doc/1206241

31. Mohammadi Chiragabadi, M., Roshanfekar, H.A., Hosseini, P., & Maskerbashi, M. (2014). The effect of salicylic acid spraying on some physiological indicators of sugar beet under salinity stress conditions. *Iranian Journal of Agricultural Plant Sciences, 4*, 604-591. https://sid.ir/paper/153658/fa (In Persian with English abstract)
32. Mohammadi, A., Bahmanyar, M., A., & Qajar Sepanlou, M. (2013). The effect of using plaster and manure on improving the amount of nitrogen, phosphorus and potassium in wheat leaves and grains under salt stress. *Scientific Journal of Agriculture. 36*(1), 1-11. (In Persian with English abstract) https://doi.org//20.1001.1.20081472.1394.13.1.21.1
33. Mousavian Kalat, S., M., & Abbaspour, N. (2016). The effect of salinity stress on some morphological and physiological characteristics of four rapeseed cultivars. *Recent Findings in Biological Sciences, 4*(2), 98-106. https://civilica.com/doc/1835028
34. Munns, R., & Tester, M. (2008). Mechanisms of salinity tolerance. *Annual Review of Plant Biology, 59*: 651–668. https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.59.032607.092911
35. Narimani, R., Moghadam, M., Nemati, S., H., & Pirbaluti, H., Q. (2016). Evaluation of salinity stress adjustment using humic acid and ascorbic acid in the medicinal plant Bader Shabi (*Dracocephalum moldavica* L.). *Plant Research Journal (Iranian Biology Journal), 31*(4), 397. (In Persian with English abstract) https://doi.org//20.1001.1.23832592.1397.31.4.17.9
36. Osman, A.S.H., & Rady, M. M. (2012). Ameliorative effects of sulphur and humic acid on the growth, antioxidant levels, and yields of pea (*Pisum sativum* L.) plants grown in reclaimed saline soil. *The Journal of Horticultural Sciences and Biotechnology, 87*, 626–632. https://doi.org/10.1080/14620316.2012.11512922
37. Rady, M.M., Abd El-Mageed, T.A., Abdurrahman, H.A., & Mahdi, A.H. (2016). Humic acid application improves field performance of cotton (*Gossypium barbadense* L.) under saline conditions. *The Journal of Animal and Plant Sciences, 26*(2), 487-493.
38. Rahmati, Q.A., Astarai, A.R., & Khorasani, R. (2016). The effect of humic acid on pH, EC and SAR in the presence of cow and chemical fertilizers in Herat conditions. *Journal of Soil Sciences, 2*, 1-10. (In Persian with English abstract)
39. Ramek, P., Mehrania, M., & Ismailzad Bahabadi, P.P. (2013). Effect of water stress on some acclimatizing solutions and membrane stability in two species of spruce (*Onobrychis radiate* and *Onobrychis viciifolia*). *Iranian Journal of Plant Physiology and Biochemistry, 1*, 1-16. (In Persian with English abstract) http://ijppb.lu.ac.ir/article-1-34-fa.html
40. Rashidi Fard, A., Cherm, Norouzi Masir, M., & Roshanfekar, H. (2019). The effect of humic acid and zinc application on some growth characteristics and antioxidant enzymes of corn seedlings under soil salinity stress, *Iran Water and Soil Research, 9*, 2403-2394. (In Persian with English abstract) https://sid.ir/paper/397984/fa
41. Rezaei, M., 2012. A review of research on the use of animal manures in agricultural lands of Iran, *Journal of Land Management, 1*, 68-55. (In Persian).
42. Roshni, Q.A., & Mirghasemi, S.J. (2013). Investigating the effect of salinity on some morphophysiological responses of 12 genotypes of cotton plants. Journal of Plant Environmental Physiology 36, 57-47. (In Persian with English abstract) https://sid.ir/paper/367236/fa
43. Sabzevari, S., Khazaei, H., & Kafi, M. (2018). The effect of humic acid on the growth of roots and aerial parts of Scions and Sablan wheat cultivars. (*Triticum aestivum* L.). *Journal of Water and Soil (Agricultural Sciences and Industries), 94*, 23-87. (In Persian with English abstract) https://sid.ir/paper/119350/fa
44. Sabzevari, S., Khazaei, H.R., & Kafi, M. (2018). Investigating the effect of humic acid on the germination of 4 wheat cultivars. *Agricultural Research in Iran 8*(3), 473-480. (In Persian with English abstract) https://10.22067/JSW.V0I0.1731
45. Saha, P., Paramita, C., & Asok, K. (2010). NaCl pretreatment alleviates salt (*Vigna radiata* LWilczek). *Indian Journal Exprimental Bioogy, l48*, 593–600.
46. Sairam, R.K., Chandrasekhar, V., & Srivastava, G.C. (2001). Comparison of hexaploid and tetraploid wheat cultivars in their responses to water stress. *Biologia Plantarum, 44* (1), 89-94.
47. Shariatinia, F., Karimi Goghari, A.R., Amiri Jabalbarz, F., & Soltani Nejad, N. (2013). Investigating the effect of humic acid and salinity on vegetative growth and some physiological characteristics of cotton (*Varamin number*). *The First International Congress and the 13th National Congress of Agricultural Sciences and Plant Breeding*

and the Third Seed Technology Science Conference,5-1. (In Persian) https://sid.ir/paper/835279/fa

48. Shi, D.Sh.Y. (2008). Effects of various salt-alkaline mixed stress conditions on sunflower seedling and analysis of their stress factors. *Environmental and Research Botany*, 54, 8-21.
49. Sun, Y., Mu, C., Zheng, H., Lu, S., Zhang, H., Zhang, X. (2018). Exogenous Pi supplementation improved the salt tolerance of maize (*Zea mays* L.) by promoting Na^+exclusion. *Science Repro, 8*(1), 1 –13. https://doi.org/10.1038/s41598 -018 -34320 - y
50. Tabatabaian, J. (2013). Investigating the effect of calcium in improving the damage caused by salinity stress in tomato plant. *Journal of Plant Production Research*, *2*, 125-137. https://20.1001.1.23222050.1393.21.2.7.9 (In Persian with English abstract)
51. Tadin, M.H., Tadin, A., & Esmaili, S. (2017). Investigating the morphophysiological traits of cotton cultivars under the influence of humic acid in saline soil. *Journal of Plant Process and Functions 7*(23), 249-262. (In Persian with English abstract)
52. Taghizadeh, N. (2016). Molecular evaluation of allotetraploid cottons for salinity tolerance, PhD Dissertation. Sari University of Sciences, Agriculture and Natural Resources. Iran. (In Persian with English abstract)
53. Tuna, A.L.C., Kayab, M., Ashraf, H., Altunlu, I., Yokas, I. & Yagmur, B. (2007). The effects of calcium sulphate on growth, membrane stability and nutrient uptake of tomato plants grown under salt stress. *Environmental and Experimental Botany*, *59*(2), 173-178. http://dx.doi.org/10.1016%2Fj.envexpbot.2005.12.007
54. Wanichan, P., Kirdmanee, C., & Vutyano, C. (2003). Effect of salinity on biochemical and physiological characteristics in correlation to selection of salt tolerance in Aromatic rice (*Oriza sativa* L.). *Journal of Science Asian 29*, 333-339. http://dx.doi.org/10.2306/scienceasia1513-1874.2003.29.333