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

Research Article
Vol. 17, No. 2, 2025, p. 281-302

The Effect of Biofertilizer Application on the Improvement of Pigments, Physiological Traits, and Yield of Cowpea (*Vigna unguiculata*)

Reza Sabaghian[1], Mehdi Bradaran Firouzabadi[1], Mostafa Haydari[2], Farzane Bahadori[1] and Safiye Arab[1]

1- Department of Agriculture, Faculty of Agriculture, Shahrood University of Technology, Shahrood, Iran.
2- Research and Education Center for Agriculture and Natural Resources of Semnan Province, Semnan, Iran.
(*- Corresponding author's Email: mbaradaran@shahroodut.ac.ir)

Received: 07-09-2024
Revised: 06-04-2025
Accepted: 09-04-2025
Available Online: 27-07-2025

How to cite this article:
Sabaghian, R., Bradaran Firouzabadi, M., Haydari, M., Bahadori, F., & Arab, S. (2025). The effect of biofertilizer application on the improvement of pigments, physiological traits, and yield of cowpea. *Journal of Agroecology*, *17*(2), 281-302. (In Persian with English abstract)
https://doi.org/10.22067/AGRY.2025.89695.1213

Introduction

Cowpea (*Vigna unguiculata*) an annual legume, originated in Iran. It is one of the main sources of protein, amino acids, vitamins, minerals, and energy, and therefore is important for a well-balanced diet with good nutritional value. In recent years, the application of organic fertilizers has increased tremendously in agricultural production. Humic compounds such as HA is one of the organic-mineral fertilizers, which is commonly used for the production of crops. In order to increase the quantitative and qualitative traits of plants, the extract of some plants, such as green tea extract and coffee extract, can be used.

Materials and Methods

In order to investigate the effect of biofertilizers, including humic acid, green tea extract, and coffee extract, on the improvement of pigments and physiological traits of cowpea, an experiment was designed and implemented in 2023 at a private farm in Semnan city. The experiment was a factorial format based on a randomized complete block design with three replications. The test treatments include seed priming at five levels (control, distilled water, humic acid (750 mg/liter), green tea extract (10% concentration) and coffee extract (10% concentration)) and foliar spraying at four levels (control, humic acid (750 mg/liter), green tea extract (concentration 10%) and coffee extract (concentration 10%). Pretreatment of seeds with desired concentrations was done for six hours, following the principles of seed aeration. Foliar spraying was done at the beginning of flowering. Seeds were sown on June 25 (as the second planting). Before planting, all the seeds were disinfected with benomyl and then in each plot, four rows of five meters were planted with a distance of 25 cm between the rows and 8 cm within the row at a depth of 5 cm.

Results and Discussion

©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.2025.89695.1213

The results showed that pretreatment of seeds with humic acid, green tea extract and coffee extract led to an increase in the traits of relative leaf water content, membrane stability index, leaf surface index, photosynthetic pigments, protein yield, and grain yield. In plants grown from pre-treated seeds, the amount of malondialdehyde and soluble carbohydrates in leaves decreased to a significant level. Foliar spraying with these substances led to the improvement of leaf surface index, the amount of photosynthetic pigments, protein yield, and seed yield. Application of foliar spraying also reduced the amount of malondialdehyde and soluble carbohydrates in leaves. Finally, within the scope of the research, the use of humic acid at the rate of 750 mg/liter and green tea at a concentration of 10% is recommended as seed pre-treatment and foliar spraying in the field. More research is needed on the recommendation of seed pretreatment and coffee extract foliar spraying. When seed yield was considered as a dependent trait, the traits of leaf surface index (0.6076), carotenoid (0.7265), membrane stability index (0.6501), leaf soluble carbohydrates (-0.6678), and Malondialdehyde (0.6096) entered the model as main variables. The results of this research showed that carotenoid (0.3764) and membrane stability index (0.2950) had the most positive direct effect on grain yield.

Conclusion

The results of this research showed that the photosynthetic pigments, protein yield, and grain yield of cowpea increased to a significant level by using humic acid, green tea extract, and coffee extract as seed pretreatment and foliar spraying. Seed protein percentage, yield components, and grain yield of cowpea increased to a significant level with the application of humic acid, green tea extract, and coffee extract as seed pretreatment and foliar spraying. Finally, within the scope of this research, the use of humic acid at the rate of 750 mg/L and green tea at a concentration of 10% is recommended as seed pretreatment and foliar spraying in the field. More research is needed on the recommendation of seed pretreatment and foliar spraying of coffee extract.

Keywords: Antioxidant, Biological fertilizers, Foliar spraying, Pretreatment

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

مقاله پژوهشی

جلد ۱۷، شماره ۲، تابستان ۱٤۰٤، ص ۳۰۲-۲۸۱

تأثیر کاربرد ترکیبات آلی بر بهبود رنگدانه‌ها، صفات فیزیولوژیکی و عملکرد دانه لوبیا چشم بلبلی (*Vigna unguiculata*)

رضا صباغیان[۱]، مهدی برادران فیروزآبادی[۱*]، مصطفی حیدری[۱]، فرزانه بهادری[۲] و صفیه عرب[۱]

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۰۶/۱۷

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۰۱/۲۰

چکیده

به‌منظور بررسی تأثیر ترکیبات آلی شامل اسید هیومیک، عصاره چای سبز و عصاره قهوه بر بهبود رنگدانه‌ها و صفات فیزیولوژیکی لوبیا چشم بلبلی (*Vigna unguiculata*)، آزمایشی در سال زراعی ۱۴۰۲-۱۴۰۱ در آزمایشگاه و مزرعه شخصی در شهر سمنان طراحی و اجرا شد. آزمایش در قالب فاکتوریل بر پایه طرح بلوک‌های کامل تصادفی در سه تکرار بود. تیمارهای آزمایش شامل پرایمینگ بذر در پنج سطح (شاهد، آب مقطر، اسید هیومیک (۷۵۰ میلی‌گرم در لیتر)، عصاره چای سبز (غلظت ۱۰ درصد) و عصاره قهوه (غلظت ۱۰ درصد)) و محلول‌پاشی برگی در چهار سطح (شاهد، اسید هیومیک (۷۵۰ میلی‌گرم در لیتر)، عصاره چای سبز (غلظت ۱۰ درصد) و عصاره قهوه (غلظت ۱۰ درصد)) بودند. محلول‌پاشی در زمان آغاز گل‌دهی صورت گرفت. نتایج نشان داد که پیش‌تیمار بذور با اسید هیومیک، عصاره چای سبز و عصاره قهوه منجر به افزایش معنی‌دار صفات محتوای نسبی آب برگ، شاخص پایداری غشاء، شاخص سطح برگ، رنگدانه‌های فتوسنتزی، عملکرد پروتئین و عملکرد دانه شد. در گیاهانی روییده از بذور پیش‌تیمارشده، میزان مالون‌دی‌آلدهید و کربوهیدرات‌های محلول برگ تا سطح معنی‌داری کاهش نشان داد. محلول‌پاشی با این مواد منجر به بهبود شاخص سطح برگ، میزان رنگدانه‌های فتوسنتزی، عملکرد پروتئین و عملکرد دانه شد. در نهایت، در محدوده پژوهش انجام‌شده، کاربرد اسید هیومیک به‌میزان ۷۵۰ میلی‌گرم در لیتر و چای سبز با غلظت ۱۰ درصد به‌صورت پیش‌تیمار بذری و محلول‌پاشی برگی در مزرعه توصیه می‌شود. به منظور توصیه پیش‌تیمار بذور و محلول‌پاشی عصاره قهوه نیاز به تحقیقات بیشتری است.

واژه‌های کلیدی: آنتی اکسیدان، پیش‌تیمار، کودهای بیولوژی، محلول‌پاشی

مقدمه

یکی از سازگارترین و متنوع‌ترین حبوبات، لوبیا چشم بلبلی می‌باشد که به‌طور گسترده‌ای در سراسر دنیا کشت می‌شود. این گیاه همه مزایای حبوبات را دارا می‌باشد و علاوه‌بر آن از نظر غذایی به‌واسطه داشتن ویتامین‌های مختلف، مواد معدنی، فیبرهای محلول و غیرمحلول و عوامل نفخ‌زای کمتر نسبت به سایر حبوبات متمایز می‌باشد (Shahsavani et al., 2017). کشت و کار لوبیا چشم بلبلی در ایران سابقه طولانی دارد و معمولاً این محصول به‌صورت دانه، تازه‌خوری و سبز در تغذیه انسان و حیوان و همچنین به‌صورت کود سبز در کشاورزی کاربرد دارد. این گیاه توانایی بالایی در تثبیت نیتروژن خاک دارد (Lotfi et al., 2018).

تلاش برای افزایش عملکرد از طریق استفاده نامتعادل از کودهای شیمیایی، موجب افزایش هزینه‌های تولید و پیامدهای منفی زیست محیطی گردیده است. کودهای آلی به‌عنوان جایگزین و هم‌چنین مکمل کودهای شیمیایی مورد استفاده قرار می‌گیرند و موجب تضمین پایداری تولید در کشاورزی می‌شوند (Fathi et al., 2016).

۱- گروه زراعت، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی شاهرود، شاهرود، ایران
۲- مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان سمنان، سمنان، ایران
(*- نویسنده مسئول: Email: mbaradaran@shahroodut.ac.ir)
https://doi.org/10.22067/AGRY.2025.89695.1213

استفاده از کودهای آلی جهت حفظ حاصلخیزی خاک و بهبود رشد گیاهان زراعی، یکی از راه‌حل‌های افزایش عملکرد، بهبود کیفیت محصول، تأمین امنیت غذایی و پایداری در تولید می‌باشد (Dahmarde et al., 2017). استفاده از کودهای آلی در کشاورزی پایدار موجب افزایش جمعیت ریزجانداران خاک و هم‌چنین با فراهم کردن عناصر غذایی مورد نیاز گیاه شامل نیتروژن، فسفر و پتاسیم موجب بهبود رشد و عملکرد در گیاهان می‌شوند (Alipour et al., 2023). از جمله کودهای آلی می‌توان به اسید هیومیک اشاره کرد. اسید هیومیک توان جذب سریع انواع عناصر معدنی را دارد. در نتیجه، همانند یک مخزن، عناصر اضافی را جذب و بعد به‌تدریج آزاد می‌کند. اسید هیومیک جذب نیتروژن خاک را افزایش می‌دهد و موجب تحرک بیشتر عناصر پتاسیم، کلسیم و منیزیم می‌شود و دسترسی آن‌ها را برای سیستم رشد گیاه آسان‌تر کرده و جذب این عناصر را افزایش می‌دهد (Huculak-Maczka et al., 2018). اسید هیومیک موجب فعال شدن دو سازوکار در گیاه می‌شود. یکی اثرات سیگنالی مواد معدنی به‌خاطر متابولیسم هورمون‌ها و دیگری افزایش فعالیت پمپ ATPase در اندام ریشه است که در نهایت منجر به افزایش سرعت دسترسی ریشه به نیترات می‌شود (Roy et al., 2017). محققان دریافتند که استفاده از اسید هیومیک، صفاتی از قبیل ارتفاع بوته، تعداد شاخه، وزن تر و خشک برگ و ساقه و عملکرد لوبیا چشم بلبلی را تا سطح معنی‌داری افزایش داد (Hassanen et al., 2020). کاربرد اسید هیومیک توانست سطح برگ، ارتفاع گیاه، تعداد شاخه فرعی، وزن خشک کل و عملکرد دانه لوبیا چشم بلبلی را بهبود دهد (Arnaout et al., 2019). محققان دیگری دریافتند که استفاده از اسید هیومیک موجب افزایش رشد، وزن ۱۰۰ دانه و عملکرد لوبیا چشم بلبلی می‌شود (Kahraman, 2017).

از دیگر مواد آلی که به‌صورت پیش‌تیمار و محلول‌پاشی برگی در گیاهان قابل استفاده هستند می‌توان به عصاره چای سبز و عصاره قهوه اشاره کرد. برگ‌های چای، منبع مهمی از ترکیبات پلی‌فنول، فلاونوئیدها و اسیدهای فنولیک می‌باشد. مهم‌ترین فلاونول‌هایی که در چای سبز مشاهده می‌شوند، شامل کوئرستین، کامفرول و میریستین است. اسید گالیک، اسید کلروژنیک و اسید نئوکلروژنیک نیز به‌میزان زیادی در چای سبز وجود دارند (Noghani et al., 2020). ترکیبات برگ چای سبز شامل فلاوونول‌ها، اسیدهای فنولیک، تئوبرومین، پروتئین، اسیدهای آمینه، اسیدهای آلی، مونوساکاریدها، پلی‌ساکاریدها، لیگنین، لیپیدها، کلروفیل و سایر رنگدانه‌ها و مواد معطر می‌باشد (Cavusoglu et al., 2022). قهوه دارای مقدار زیادی ترکیبات پلی‌فنولی می‌باشد. ترکیبات فنولی موجود در گیاهان، یکی از بهترین و مهم‌ترین منابع آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی هستند. آنتی-اکسیدان‌های پلی‌فنولی یک گروه ویژه از متابولیت‌های ثانویه هستند که در حفاظت از بافت‌ها در برابر آسیب‌های گونه‌های فعال اکسیژن، نقش ایفا می‌کنند (Balasundram et al., 2006). در میان ترکیبات مختلف قهوه، کافئین اهمیت ویژه‌ای دارد. کافئین (۱، ۳، ۷- تری متیل گزانتین) با فرمول $C_8H_{10}N_4O_2$ یک آلکالوئید طبیعی است (Li et al., 2020). ترکیبات موجود در قهوه بسیار متنوع هستند و شامل کربوهیدرات‌ها (مونوساکارید و پلی ساکارید)، پلی‌ساکاریدهای نامحلول (سلولز)، لیپیدها (موم و روغن)، ترکیبات نیتروژن‌دار (اسیدهای آمینه آزاد و پروتئین‌ها)، آلکالوئیدها (کافئین) و مواد معدنی مانند پتاسیم، کلسیم، منیزیم، آهن، مس، سدیم، منگنز، روی و غیره می‌باشند (Balzano et al., 2020). هم‌چنین حاوی اسیدهایی مانند اسید سیتریک، اسید مالیک و اسید کوئینیک[1] و هم‌چنین اسیدهای فنولیک مانند اسید مونو، دیکافئویل[2] و فرولوئیلکینیک[3] اسید می‌باشد (Garcia-Larez et al., 2021). دانه قهوه دارای ترکیبات مهمی مانند پلی‌ساکاریدها، پلی‌فنول‌ها و پروتئین‌ها می‌باشد که برای سلامتی انسان مفید هستند. هم‌چنین، قهوه دارای مواد زیادی مانند فیبرها، آلکالوئیدها، ملانوئیدین‌ها، پلی‌فنول‌ها و اسید کلروژنیک می-باشد که مسئول خواص دارویی آن هستند (Castaldo et al., 2022). اسید کلروژنیک، استر اسید کافئیک با اسید کوئینیک است که از خانواده اسید هیدروکسی سینامیک می‌باشد (Tajik et al., 2017). بررسی تأثیر عصاره چای در گیاه خیار نشان داد که عصاره چای سیاه و سبز به‌ترتیب موجب کاهش ۴۱/۷ و ۳۳/۳ درصدی آلودگی ویروس موزاییک خیار شد (Rahmanian & Ayazpour, 2020). کاربرد عصاره چای سبز در گیاه مانگو (*Mangifera indica* L.) سبب افزایش طول برگ، تعداد برگ و سطح برگ در مقایسه با شاهد شد (Ahmed et al., 2014). در پژوهش دیگری، محلول‌پاشی چای سبز موجب بهبود صفاتی از قبیل سطح برگ، میزان کلروفیل و کاروتنوئید در برگ‌های گیاه *Vitis vinifera* L. گردید (Abada, 2014). کاربرد

1- Quinic
2- Dicaffeoyl
3- Feruloylquinic

قهوه روی گیاه اسفناج (*Spinacia oleracea*) موجب افزایش رشد این گیاه شد و مواد مغذی موجود در خاک را افزایش داد (Vigardt, 2012). نتایج مشابهی از کاربرد قهوه در افزایش عملکرد دو گیاه چچم (*Darnel ryegrass*) و نعناع فلفلی (*Mentha piperita*) گزارش شده است (Hashimi et al., 2019).

اطلاعات اندکی در خصوص تأثیر ترکیباتی مانند عصاره چای سبز و قهوه بر رفتارهای زراعی و فیزیولوژیکی گیاهان به‌ویژه لوبیا چشم بلبلی وجود دارد، لذا با عنایت به اهمیت بالای لوبیا چشم بلبلی در زنجیره غذایی انسان، همچنین برخورد بخشی از دوره رشد این گیاه با مجموعه‌ای از تنش‌های محیطی در فصل تابستان، در این پژوهش به بررسی اثر این ترکیبات و نیز اسید هیومیک بر خصوصیات کمّی و کیفی این گیاه در قالب کشت دوم و رویارویی با گرما و شرایط سخت فصل تابستان پرداخته شد.

مواد و روش‌ها

پژوهش حاضر در سال زراعی ۱۴۰۲-۱۴۰۱ در دو بخش آزمایشگاهی و مزرعه‌ای در شهر سمنان (با طول جغرافیایی ۵۳ درجه و ۲۳ دقیقه و عرض جغرافیایی ۳۵ درجه و ۳۴ دقیقه، شرایط آب‌وهوایی گرم‌وخشک و ارتفاع ۱۱۲۱ متر از سطح دریا) در قالب آزمایش فاکتوریل بر پایه طرح بلوک‌های کامل تصادفی در سه تکرار اجرا شد. شرایط آب‌وهوایی و خاک منطقه آزمایش، به‌ترتیب در جدول ۱ و ۲ گزارش شده است.

تیمارها در این بخش شامل پیش‌تیمار بذر در پنج سطح شاهد، آب مقطر، اسید هیومیک (۷۵۰ میلی‌گرم در لیتر)، عصاره چای سبز (غلظت ۱۰ درصد) و عصاره قهوه (غلظت ۱۰ درصد) و محلول‌پاشی برگی در چهار سطح شاهد، اسید هیومیک (۷۵۰ میلی‌گرم در لیتر)، عصاره چای سبز (۱۰ درصد) و عصاره قهوه (۱۰ درصد) بودند. کاشت لوبیا در تاریخ ۲۵ خرداد (به‌عنوان کشت دوم) انجام شد. کلیه بذور قبل از کاشت با سم بنومیل به نسبت دو در هزار ضدعفونی و سپس در هر کرت چهار ردیف به‌طول پنج متر با فاصله بین ردیف ۲۵ سانتی‌متر و روی ردیف هشت سانتی‌متر در عمق پنج سانتی‌متری کاشته شدند. آبیاری به‌صورت قطره‌ای با مدار آبیاری شش روز با استفاده از نوارهای تیپ انجام شد. مهار علف‌های هرز از طریق وجین دستی صورت گرفت.

برای تهیه عصاره چای سبز و قهوه از آب مقطر استفاده شد. برای این منظور، ۱۰۰ گرم از پودر خشک این دو ماده به‌صورت جداگانه وزن و در یک ظرف شیشه‌ای (ارلن) مقدار ۵۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر با دمای ۷۵ درجه سانتی‌گراد به آن اضافه گردید. مخلوط مذکور به‌مدت ۲۴ ساعت در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد در بن‌ماری قرار داده شد و سپس توسط کاغذ صافی و قیف بوخنر صاف گردید (Moradi & Amini, 2017). عصاره به‌دست‌آمده به‌حجم یک لیتر رسانده و جهت تهیه غلظت‌های مورد نظر برای تیمارهای آزمایش استفاده شد. پیش-تیمار بذور با مواد و غلظت‌های یادشده با رعایت اصول هوادهی بذر به‌مدت شش ساعت انجام شد. پس از آن، بذور در سایه خشک شدند و جهت ادامه آزمایش استفاده گردید. محلول‌پاشی‌ها در تاریخ پنجم شهریور ۱۴۰۲، همزمان با مرحله آغاز گل‌دهی انجام شد. دو هفته پس از انجام تیمارهای محلول‌پاشی، نمونه‌گیری و اندازه‌گیری صفات آغاز شد. نمونه‌گیری از دو خط وسط هر کرت و از بوته‌های درگیر در رقابت انجام پذیرفت.

شاخص سطح برگ چهار هفته پس از محلول‌پاشی در پنج بوته با استفاده از دستگاه سنجش سطح برگ مدل A3 Light box ساخت کشور انگلستان اندازه‌گیری و سپس شاخص سطح برگ محاسبه گردید. مقدار نسبی آب برگ براساس روش کرامر (Kramer, 1983) اندازه‌گیری شد. به‌منظور اندازه‌گیری کلروفیل برگ، در ۹۵ روز پس از کاشت (مرحله دانه‌بندی)، از برگ‌های هم‌سن و جوان موجود در قسمت یک سوم بالایی بوته‌ها نمونه‌برداری انجام شد. نیم گرم از نمونه‌های برگی در پنج میلی‌لیتر دی‌متیل‌سولفوکسید، در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد و به‌مدت ۳۰ دقیقه قرار داده شد.

جدول ۱- ویژگی‌های فیزیکو شیمیایی خاک مزرعه

Table 1- Physico-chemical properties of the experimental soil

بافت خاک Soil texture	اسیدیته pH	هدایت الکتریکی (EC) ($dS.m^{-1}$)	کربن آلی Organic C	نیتروژن کل (N)	فسفر (P)	پتاسیم (K)
			(%)			
لوم سیلتی Silty loam	7.36	2.00	0.85	0.10	9.00	1.27

جدول ۲- داده‌های هواشناسی منطقه در سال مورد آزمایش (اداره هواشناسی استان سمنان)

Table 2- Meteorological data for the field sites during experiment (Semnan province Meteorological Office)

	بارندگی Precipitation (mm)	رطوبت نسبی Relative humidity (%)	میانگین دما Mean temperature (°C)
فروردین April	35.8	42	15
اردیبهشت May	5.8	37	20.2
خرداد June	1.7	36	26.1
تیر July	0.0	30	31.4
مرداد August	0.0	28	31.1
شهریور September	0.0	32	25.3
مهر October	3.3	33	19.3
آبان November	5.8	38	14.1

سپس با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر، میزان جذب عصاره‌ها در طول موج‌های ۶۶۳، ۶۴۵ و ۴۷۰ نانومتر ثبت گردید (Hiscox & Israelstom, 1979). جهت اندازه‌گیری شاخص پایداری غشاء، در ۹۰ روز پس از کاشت به‌طور تصادفی از قسمت یک سوم بالایی، برگ‌های هم‌سن برداشت گردید. از نمونه‌ها دیسک برگی تهیه شد و مقدار ۰/۱ گرم در فالکون تیوپ قرار گرفت و ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر روی آن‌ها ریخته شد. فالکون تیوپ‌ها به‌مدت ۱۵ دقیقه درون اتوکلاو در دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. به‌طور مشابه، یکسری دیگر نمونه در فالکون تیوپ قرار گرفتند و به‌مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. سپس نمونه‌ها از آون و اتوکلاو خارج و در محیط آزمایشگاه قرار داده شدند تا دمای آن به ۲۵ درجه سانتی‌گراد برسد. بعد با استفاده از دستگاه EC متر، EC مربوط به هر فالکون تیوپ اندازه‌گیری و در نهایت، شاخص پایداری غشاء محاسبه گردید (Sairam & Srivastava, 2001). غلظت مالون‌دی‌آلدهید در برگ‌هایی هم‌سن و جوان از قسمت یک سوم بالایی بوته‌ها در مزرعه در مرحله ۹۰ روز پس از کاشت اندازه‌گیری شد (Du & BramLey, 1992). نمونه‌های گیاهی (۰/۲۵ گرم) با اسید تری‌کلرواستیک (TCA) ۰/۱ درصد (وزن به حجم) هموژن گردیدند. هموژن حاصل به‌مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد در ۱۰۰۰۰g سانتریفیوژ و از فاز بالایی برای سنجش میزان مالون‌دی‌آلدهید استفاده شد. دو میلی‌لیتر اسید تیوباربیتوریک ۰/۲۵ درصد به ۲۵۰ میکرولیتر عصاره اضافه گردید. مخلوط حاصل به‌مدت ۳۰ دقیقه در بن‌ماری آب ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد و پس از آن، لوله‌ها به‌مدت ۱۵ دقیقه در یخ سرد شدند. بلافاصله پس از آن، نمونه‌ها در دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد در ۱۰۰۰۰g به‌مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شدند. مقدار جذب روشناور در طول موج‌های ۴۴۰، ۵۳۲ و ۶۰۰ نانومتر خوانده شد. برای محاسبه غلظت مالون‌دی‌آلدهید از ضریب خاموشی معادل ۱۵۷۰۰۰ mM/cm استفاده شد. به‌منظور استخراج کربوهیدرات‌های غیرساختاری موجود در برگ، ۰/۵ گرم از بافت برگ با پنج میلی‌لیتر اتانول ۹۵ درصد در داخل هاون چینی هموژن و فاز بالایی جدا شد. عمل استخراج دو بار دیگر و هر بار با پنج میلی‌لیتر اتانول ۷۰ درصد تکرار شد. در مرحله بعد، محلول به‌دست‌آمده به‌مدت ۱۵ دقیقه در ۶۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ و بخش بالایی آن جدا شد و تا زمان اندازه‌گیری کربوهیدرات در دمای چهار درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. برای اندازه‌گیری کربوهیدرات محلول از روش ایریگوین و همکاران (Irigoyen et al., 1992) استفاده شد. به ۰/۱ میلی‌لیتر از عصاره تهیه‌شده، ه میلی‌لیتر آنترون اضافه شد. برای تولید آنترون، ۱۵۰ میلی‌گرم آنترون با ۱۰۰ میلی‌لیتر اسید سولفوریک ترکیب شد. لوله‌های آزمایش به‌مدت ۱۰ دقیقه در حمام آب گرم قرار گرفتند تا ماده رنگی حاصل شود. بعد از خنک شدن نمونه‌ها، میزان جذب در طول موج ۶۲۵ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شد.

جدول ۳- تجزیه واریانس میانگین مربعات صفات اندازه‌گیری‌شده در لوبیا چشم بلبلی تحت تأثیر پیش‌تیمار و محلول‌پاشی با اسید هیومیک، عصاره چای سبز و عصاره قهوه

Table 3- Analysis of variance for the mean squares of traits measured in cowpea under the influence of pretreatment and foliar spraying with humic acid, green tea extract and coffee extract

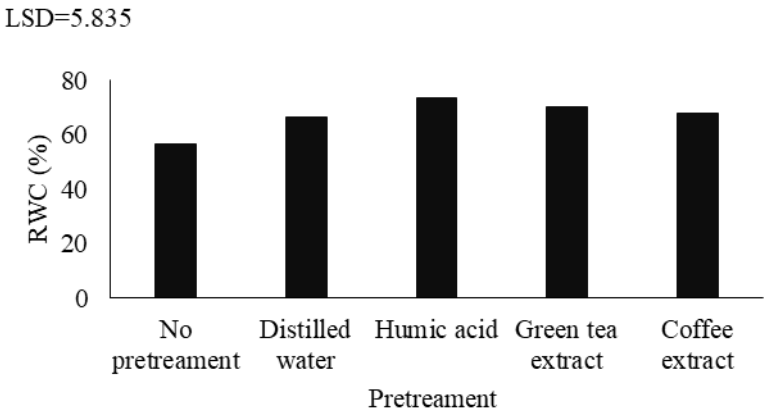
منابع تغییر S.O.V	درجه آزادی df	محتوای نسبی آب برگ RWC	شاخص پایداری غشاء Membrane stability	شاخص سطح برگ Leaf area index	کلروفیل a Chl. a	کلروفیل b Chl. b	کاروتنوئید Carotenoid	کربوهیدرات‌های محلول برگ Leaf soluble carbohydrate	مالون‌دی‌آلدهید MDA	عملکرد پروتئین Protein yield	عملکرد دانه Grain yield
تکرار Replication	2	104.35	372.64	0.38	0.50	2.37	0.00001	1467.88	0.09	2055863.5	790.11
پیش‌تیمار Pretretment (A)	4	499.12**	28.14**	2.09**	0.55**	3.15**	0.00005**	34277.18**	181.29**	18782863.36**	18390.97**
محلول‌پاشی Foliar spray (B)	3	129.14*	78.10**	0.56**	0.20*	0.75*	0.0003**	8312.05**	51.37*	6698033.31**	6779.26**
A × B	12	7.00	2.05	0.03	0.19	0.39	0.00003	2036.39	5.07	271018.62	362.77
خطا Error	38	49.85	16.19	0.12	0.05	0.24	0.00003	1594.84	16.15	519166.5	353.62
ضریب تغییرات C.V (%)	-	10.56	5.61	9.86	6.47	9.08	7.50	7.19	9.33	12.87	8.74

پروتئین دانه با استفاده از روش کجلدال اندازه‌گیری شد (Fowler et al., 1989). در ۱۰۰ روز پس از کاشت (مرحله رسیدگی فیزیولوژیک)، تعداد پنج بوته به‌طور تصادفی از هر کرت برداشت شد و عملکرد دانه اندازه‌گیری شد. تجزیه داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SAS 9.1 انجام شد. مقایسه میانگین داده‌ها به‌روش LSD در سطح احتمال پنج درصد صورت پذیرفت.

نتایج و بحث

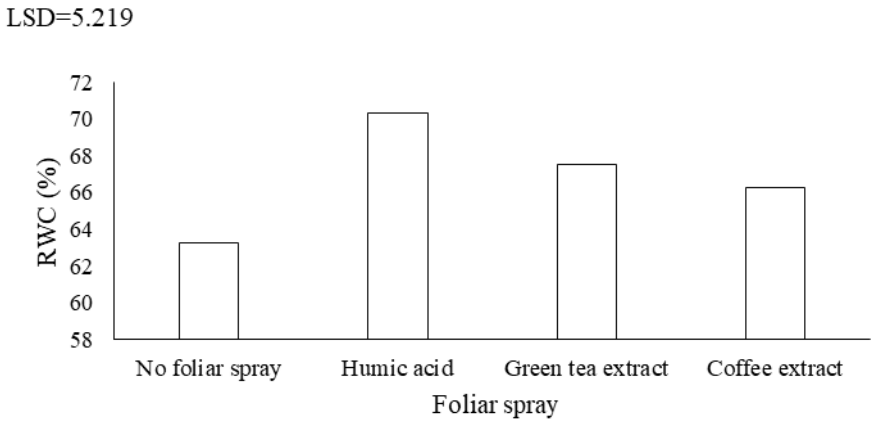
نتایج تجزیه واریانس صفات در جدول ۳ گزارش شده است.

مقدار آب نسبی برگ تحت تأثیر پیش‌تیمار ($p\leq$۰/۰۱) و محلول‌پاشی ($p\leq$۰/۰۵) قرار گرفت، ولی از برهم‌کنش دوجانبه پیش‌تیمار و محلول‌پاشی تأثیر نپذیرفت (جدول ۳). براساس نتایج قابل مشاهده در شکل ۱، سطوح مختلف پیش‌تیمار بذر سبب بهبود وضعیت آبی در برگ گیاهان لوبیا چشم بلبلی گردید. پیش‌تیمار بذر با اسید هیومیک نه‌تنها مقدار آب نسبی برگ را نسبت به شاهد ۹/۹۰ درصد بهبود بخشید، بلکه نسبت به سطح آب مقطر نیز به‌طور معنی‌داری برتر بود. این در حالی است که پیش‌تیمار با عصاره‌های چای سبز و قهوه برتری آماری نسبت به آب مقطر نداشتند و هر سه تقریباً به یک اندازه و البته به‌صورت معنی‌دار این صفت را نسبت به شاهد افزایش دادند. مقدار آب نسبی برگ در گیاهانی که با اسید هیومیک محلول‌پاشی شده بودند، به‌طور معنی‌دار و معادل ۷/۰۷ درصد نسبت به شاهد افزایش داشت. در مورد عصاره چای سبز و عصاره قهوه نیز به‌ترتیب افزایش ۴/۲۷ و ۳/۰۲ درصدی مقدار آب نسبی برگ نسبت به شاهد به ثبت رسید که البته از نظر آماری معنی‌دار نبود (شکل ۲). نتایج تحقیقات نشان داده است که مواد هیومیکی توانایی جذب آب و مواد غذایی را در گیاه افزایش داده و از این طریق منجر به افزایش مقدار آب نسبی برگ می‌شوند (Aggag et al., 2015). مقدار آب نسبی برگ نشان‌دهنده توانایی جذب آب از محیط اطراف می‌باشد و معمولاً نشان‌دهنده مقاومت به خشکی گیاهان می‌باشد (Grzesiak et al., 2006). مطالعات نشان داده است که تنش خشکی موجب کاهش مقدار آب نسبی برگ در گیاهان می‌شود و اسید هیومیک با این اثر مقابله می‌کند (Bili, 2015). استفاده از اسید هیومیک به‌ویژه در شرایط تنش خشکی، به‌شکل معنی‌داری محتوای نسبی آب برگ را در آفتابگردان (*Helianthus annuus*) افزایش داد (Heidari et al., 2020). این افزایش به‌دلیل توان بالاتر ریشه در جذب آب و کاهش تبخیر و تعرق غیرضروری از سطح برگ گزارش شده است. افزایش مقدار آب نسبی برگ با محلول‌پاشی عصاره چای سبز می‌تواند با ترکیبات فلاونوئیدی و کافئین موجود در آن ارتباط داشته باشد. کافئین به‌عنوان یک تحریک‌کننده برای فعالیت‌های فیزیولوژیکی گیاهان و فلاونوئیدها به‌عنوان آنتی‌اکسیدان‌ها و مواد مغذی در گیاهان عمل می‌کند (Yoo et al., 2023).



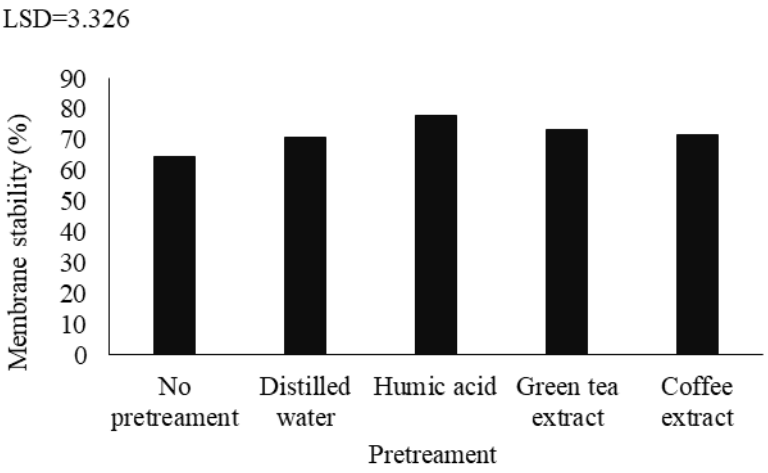
شکل ۱- مقایسه میانگین اثر پیش‌تیمار بذر بر مقدار نسبی آب برگ لوبیا چشم بلبلی

Fig. 1- Mean comparison of the effect of seed pretreatment on RWC of Cowpea

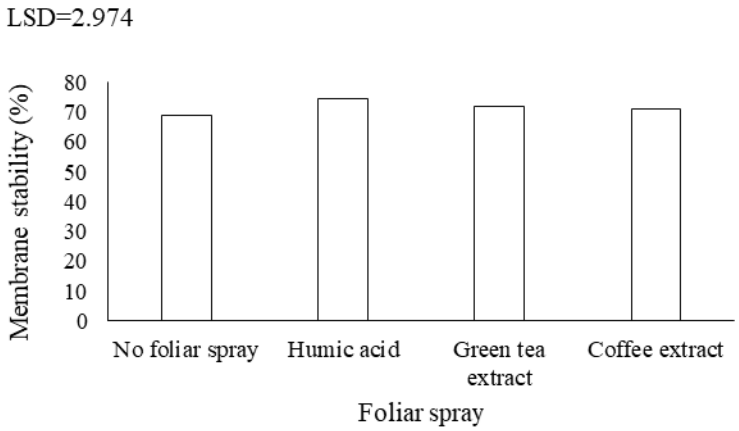


شکل ۲- مقایسه میانگین اثر محلول‌پاشی بر مقدار آب نسبی برگ لوبیا چشم بلبلی
Fig. 2- Mean comparison of the effect of foliar spray on RWC of Cowpea

در بین منابع تغییر، اثر محلول‌پاشی و پیش‌تیمار بذر در سطح احتمال یک درصد بر شاخص پایداری غشاء معنی‌دار بودند (جدول ۳). نتایج نشان داد که پیش‌تیمار بذر می‌تواند سبب افزایش شاخص پایداری غشاء در گیاهان حاصل از این بذور شود. در بین تیمارهای آزمایش، بیشترین تأثیر مربوط به اسید هیومیک بود، به‌طوری‌که پیش‌تیمار بذور با اسید هیومیک موجب افزایش ۱۳/۳۹ درصدی شاخص پایداری غشاء نسبت به شاهد گردید. پیش‌تیمار بذور با عصاره چای سبز، عصاره قهوه و آب مقطر نیز موجب افزایش شاخص پایداری غشاء نسبت به شاهد به‌میزان ۸/۶۶، ۷/۲۵ و ۶/۱۵ درصد شدند که همگی در یک گروه آماری بودند (شکل ۳). تنها محلول‌پاشی با اسید هیومیک توانست شاخص پایداری غشاء را در مقایسه با شاهد به‌طور معنی‌داری بهبود بخشد. میزان این افزایش نسبت به شاهد ۵/۵۴ درصد بود (شکل ۴). محققان دیگر دریافتند که محلول‌پاشی اسید هیومیک موجب افزایش شاخص پایداری غشاء در گندم (*Triticum aestivum* L.) گردید (Rousta et al., 2019).



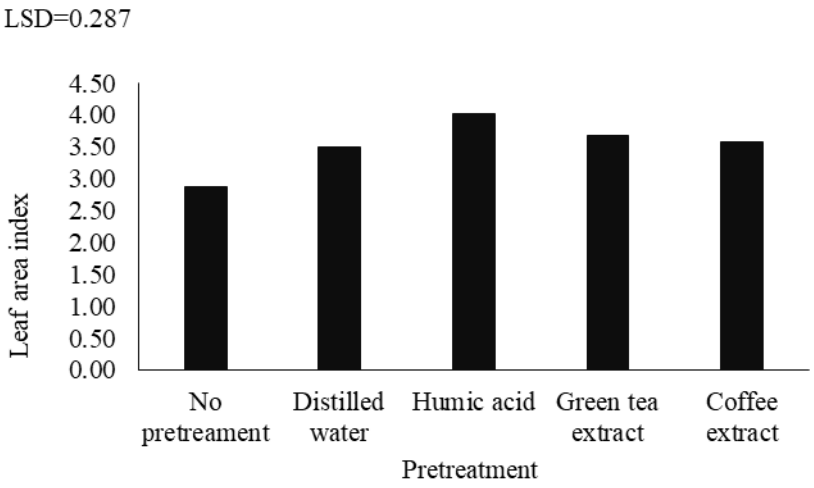
شکل ۳- مقایسه میانگین اثر پیش‌تیمار بذر برروی شاخص پایداری غشاء لوبیا چشم بلبلی
Fig. 3- Mean comparison of the effect of seed pretreatment on the membrane stability of Cowpea



شکل ٤- مقایسه میانگین اثر محلول‌پاشی بر شاخص پایداری غشاء لوبیا چشم بلبلی

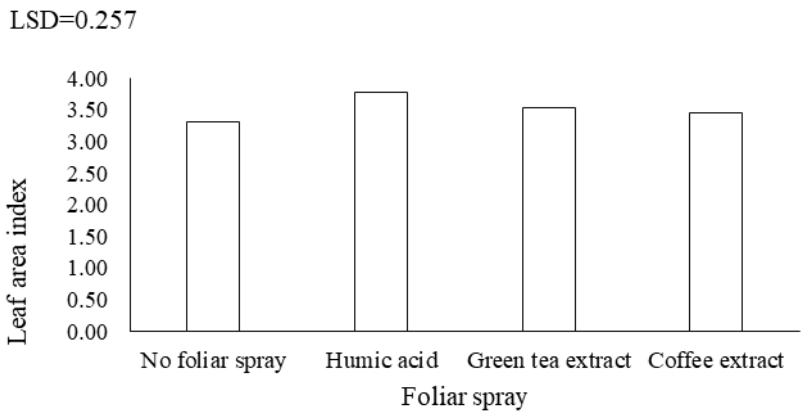
Fig. 4- Mean comparison of the effect of foliar spray on the membrane stability of Cowpea

اثر محلول‌پاشی و پیش‌تیمار بذور در سطح احتمال یک درصد بر شاخص سطح برگ معنی‌دار بود (جدول ۳). میزان شاخص سطح برگ ثبت‌شده در گیاهان شاهد (بدون پیش‌تیمار) معادل ۲/۸۷ و کمترین مقدار بود. پیش‌تیمار بذر با آب مقطر، اسید هیومیک، عصاره چای سبز و قهوه به‌ترتیب سبب افزایش ۲۱/۶۰، ۳۲/۹۵، ۲۰/۱۴ و ۱۹/۰۲ درصدی شاخص سطح برگ نسبت به شاهد شد. بنابراین نقش اسید هیومیک در بهبود این شاخص نسبت به شاهد و آب مقطر کاملاً مشهود بود (شکل ۵). نتایج بررسی محلول‌پاشی گیاه لوبیا چشم بلبلی نشان از افزایش معنی‌دار شاخص سطح برگ به‌میزان ۱۲/۱۶ درصد نسبت به شاهد در اسید هیومیک داشت. همچنین محلول‌پاشی با عصاره چای سبز موجب افزایش ۵/۹۴ درصدی این صفت نسبت به شاهد گردید که با محلول‌پاشی عصاره قهوه و شاهد تفاوت معنی‌داری نداشت و در یک گروه آماری قرار گرفتند (شکل ۶). گزارش شده است که اسید هیومیک منجر به افزایش شاخص سطح برگ در ذرت شده است (Abdulameer & Ahmed, 2019). این محققان علت افزایش شاخص سطح برگ با کاربرد اسید هیومیک را بهبود رشد گیاه و افزایش تعداد برگ در گیاه دانستند.



شکل ٥- مقایسه میانگین اثر پیش‌تیمار بذر بر شاخص سطح برگ لوبیا چشم بلبلی

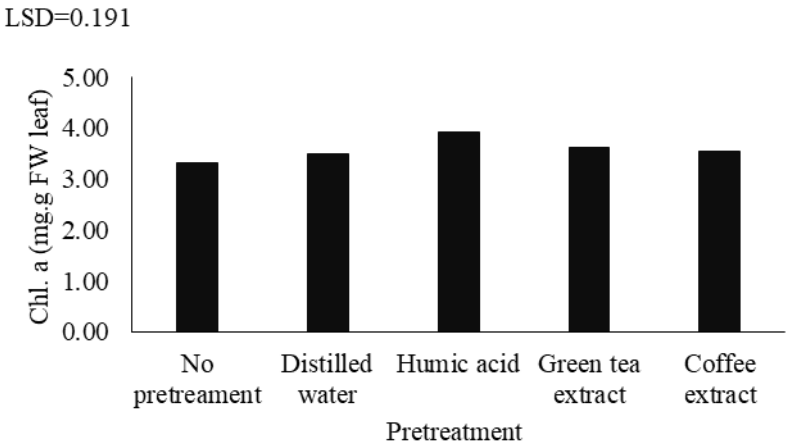
Fig. 5- Mean comparison of the effect of seed pretreatment on leaf area index of Cowpea



شکل ٦- مقایسه میانگین اثر محلول‌پاشی بر شاخص سطح برگ لوبیا چشم بلبلی

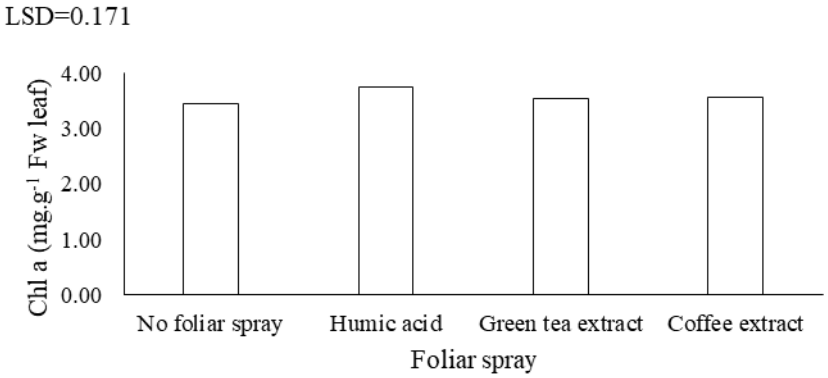
Fig. 6- Mean comparison of the effect of foliar spray on leaf area index of Cowpea

میزان کلروفیل a در برگ‌های لوبیا چشم بلبلی در این تحقیق از محلول‌پاشی ($p\leq$۰/۰۵) و پیش‌تیمار ($p\leq$۰/۰۱) تأثیر پذیرفت، ولی تحت تأثیر برهم‌کنش دوجانبه پیش‌تیمار و محلول‌پاشی قرار نگرفت (جدول ۳). در برگ گیاهان حاصل از بذور تیمارشده با اسید هیومیک بیشترین مقدار کلروفیل a ثبت شده است که نسبت به شاهد ۱۶/۹۰ درصد بیشتر بود. پس از آن، تیمارهای عصاره چای سبز و قهوه قرار داشتند که اگرچه نسبت به شاهد برتری آماری داشتند، ولی اختلافی با آب مقطر نداشتند (شکل ۷). محلول‌پاشی با اسید هیومیک با ۷/۴۸ درصد افزایش نسبت به شاهد دارای بیشترین میزان کلروفیل a بود. عصاره چای سبز و عصاره قهوه اگرچه میزان این صفت را افزایش دادند، ولی اختلاف معنی‌داری نداشتند و از لحاظ آماری با گیاهان شاهد هم‌گروه بودند (شکل ۸). محققان دلیل افزایش کلروفیل با محلول‌پاشی اسید هیومیک را با افزایش جذب مواد غذایی در این شرایط مرتبط دانستند. با کاربرد اسید هیومیک، جذب مواد غذایی از جمله نیتروژن بیشتر می‌شود که به دنبال آن میزان کلروفیل و فتوسنتز نیز افزایش می‌یابد (Haranal et al., 2023). پژوهشگران دیگری دریافتند که افزایش محتوای کلروفیل برگ ممکن است به‌دلیل تولید پروتئین‌های محافظت‌کننده در اثر مصرف اسید هیومیک باشد، یا به‌دلیل عملکردهای دیگر اسید هیومیک مانند افزایش نفوذپذیری غشاء سلولی، جذب اکسیژن، تنفس، فتوسنتز، جذب فسفات و افزایش طول ریشه می‌باشد (Eryigit & Husamalddin, 2023). در راستای تحقیق حاضر، محققان دریافتند که محلول‌پاشی اسید هیومیک منجر به افزایش میزان کلروفیل a در برگ‌های آفتابگردان شد (Heidari et al., 2020).



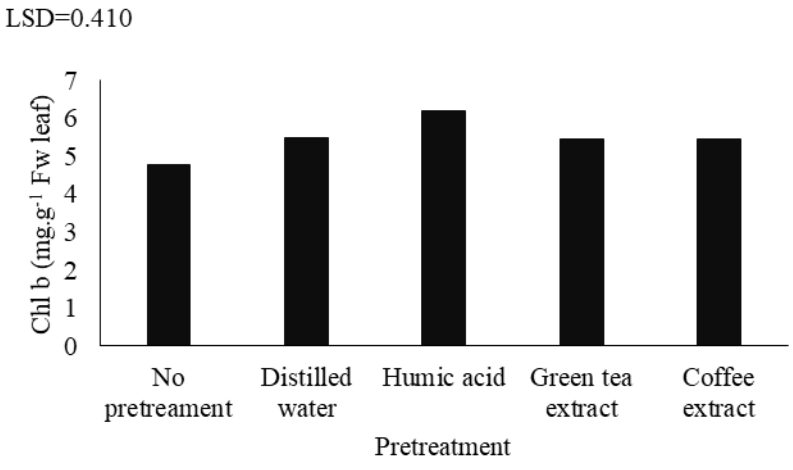
شکل ۷- مقایسه میانگین اثر پیش‌تیمار بذر بر کلروفیل a لوبیا چشم بلبلی

Fig. 7- Mean comparison of the effect of seed pretreatment on Chl a of Cowpea

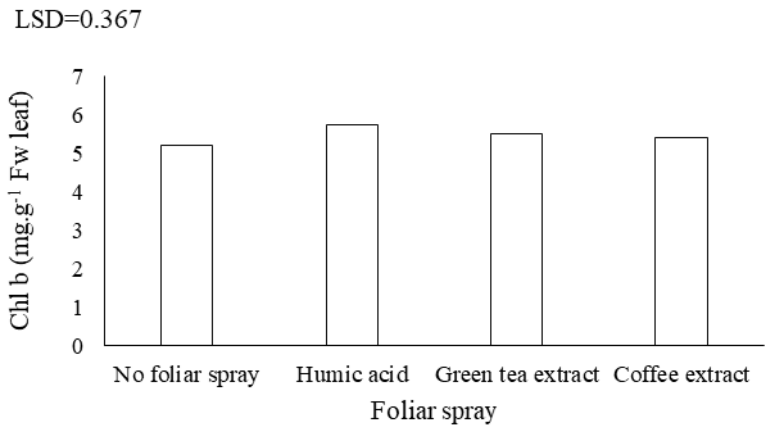


شکل ۸- مقایسه میانگین اثر محلول‌پاشی بذر بر کلروفیل a لوبیا چشم بلبلی
Fig. 8- Mean comparison of the effect of foliar spray on Chl a of Cowpea

نتایج جدول تجزیه واریانس نشان داد که میزان کلروفیل b به‌طور معنی‌داری تحت تأثیر محلول‌پاشی ($p\leq$۰/۰۵) و پیش‌تیمار بذری ($p\leq$۰/۰۱) قرار گرفت (جدول ۳). بررسی شکل ۹ نشان داد که میزان کلروفیل b برگ گیاهان روییده از بذوری که با اسید هیومیک پیش‌تیمار شده بودند، دارای اختلاف معنی‌دار با سایر تیمارها و ۲۶/۵۰ درصد بیشتر از گیاهان شاهد بود. پیش‌تیمار با آب مقطر، عصاره قهوه و عصاره چای سبز نیز به‌ترتیب سبب افزایش معنی‌دار و ۱۴/۹۱، ۱۲/۴۵ و ۱۱/۲۷ درصدی نسبت به شاهد شدند. اگرچه این سه تیمار با یکدیگر در یک گروه قرار داشتند. میزان کلروفیل b در گیاهان محلول‌پاشی‌شده با اسید هیومیک نسبت به شاهد در بالاترین سطح بود و افزایش ۹/۴۰ درصدی نشان داد، ولی نسبت به محلول‌پاشی با عصاره چای سبز و عصاره قهوه اختلاف معنی‌دار نداشت و در یک گروه آماری قرار گرفت. چای سبز و عصاره قهوه به‌ترتیب افزایش ۵/۶۲ و ۴/۰۵ درصدی را نسبت به شاهد نشان دادند که از نظر آماری معنی‌دار نبود (شکل ۱۰). محققان دیگر افزایش میزان کلروفیل b را با کاربرد اسید هیومیک در لوبیا چشم بلبلی گزارش کرده‌اند (Hajihasani et al., 2014).

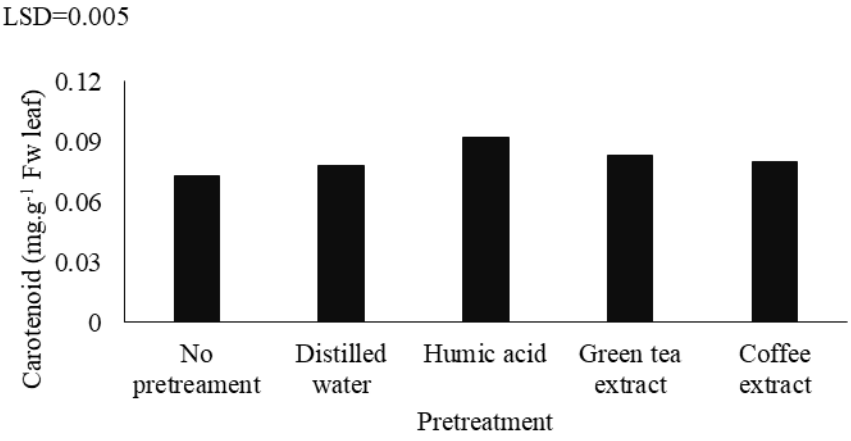


شکل ۹- مقایسه میانگین اثر پیش‌تیمار بذر بر کلروفیل b لوبیا چشم بلبلی
Fig. 9- Mean comparison of the effect of seed pretreatment on Chl b of Cowpea

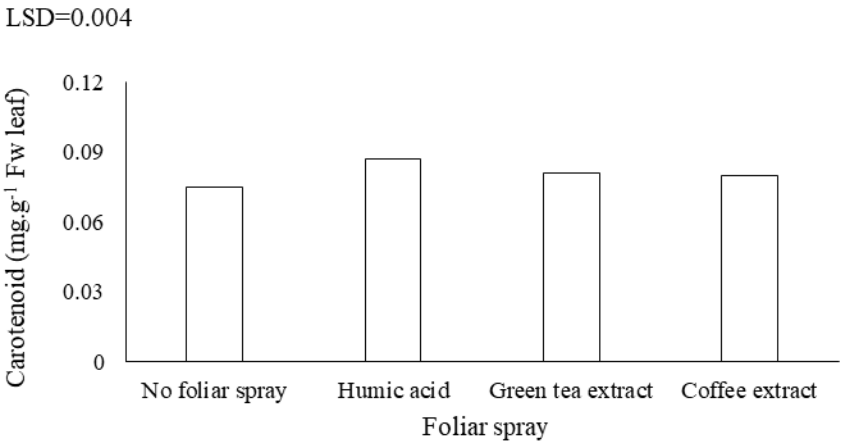


شکل ۱۰- مقایسه میانگین اثر محلول‌پاشی بر کلروفیل b لوبیا چشم بلبلی
Fig. 10- Mean comparison of the effect of foliar spray on Chl b of Cowpea

اثر محلول‌پاشی و پیش‌تیمار بذر هرکدام در سطح احتمال یک درصد بر میزان کاروتنوئید برگ گیاهان معنی‌دار شد، درحالی‌که برهم‌کنش دوجانبه آن‌ها اثری نداشت (جدول ۳). میزان کاروتنوئید در برگ گیاهان روییده از بذور پیش‌تیمارشده با آب مقطر، اسید هیومیک، عصاره چای سبز و عصاره قهوه به‌طور معنی‌داری نسبت به گیاهان شاهد بیشتر بود (شکل ۱۱). در این بین، پیش‌تیمار با اسید هیومیک موجب بیشترین افزایش کاروتنوئید (۲۴/۳۵ درصد) نسبت به شاهد گردید و بعد از آن عصاره چای سبز، عصاره قهوه و آب مقطر به‌ترتیب معادل ۱۰/۸۶، ۸/۴۳ و ۶/۸۴ درصد نسبت به شاهد موجب افزایش کاروتنوئید گردید. محلول‌پاشی نیز سبب بهبود این صفت گردید. به‌طوری‌که محلول‌پاشی با اسید هیومیک، عصاره چای سبز و عصاره قهوه به‌ترتیب موجب افزایش معنی‌دار ۱۳/۷۹، ۷/۴۰ و ۶/۲۵ درصدی میزان کاروتنوئید نسبت به شاهد شدند. محلول‌پاشی با اسید هیومیک در گروه بالاتر و محلول‌پاشی با عصاره چای سبز و قهوه هر دو در یک گروه آماری و در مرتبه بعدی قرار گرفتند (شکل ۱۲). در راستای نتایج این پژوهش، محققان نشان دادند که اسید هیومیک موجب افزایش میزان کاروتنوئید در آفتابگردان شد. آن‌ها بیشتر بودن مقادیر کاروتنوئیدها با کاربرد اسید هیومیک را مربوط به اثرات مثبت این ماده در متابولیسم درون سلول‌ها دانستند (Heidari et al., 2020).

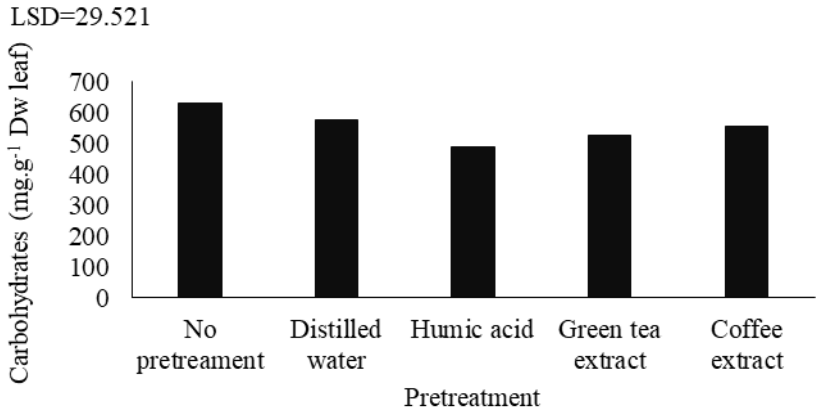


شکل ۱۱- مقایسه میانگین اثر پیش‌تیمار بذر بر کاروتنوئید برگ لوبیا چشم بلبلی
Fig. 11- Mean comparison of the effect of seed pretreatment on carotenoid of Cowpea

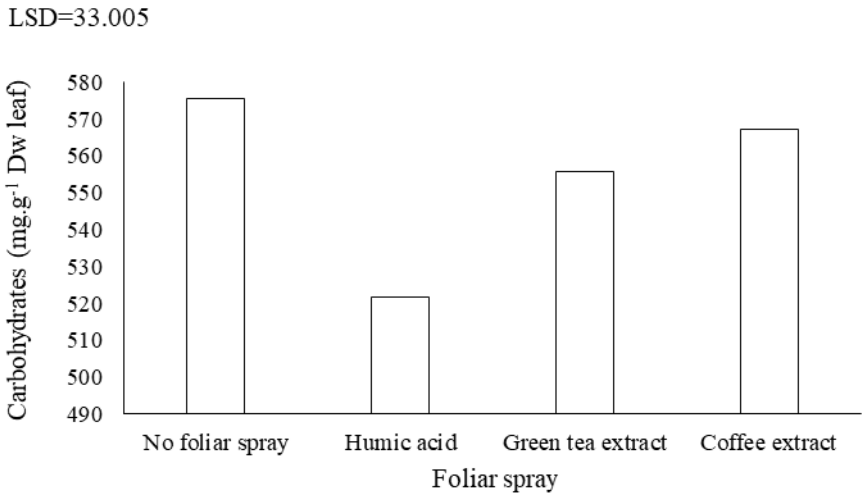


شکل ۱۲- مقایسه میانگین اثر محلول‌پاشی بر کاروتنوئید برگ لوبیا چشم بلبلی
Fig. 12- Mean comparison of the effect of foliar spray on carotenoid of Cowpea

با توجه به نتایج به‌دست‌آمده می‌توان گفت که میزان کربوهیدرات‌های موجود در برگ لوبیا چشم بلبلی تحت تأثیر محلول‌پاشی برگی ($p\leq$۰/۰۱) و پیش‌تیمار بذور ($p\leq$۰/۰۱) قرار گرفت، امّا برهم‌کنش دوجانبه پیش‌تیمار و محلول‌پاشی تأثیری نداشت (جدول ۳). پیش‌تیمار بذر با اسید هیومیک سبب کاهش ۲۴/۷۹ درصدی کربوهیدرات در برگ نسبت به شاهد شد. همچنین پیش‌تیمار با عصاره چای سبز کاهش ۲۱/۵۰ درصدی، عصاره قهوه کاهش ۱۴/۷۲ درصدی و آب مقطر کاهش ۸/۹۶ درصدی این صفت را نسبت به شاهد نشان دادند (شکل ۱۳). بررسی سطوح محلول‌پاشی نیز نشان داد که محلول‌پاشی با اسید هیومیک موجب کاهش ۱۰/۲۴ درصدی کربوهیدرات نسبت به شاهد گردید و محلول‌پاشی با عصاره چای سبز و عصاره قهوه تأثیر معنی‌داری بر این صفت در مقایسه با شاهد نداشت (شکل ۱۴).



شکل ۱۳- مقایسه میانگین اثر پیش‌تیمار بذر بر کربوهیدرات‌های برگ لوبیا چشم بلبلی
Fig. 13- Mean comparison of the effect of seed pretreatment on carbohydrates of Cowpea

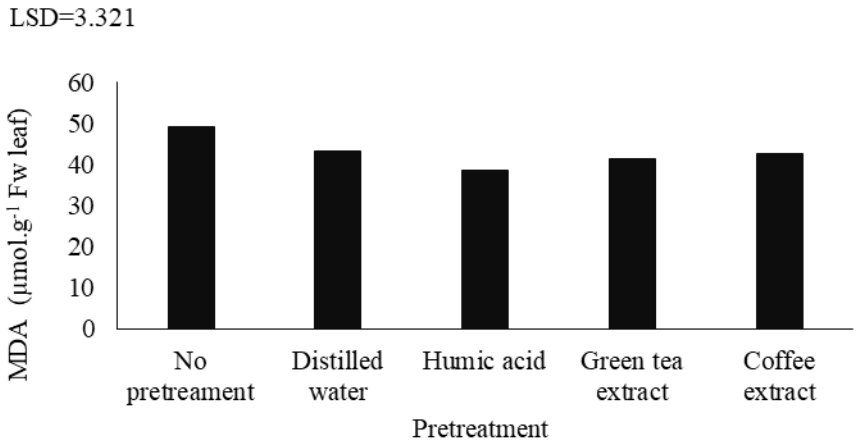


شکل ۱۴- مقایسه میانگین اثر محلول‌پاشی بر کربوهیدرات‌های محلول برگ لوبیا چشم بلبلی
Fig. 14- Mean comparison of the effect of foliar spray on carbohydrates of Cowpea

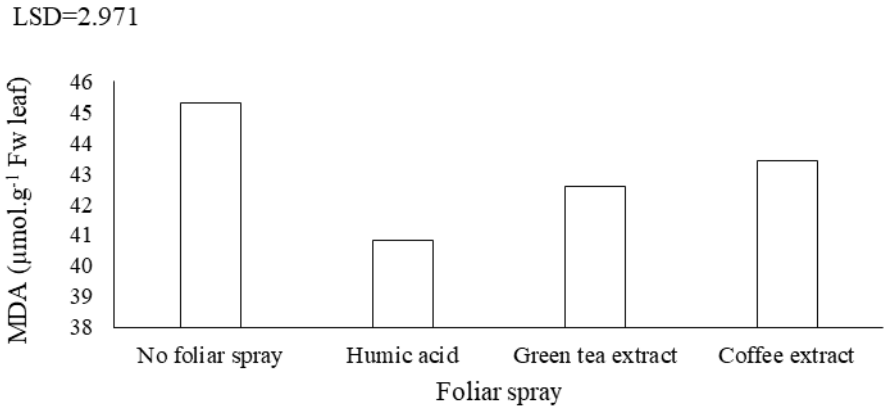
نتایج نشان داد که میزان مالون‌دی‌آلدهید تحت تأثیر تیمارهای محلول‌پاشی ($p\leq$۰/۰۵) و پیش‌تیمار بذور ($p\leq$۰/۰۱) قرار گرفت، ولی برهم‌کنش دوجانبه آن‌ها تأثیری نداشت (جدول ۳). پیش‌تیمار بذر با اسید هیومیک، عصاره چای سبز، عصاره قهوه و آب مقطر موجب کاهش معنی‌دار ۲۴/۴۲، ۲۰/۰۱، ۱۶/۱۷ و ۱۱/۸۸ درصدی میزان مالون‌دی‌آلدهید برگ نسبت به گیاهان شاهد شدند. از نظر آماری عصاره چای سبز، قهوه و آب مقطر در یک گروه قرار گرفتند و اسید هیومیک نسبت به بقیه اثر بیشتری در کاهش پراکسیداسیون لیپیدها داشت (شکل ۱۵). اگرچه تمامی سطوح محلول‌پاشی شامل اسید هیومیک، عصاره چای سبز و عصاره قهوه موجب کاهش میزان مالون‌دی‌آلدهید برگ شد، ولی فقط کاهش ناشی از اسید هیومیک نسبت به شاهد معنی‌دار بود. اسید هیومیک این صفت را ۱۰/۸۹ درصد نسبت به شاهد کاهش داد (شکل ۱۶). محققان اعلام کردند که اسید هیومیک از طریق تحریک فعالیت آنزیم کاتالاز موجب کاهش فعالیت گونه‌های فعال اکسیژن و در نهایت، کاهش میزان مالون‌دی‌آلدهید می‌شود (Cordeiro et al., 2011). مالون‌دی‌آلدهید حاصل پراکسیداسیون اسیدهای چرب اشباع نشده در فسفولیپیدها است. و به‌عنوان معرف برای بررسی میزان صدمات غشاء مورد استفاده قرار می‌گیرد (Jaleel et al., 2007). در این پژوهش، مقدار مالون دی‌آلدهید در اثر پیش‌تیمار بذر و محلول‌پاشی اسید هیومیک بیشترین کاهش را نسبت به عصاره چای سبز و قهوه نشان داد که بیانگر عملکرد بهتر اسید هیومیک در گیاه لوبیا چشم بلبلی می‌باشد. محققان اعلام کردند که کاربرد اسید هیومیک منجر به کاهش میزان مالون‌دی‌آلدهید در سویا گردید (Maiwan et al., 2023).

عملکرد پروتئین تحت تأثیر پیش‌تیمار ($P\leq$۰/۰۱) و محلول‌پاشی ($P\leq$۰/۰۱) قرار گرفت (جدول ۳). بررسی شکل ۱۷ نشان داد که کمترین عملکرد پروتئین در گیاهانی به دست آمد که پیش‌تیمار را تجربه نکرده بودند و معادل ۴۲۲۰/۹ گرم بر مترمربع بود. بیشترین عملکرد پروتئین نیز در گیاهان حاصل از بذور پیش‌تیمار شده با اسید هیومیک به دست آمد. کاربرد پیش‌تیمار با آب مقطر، عصاره چای سبز و عصاره قهوه نیز موجب افزایش معنی‌دار عملکرد پروتئین تا سطح معنی‌داری نسبت به شاهد شد (شکل ۱۷).

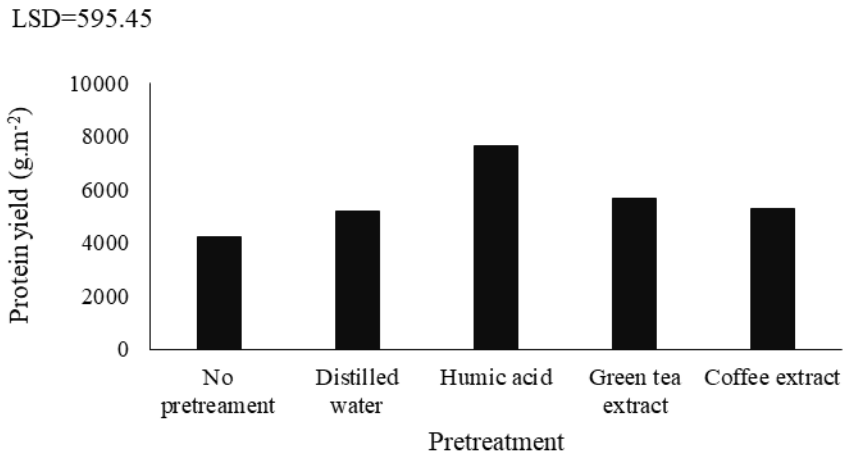
مقایسه میانگین سطوح مختلف محلول‌پاشی نشان داد که کاربرد اسید هیومیک و عصاره چای سبز منجر به افزایش معنی‌دار عملکرد پروتئین نسبت به شاهد شد. عصاره قهوه اگرچه این صفت را بهبود داد، ولی از لحاظ آماری با شاهد اختلاف معنی‌دار نشان نداد (شکل ۱۸). تحقیقات نشان داده است که اسید هیومیک سبب تشکیل کمپلکس‌های محلول با عناصر ریزمغذی می‌شود و از این طریق، بیشترین تأثیر را بر افزایش میزان پروتئین دانه دارد (Bidyabhusan et al., 2024). محققان دیگر نیز افزایش عملکرد پروتئین لوبیا چشم بلبلی را در شرایط کاربرد اسید هیومیک گزارش کرده‌اند (Daylami & Mojaddam, 2018).



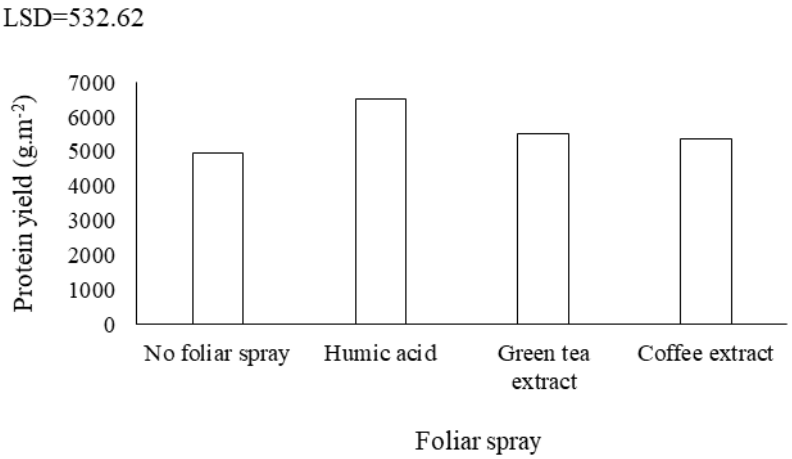
شکل ۱۵- مقایسه میانگین اثر سطوح مختلف پیش‌تیمار بذر بر مالون‌دی‌آلدهید لوبیا چشم بلبلی
Fig. 15- Mean comparison of the effect of seed pretreatment on MDA of Cowpea



شکل ۱۶- مقایسه میانگین اثر سطوح مختلف محلول‌پاشی بر مالون‌دی‌آلدهید لوبیا چشم بلبلی
Fig. 16- Mean comparison of the effect of foliar spray on MDA of Cowpea



شکل ۱۷- مقایسه میانگین اثر پیش‌تیمار بذر بر عملکرد پروتئین لوبیا چشم بلبلی
Fig. 17- Mean comparison of the effect of seed pretreatment on protein yield of Cowpea



شکل ۱۸- مقایسه میانگین اثر محلول‌پاشی بر عملکرد پروتئین لوبیا چشم بلبلی

Fig. 18- Mean comparison of the effect of foliar spray on protein yield of Cowpea

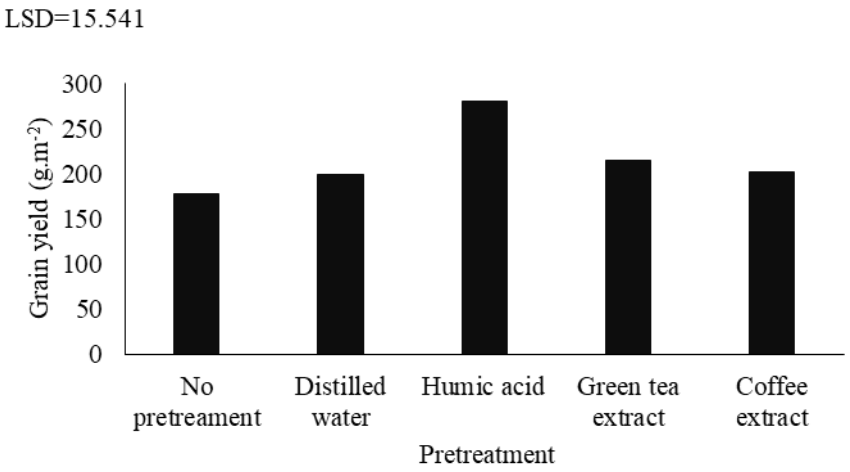
عملکرد دانه لوبیا چشم بلبلی در این پژوهش در سطح احتمال یک درصد تحت تأثیر پیش‌تیمار بذری و محلول‌پاشی برگی قرار گرفت، ولی برهم‌کنش دوجانبه این دو عامل بدون تأثیر بود (جدول ۳). بیشترین عملکرد دانه در گیاهان روییده از بذور پیش‌تیمارشده با اسید هیومیک به ثبت رسید که ۵۷/۶۹ درصد بیشتر از شاهد بود و این در حالی بود که پیش‌تیمار با عصاره چای سبز، آب مقطر و عصاره قهوه این صفت را به‌ترتیب ۲۰/۹۱، ۱۱/۴۱ و ۱۳/۶۶ درصد نسبت به شاهد افزایش داد (شکل ۱۹).

مقایسه میانگین عملکرد دانه در سطوح مختلف محلول‌پاشی نشان داد که اعمال تمامی سطوح محلول‌پاشی موجب افزایش عملکرد دانه در این شرایط شد. بیشترین عملکرد دانه متعلق به گیاهانی بود که اسید هیومیک را به‌صورت محلول‌پاشی دریافت کرده بودند که نسبت به شاهد ۲۰/۳۶ درصد برتری داشت. محلول‌پاشی با عصاره چای سبز و عصاره قهوه در سطح دوم آماری قرار گرفت. زمانی‌که گیاهان با عصاره چای سبز محلول‌پاشی شدند، افزایش ۸/۲۵ درصدی عملکرد دانه نسبت به شاهد به ثبت رسید. کاربرد عصاره قهوه نیز موجب افزایش ۵/۹۷ درصدی عملکرد دانه نسبت به شاهد شد که البته اختلاف معنی‌داری نداشت. کمترین میزان عملکرد دانه در این شرایط با میانگین ۱۹۵/۰۶ گرم در مترمربع متعلق به گیاهان شاهد بود (شکل ۲۰). محققان دریافتند که پیش‌تیمار بذرها احتمالاً از طریق بهبود سرعت استقرار و رشد گیاهان زراعی موجب افزایش عملکرد آن‌ها می‌شوند (Nezami et al., 2013). در این پژوهش، اسید هیومیک از طریق افزایش شاخص سطح برگ، کلروفیل، شاخص پایداری غشاء، کاهش مالون‌دی‌آلدهید و افزایش وزن ۱۰۰ دانه، تعداد دانه در غلاف و تعداد غلاف در بوته منجر به افزایش عملکرد دانه شده است. افزایش عملکرد دانه از طریق محلول‌پاشی اسید هیومیک در گندم نیز گزارش شده است (Mahmoodi et al., 2016). در تحقیق دیگری، مصرف اسید هیومیک با افزایش جذب عناصر پرمصرف مانند فسفر و پتاسیم، عملکرد دانه در نخود را افزایش داد (Sakinejad et al., 2011). در پژوهش دیگری، کاربرد اسید هیومیک موجب افزایش عملکرد دانه در لوبیا چشم بلبلی گردید (Daylami & Mojaddam, 2018). در خصوص تأثیر عصاره چای سبز و عصاره قهوه بر عملکرد دانه گیاهان، سندی یافت نگردید.

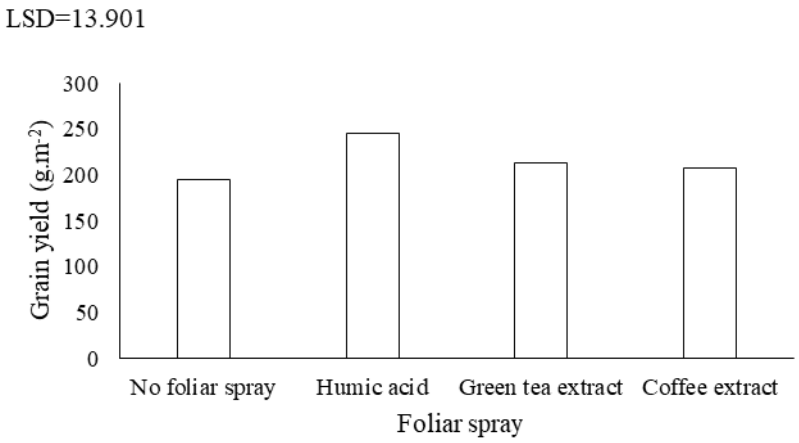
تجزیه علیت

جهت تعیین سهم اثرهای مستقیم و غیرمستقیم متغیرها بر عملکرد دانه از تجزیه علیت استفاده شد. همان‌طور که در جدول ۴ مشاهده می‌شود، زمانی‌که عملکرد دانه به‌عنوان صفت وابسته در نظر گرفته شد، صفات شاخص سطح برگ (۰/۶۰۷۶)، کاروتنوئید (۰/۷۲۶۵)، شاخص پایداری غشاء (۰/۶۵۰۱)، کربوهیدرات‌های محلول برگ (۰/۶۶۷۸-) و مالون‌دی‌آلدهید (۰/۶۰۹۶-) به‌عنوان متغیرهای اصلی وارد مدل شدند. با توجه به میزان ضریب تبیین ۶۵/۸۱ درصد از تغییرات عملکرد دانه توسط این پنج صفت توجیه می‌شود. نتایج این پژوهش نشان داد که بیشترین اثر مستقیم مثبت را کاروتنوئید (۰/۳۷۶۴) و شاخص پایداری غشاء (۰/۲۹۵۰) بر عملکرد دانه داشتند. کربوهیدرات‌های محلول برگ نیز بیشترین اثر مستقیم و

منفی (۰/۱۹۶۸-) را بر عملکرد دانـه نشـان داد. مـالون‌دی‌آلدهیـد از طریق تأثیر غیرمستقیم بر میزان کاروتنئید و شـاخص پایـداری غشـاء منجر به اثر منفی بر عملکرد دانه شد (جدول ۴).



شکل ۱۹- مقایسه میانگین اثر پیش‌تیمار بذر بر عملکرد دانه لوبیا چشم بلبلی
Fig. 19- Mean comparison of the effect of seed pretreatment on grain yield of Cowpea



شکل ۲۰- مقایسه میانگین اثر محلول‌پاشی بر عملکرد دانه لوبیا چشم بلبلی
Fig. 20- Mean comparison of the effect of foliar spray on grain yield of Cowpea

نتیجه‌گیری

استفاده از کودهـای آلـی بـه‌دلیل اثـرات مختلـف فیزیولـوژیکی، علاوه‌بر افزایش عملکرد گیاهان می تواند منجر بـه اسـتفاده کمتـر از کودهای شیمیایی شود. نتایج این پـژوهش نشـان داد کـه اسـتفاده از اسید هیومیک، عصاره چای سـبز و عصـاره قهـوه از طریـق افـزایش میزان رنگدانه‌های فتوسنتزی، شاخص سطح برگ و شاخص پایـداری غشاء در گیاه لوبیا چشم بلبلی منجر به افزایش عملکرد دانه شدند. در محدوده پژوهش حاضر، کاربرد اسید هیومیک و عصاره چای سبز به‌صورت پیش‌تیمار بذری و محلول‌پاشی برگی جهت افزایش کیفیـت و کمیت لوبیا چشم بلبلی توصیه می‌شود. توصیه بـه اسـتفاده از عصـاره قهوه نیازمند انجام تحقیقات بیشتری می‌باشد.

جدول ٤- تجزیه علیت عملکرد دانه تحت تأثیر صفات شاخص سطح برگ، کاروتنوئید، شاخص پایداری غشاء، کربوهیدارت‌های محلول برگ، مالون‌دی‌آلدهید (عملکرد دانه صفت وابسته است.)

Table 4- Path coefficient analysis of grain yield under the influence of leaf area index, carotenoid, membrane stability, carbohydrate and Malondialdehyde, (grain yield is a dependent trait).

صفات Traits	شاخص سطح برگ Leaf area index	کاروتنوئید Carotenoid	شاخص پایداری غشاء Membrane stability	کربوهیدرات Carbohydrate	مالون دی آلدهید Malondialdehyde	اثرات کل Total effects
شاخص سطح برگ Leaf area index	**0.1191**	0.2029	0.1439	0.1281	-0.0107	0.6076
کاروتنوئید Carotenoid	0.0718	**0.3764**	0.1606	0.1288	-0.0114	0.7265
شاخص پایداری غشاء Membarane stability	0.0580	0.1654	**0.2950**	0.1046	-0.0127	0.6501
کربوهیدرات Carbohydrate	-0.0775	-0.2465	-0.1568	**-0.1968**	0.0100	-0.6678
مالون دی آلدهید Malondialdehyde	-0.0710	-0.2388	-0.2081	-0.1095	**0.0181**	-0.6096
r-square	0.6581					

References

1. Abada, M.A. (2014). A comparative study for the effect of green tea extract and some antioxidants on Thompson Seedless grapevines. *International Journal of Plant & Soil Science, 3*(10), 1333-1342. https://doi.org/10.9734/ljpss/2014/8611
2. Abdulameer, O.Q., & Ahmed, S.A. (2019). Role of humic acid in improving growth characters of corn under water stress. *The Iraqi Journal of Agricultural Science, 50*(1), 420-430.
3. Aggag, A.M., Alzoheiry, A.M., & Abdallah, A.E. (2015). Effect of kaolin and fulvic acid anti-transpirants on tomato plants grown under different water regimes. *Alexandria Sciene Exchange Journal, 36*, 2-15. https://doi.org/10.21608/asejaiqjsae.2015.2875
4. Ahmed, F.F., Kamel, M.K., & Ibrahim, H.I.M. (2014). The synergistic effects of using plant extracts and salicylic acid on yield and fruit quality of Keitte mango trees. *Stem Cell, 5*(2), 30-39.
5. Alipour, H., Razavinasab, A., & Hosseinifard, S.J. (2023). The effect of humic acid application on growth characteristics, quality and yield of pistachios. *Journal of Soil Management and Sustainable Production*, *12*(4), 117-133. (In Persian with English abstract). https://doi.org/10.22069/ejsms.2023.20659.2077
6. Arnaout, S.M., Kamel, N.H., El-Mosallamy, H.M.H., & Boghdady, M.S. (2019). Effect of unihumic and aminomore on cowpea plants (*Vigna unguiculata* L.) grown under drought stress conditions. *Zagazig Journal of Agricultural Research, 46*(4), 999-1019. https://doi.org/10.21608/zjar.2019.47053
7. Balasundram, N., Sundram, K., & Samman, S. (2006). Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses, *Food Chemistry, 103*, 1288-1296. https://doi.org/org/10.1016/j.foodchem.2005.07.042
8. Balzano, M., Loizzo, M.R., Tundis, R., Lucci, P., Nunez, O., Fiorini, D., Giardinieri, A., & Pacetti, D. (2020). Spent espresso coffee grounds as a source of anti-proliferative and antioxidant compounds. *Innovative Food Science & Emerging Technologies, 59*, 102-125. https://doi.org/10.1016/j.ifset.2019.102254
9. Bidyabhusan, B., Kangujam, B., Barkha, S., & Arambam, A. (2024). Effect of humic acid on growth, yield and soil properties in rice: A review. *International Journal of Plant & Soil Science, 36*(6), 26-35. https://doi.org/10.9734/ijpss/2024/v36i64603
10. Bili, C. (2015). Mechanism of silicon alleviation of drought stress in tomato (*Solanum lycopersicum* L.). Shandong Agricultural University, 214 pp.
11. Castaldo, L., Toriello, M., Izzo, L., Sessa, R., Lombardi, S., Trombetti, S., & Grosso, M. (2022). Effect of different coffee brews on tryptophan metabolite-induced cytotoxicity in HT-29 human colon cancer cells.

Antioxidants, *11*(12), 24-38. https://doi.org//10.3390/antiox11122458
12. Cavusoglu, D., Macar, O., Kalefetoglu Macar, T., Cavusoglu, K., & Yalcın, E. (2022). Mitigative effect of green tea extract against mercury (II) chloride toxicity in *Allium cepa* L. model. *Environmental Science and Pollution Research, 29*(19), 27862-27874. https://doi.org//10.1007/s11356-021-17781-z
13. Cordeiro, F.C., Santa-Catarina, C., Silveira, V., & Souza, S.R. (2011). Humic acid effect on catalase activity and the generation of reactive oxygen species in corn (*Zea mays* L.). *Bioscience Biotechnology and Biochemistry, 75*, 70–74. https://doi.org/10.1271/bbb.100553
14. Dahmarde, M., Mirbahaodin, M., & Khomri, A. (2017). The effect of biofertilizer application on the quantitative and qualitative characteristics of cowpea under drought stress conditions. *Environmental Stresses in Agricultural Sciences*, *11*(1), 23-33. (In Persian with English abstract).
15. Daylami, S., & Mojaddam, M. (2018). Studying the effect of application time of humic acid foliar spraying on qualitative and quantitative characteristics of cowpea (*Vigna unguiculata* L.) under different irrigation regimes. *Environmental Stresses in Crop Sciences, 12*(1), 85-94. (In Persian with English abstract). http://dx.doi.org/10.22077/escs.2018.1056.1209
16. Du, Z., & BramLey, W.J. (1992). Modified thiobarbituric acid assay for measuring lipid oxidation in sugar-rich plant tissue extracts. *Journal Agricultural and Food Chemistry, 40*(9), 1566-1570. https://doi.org/10.1021/jf00021a018
17. Eryigit, T., & Husamalddin, A.H. (2023). Effects of different humic acid doses on yield and quality properties of corn (*Zea mays* L.) in Iraq-Sulaymaniyah conditions. *Journal of the Institute of Science and Technology, 13*(2), 1377-1393. https://doi.org/10.21597/jist.1241745
18. Fathi, A., Farnia, A., & Maleki, A. (2016). Effect of nitrogen and phosphorus biological fertilizers on vegetative characteristics, dry matter and yield of corn. *Journal of Agriculture, 110*, 1-7. (In Persian with English abstract), https://doi.org/10.22092/aj.2016.109214
19. Fowler, B.D., Brydon, J., & Baker, R.J. (1989). Nitrogen fertilization of no till winter wheat and rye. II: Influence of grain protein. *Agronomy Journal, 81*, 72-77. https://doi.org/10.2134/agronj1989.00021962008100010013x
20. Garcia-Larez, F.L., Murillo-Hernandez, J.L., Vargas-Sanchez, R.D., Torrescano-Urrutia, G.R., Torres-Martinez, B.D.M., & Sanchez-Escalante, A. (2021). Effect of extraction solvent on metabolites content, antioxidant, and antibacterial activity of coffee bagasse. TIP. Revista especializada en ciencias quimico-biologicas. https://doi.org//10.22201/fssz.23958723e.2021.363
21. Grzesiak, M.T., Grzesiak, S., & Skoczowski, A. (2006). Changes of leaf water potential and gas exchange during and after drought in triticale and maize genotypes differing in drought tolerance. *Photosynthetica, 44*, 561–568. https://doi.org/10.1007/s11099-006-0072-z
22. Hajihasani, N., Ameriyan, M.R., Asghari, H.R., & Rahimi, M. (2014). Effect of mycorrhiza, vermicompost and humic acid application on development and yield of *Vigna unguiculata* L. M.Sc. Thesis, Shahrood University of Technology, Shahrood, Iran. 135 pp.
23. Haranal, K., Hanumanthappa, M., Mavarkar, N.S., Salimath, S.B., & Nadukeri, S. (2023). Foliar application of humic acid with varied nutrient levels on the performance of sweet corn. *International Journal of Research in Agronomy*, *6*(1), 18-21. https://doi.org/10.33545/2618060x.2023.v6.i1a.157
24. Hashimi, R., Afghani, A.K., Karimi, M.R., & Habibi, H.K. (2019). Effect of organic and inorganic fertilizers levels on spinach (*Spinacia oleracea* L.) production and soil properties in Khost Province, Afghanistan. *International Journal of Advanced Research, 5*(7), 83-87.
25. Hassanen, S.A., Mousa, W.M., & Sultan, F.M. (2020). Effect of foliar application of humic acid, yeast and garlic extracts on growth, yield and quality in forage cowpea. *The Middle East Journal*, *9*(4), 1079-1087. https://doi.org/10.36632/mejar/2020.9.4.84
26. Heidari, M., Paydar, A., Baradarn Firozabad, M., & Abedinin Esfalati, M. (2020). The Effect of drought stress and application of humic on quantitative yield, photosynthetic pigments, and mineral nutrient content in sunflower seeds. *Iranian Journal of Field Crop Science, 50*(4), 51-62. (In Persian with English abstract). https://doi.org/10.22059/ijfcs.2018.253008.654448.
27. Hiscox, J.D., & Israelstom, G.F. (1979). A method for the extraction of chlorophyll from leaf tissue without maceration. *Canadian Journal of Botany*, *57*(2), 1332-1339. https://doi.org/10.1139/b79-163.
28. Huculak-Maczka, M., Hoffmann, J., & Hoffmann, K. (2018). Evaluation of the possibilities of using humic acids

obtained from lignite in the production of commercial fertilizers. *Journal of Soils Sediments, 18*, 2868-2880. https://doi.org/10.1007/s11368-017-1907-x

29. Irigoyen, J.J., Emerich, D.W., & Sanchez-Diaz, M. (1992). Water stress induced changes in concentration of prolun and total soluble sugarsin nodulated alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Plant Physiology, 84*, 55-60.
30. Jaleel, C., Manivannan, P., Wahid, A., Farooq, M., Al-Juburi, H., Somasundaram, R., & Panneerselvam, R. (2009). Drought stress in plants: A review on morphological characteristics and pigments composition. *International Journal of Agriculture and Biology, 11*(2), 43-56.
31. Kahraman, A. (2017). Effect of humic acid doses on yield and quality parameters of cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp) cultivars. *Legume Research, 2*(1), 1-14. https://doi.org/10.18805/lr.v0iof.3763 .
32. Kramer, P.S. (1983). Water relation of plants. Academic Press. pp. 342-415.
33. Li, S., Bingshu, H., Wang, J., Liu, J., & Xianmin, H. (2020). Risks of caffeine residues in the environment: Necessity for a targeted Eco pharmacovigilance program. *Chemosphere, 243*, 125-143. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.125343 .
34. Lotfi, B., Fotohi, F., Siadat, S.A., & Sadeghi, M. (2018). The effect of nitrogen chemical fertilizer and nitroxin biofertilizer on yield and protein percentage of cowpea seed (*Vigna unguiculata* L.). *Journal of Crop Ecophysiology, 1*(45), 123-138. (In Persian with English abstract).
35. Mahmoodi, R., Nasri, M., & Oveisi, M. (2016). Effects of humic acid spraying on yield and yield components of wheat in drought stress condition. *Journal of Crop Ecophysiology, 8*(1), 10-26.
36. Maiwan, N., Tunçtürk, M., & Tunçtürk, R. (2023). Effect of humic acid applications on physiological and biochemical properties of soybean (*Glycine max* L.) grown under salt stress conditions. *Journal of Agricultural Sciences, 33*(1), 1-9. https://doi.org/10.29133/yyutbd.1057288
37. Moradi, P., & Amini, K. (2017). Extraction and identification of *Urtica dioica* l extract and its antibacterial and antifungal properties. *Journal of Mazandaran University Medical Science, 27*(151), 74-85. (In Persian with English abstract).
38. Nezami, A., Khazaee, H.R., Mirhashemi, S.M., & Hasanzade, F. (2013). The effect of seed hydropriming on germination and seedling growth of maize (*Zea mays* L.) in controlled condition. *Iranian Journal of Seed Science and Technology, 2*(1), 39-54. (In Persian with English abstract).
39. Noghani, F., Kamali, S., & Zaree, G. (2020). Investigation of sensory characteristics and analysis of antioxidant levels of green tea extract and acceptance in minced meat of silver carp (*Hypophtalmichthys molitrix*) stored at refrigerator temperature 4°C. *Advanced Aquaculture Sciences Journal, 3*(3), 63-74.
40. Rahmanian, M., & Ayazpour, K. (2020). Evaluation of the effect of salicylic acid, harmal and tea extracts on mechanical transmission of cucumber mosaic virus. *Research in Plant Pathology, 6*(2), 1-9. (In Persian with English abstract).
41. Rousta, M.J., Enayati, K., Soltani, V., Shiran, M., Ghane, N., Besharat, N., & Neshat, E. (2019). The effects of humic acid application on yield and yield components of wheat and some chemical properties of a saline-sodic soil. *Journal of Soil Management and Sustainable Production, 8*(4), 95-109. (In Persian with English abstract). http://ejsms.gau.ac.ir.
42. Roy, D., Sarkar, S., Sardar, S., & Sengupta, K. (2017). Effect of nutrient management on the incidence of major insect and disease pests in rice-mustard cropping system. *International Journal of Chemical Studies, 5*(6), 1408-1412.
43. Sairam, R.K., & Srivastava, G.C. (2001). Water stress tolerance of wheat *Triticum aestivum* L.: Variation in hydrogen peroxide accumulation and antioxidant activity in tolerant and susceptible genotypes. *Journal of Agronomy and Crop Science, 186*, 63-70. https://doi.org/10.1046/j.1439-037x.2001.00461.x
44. Sakinejad, T., Hossaini, S.M., & Hyvari, M. (2011). Calculate changes of bean germination process in the presence of various compounds of biological fertilizer humic acid mixed with micro and macro elements. *Journal of American Science, 7*(6), 10-14.
45. Shahsavani, S., Abaspour, A., Parsaeian, M., & Unesi, Z. (2017). Effect of fish waste, chemical fertilizer and biofertilizer on yield and yield components of bean (*Vigna sinensis*) and some soil properties. *Iranian Journal of Pulses Research, 8*(1), 45-59. (In Persian with English abstract). https://doi.org/10.22067/ljpr.v8l1.4728
46. Tajik, N., Tajik, M., Mack, I., & Enck, P. (2017). The potential effects of chlorogenic acid, the main phenolic components in coffee, on health: A comprehensive review of the literature. *European Journal of Nutrition, 56*, 22-

35. https://doi.org/10.1007/s00394-017-1379-1
47. Vigardt, A. (2012). Influence of coffee vermicompost on growth and nutrient quality of greenhouse spinach and field grown green bell peppers. Ph.D. Dissertation, Southern Illinois University Carbondale.
48. Yoo, Y., Yoo, Y.H., Lee, D.Y., Jung, K.H., Lee, S.W., & Park, J.C. (2023). Caffeine produced in rice plants provides tolerance to water-deficit stress. *Antioxidants*, *12*(11), 19-34. https://doi.org/10.3390/antiox12111984