



## Effect of Nitrohumic Acid Application on Some Morphological and Physiological Characteristics of Savory Plant (*Satureja hortensis* L.)

M. Mirzaei Varoei<sup>1\*</sup>, Sh. Oustan<sup>2</sup>, A. Reyhanitabar<sup>3</sup>, N. Najafi<sup>4</sup>

Received: 16-01-2023

Revised: 15-02-2023

Accepted: 25-02-2023

Available Online: 25-02-2023

### How to cite this article:

Mirzaei Varoei, M., Oustan, Sh., Reyhanitabar, A., & Najafi, N. (2023). Effect of nitrohumic acid application on some morphological and physiological characteristics of savory plant (*Satureja hortensis* L.). *Journal of Water and Soil*, 37(2), 333-352. (In Persian with English abstract).  
<http://doi.org/10.22067/jsw.2023.80642.1244>

### Introduction

Savory is considered one of the most important medicinal plants, which is used in various food and medical industries. Nitrogen (N) plays a major role on the growth and yield of medicinal plants. Therefore, an adequate supply of N is required for successful production of savory. However, the application of chemical N fertilizers is associated with many obstacles such as groundwater pollution, N enrichment of surface waters, and drop in the quality of plants. Accordingly, nowadays, great attention has been paid to organic fertilizers. In this regard, humic acid-based fertilizers have shown promising results. Humic acids (HAs) could be converted into nitrohumic acids (NHAs) through the nitration process, in which nitro groups (NO<sub>2</sub>) are located on the aromatic rings. This process increases the N content of the HA. Thus, NHAs can be used as organic N fertilizers in the cultivation of medicinal plants whose organic production is a priority. However, the effects of these types of fertilizers on plant growth and physiological characteristics have not been well understood. Accordingly, the present study for the first time investigates the effectiveness of NHA on the morphological and physiological characteristics of savory, as well as N loss through leaching.

### Materials and Methods

In the current study, HA was initially extracted from leonardite (purchased from Yazd Golsang Kavir Company) as a rich source of HA. Then, NHA was prepared through the nitration process using nitric acid (50% by volume). After that, using FT-IR (Fourier transform infrared spectroscopy) and CHNS analysis the extracted HA and NHA were characterized, and their N content was determined. Afterward a greenhouse experiment in a completely randomized design (CRD) with three replications was conducted to determine the effects of 16 treatments, including control (without urea, HA and NHA), urea (U<sub>1</sub>, U<sub>2</sub> and U<sub>3</sub>), humic acid (HA<sub>1</sub>, HA<sub>2</sub> and HA<sub>3</sub>), nitrohumic acid (NHA<sub>1</sub>, NHA<sub>2</sub> and NHA<sub>3</sub>), urea-humic acid (U<sub>1</sub>HA<sub>1</sub>, U<sub>2</sub>HA<sub>2</sub> and U<sub>3</sub>HA<sub>3</sub>), and urea-nitrohumic acid (U<sub>1</sub>NHA<sub>1</sub>, U<sub>2</sub>NHA<sub>2</sub> and U<sub>3</sub>NHA<sub>3</sub>) on the morphological and physiological characteristics of savory plant. The treatment levels were determined as 40, 80, and 120 mg N kg<sup>-1</sup> for the first, second and third level of the treatments, respectively. In the combined treatments of urea and HA or NHA, an equal fraction of the total nitrogen (N) was applied. At the end of the experiment, standard methods were used to assess various characteristics, including root length, leaf area, plant height, root volume, wet and dry weights of shoot and root, leaf chlorophyll index, concentrations of phosphorus, potassium, nitrogen, nitrate, and nitrate reductase in both the shoot and root. Additionally, leaching was conducted on specific days during the experiment, and the leachate was collected for nitrate measurement.

### Results and Discussion

The results showed that using the nitration process, some characteristics of the NHA such as total acidity, the content of carboxylic and phenolic groups as well as N content improved as compared to the initial HA. Moreover, the results indicated that most of the morphological and physiological traits of savory plants, including leaf area,

1, 2, 3 and 4- Ph.D Candidate and Professors, Department of Soil Science, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran, respectively.

(\*- Corresponding Author Email: [mansourmirzaei63@gmail.com](mailto:mansourmirzaei63@gmail.com))

DOI: [10.22067/jsw.2023.80642.1244](https://doi.org/10.22067/jsw.2023.80642.1244)

plant height, root length, fresh and dry weights of root and shoot as well as chlorophyll index, and the concentration of nitrogen, phosphorous, potassium, nitrate and nitrate reductase enzyme were significantly higher in the NHA treatments than those of HA. In addition, the highest shoot dry weight was obtained in the combined treatments of  $U_3NHA_3$  and  $U_3HA_3$  as well as in the  $U_3$  treatment alone. The average rate of nitrate concentration increase in the U treatments was 1.77 times higher than the UNHA treatments. According to the results,  $U_3$  treatment indicated the highest nitrate loss which by using the  $U_3NHA_3$  treatment, the mean concentration of nitrate in the leachate decreased by about 40.5% as compared to the  $U_3$  treatment.

### Conclusion

The findings of this research revealed that most of the morphological and physiological traits of savory plant showed better responses to the combined treatments of  $U_3NHA_3$  and  $U_3HA_3$  as well as to the  $U_3$  treatment alone. However, with regard to the lower accumulation of nitrate in the shoot of savory as well as to the lower nitrate leaching, the combined treatments were preferred. Accordingly, NHA can be a alternative nitrogen source in increasing the yield and growth indicators of savory. However, the reasons behind the fact of the better performance of combined nitrogen treatments than the individual ones require more research in the future.

**Keywords:** Combined treatment, Leonardite, Nitrate leaching, Nitrate reductase enzyme, Urea

## مقاله پژوهشی

جلد ۳۷، شماره ۲، خرداد-تیر ۱۴۰۲، ص. ۳۳۳-۳۵۲

## تأثیر کاربرد نیترو هیومیک اسید بر برخی ویژگی‌های مورفولوژیک و فیزیولوژیک گیاه دارویی (*Satureja hortensis* L.) مرزه

منصور میرزایی و رویی<sup>۱\*</sup> - شاهین اوستان<sup>۲</sup> - عادل ریحانی تبار<sup>۳</sup> - نصرت‌اله نجفی<sup>۴</sup>

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۱۰/۲۶

تاریخ بازنگری: ۱۴۰۱/۱۱/۲۶

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۱۲/۰۶

## چکیده

مصرف کودهای شیمیایی نیتروژن دار مشکلات عدیده‌ای همچون آلودگی آب‌های زیرزمینی، غنی شدن آب‌های سطحی و کاهش کیفیت گیاهان دارویی را به همراه دارد. در پژوهش حاضر، تأثیر هیومیک اسید نیتروژن دار شده یا نیترو هیومیک اسید (NHA) بر رشد و ترکیب عنصری گیاه مرزه و نیز هدررفت نیتروژن بررسی شد. برای این منظور، NHA از واکنش نیتریک اسید با هیومیک اسید (HA) استخراج شده از لئوناردیت شرکت گل‌سنگ کویر یزد تهیه شد و ویژگی‌های آن با استفاده از روش طیف‌سنجی مادون قرمز (FT-IR) و درصد نیتروژن آن به روش آنالیز CHNS تعیین گردید. سپس، یک آزمایش گلخانه‌ای با کشت گیاه مرزه در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۱۶ تیمار شامل شاهد (بدون مصرف اوره، HA و NHA)، اوره (U<sub>1</sub>، U<sub>2</sub> و U<sub>3</sub>)، هیومیک اسید (HA<sub>1</sub>، HA<sub>2</sub>، HA<sub>3</sub>)، اوره-هیومیک اسید (U<sub>1</sub>HA<sub>1</sub>، U<sub>2</sub>HA<sub>2</sub> و U<sub>3</sub>HA<sub>3</sub>)، نیترو هیومیک اسید (NHA<sub>1</sub>، NHA<sub>2</sub> و NHA<sub>3</sub>) و اوره-نیترو هیومیک اسید (U<sub>1</sub>NHA<sub>1</sub>، U<sub>2</sub>NHA<sub>2</sub> و U<sub>3</sub>NHA<sub>3</sub>) در ۳ تکرار انجام شد. سطوح تیمارها به میزان ۴۰ mg N kg<sup>-1</sup> برای سطح اول، ۸۰ mg N kg<sup>-1</sup> برای سطح دوم و ۱۲۰ mg N kg<sup>-1</sup> برای سطح سوم تعیین شد و در تیمارهای مخلوط، سهم برابری از نیتروژن برای اوره و HA و یا اوره و NHA در نظر گرفته شد. نتایج نشان داد که NHA نسبت به HA از اسیدیته کل و نیز محتوای نیتروژن بیش‌تری برخوردار بود. به‌علاوه، اغلب صفات مورفولوژیک و فیزیولوژیک گیاه مرزه شامل سطح برگ، ارتفاع گیاه، طول ریشه، قطر ساقه، وزن تر و خشک بخش هوایی و ریشه و نیز شاخص کلروفیل، غلظت نیتروژن، فسفر، پتاسیم، نیترات و آنزیم نیترات ردوکتاز در تیمارهای NHA به‌طور معناداری بیش‌تر از تیمارهای HA بودند. همچنین، بیش‌ترین وزن خشک بخش هوایی در تیمارهای تلفیقی U<sub>3</sub>NHA<sub>3</sub> و U<sub>3</sub>HA<sub>3</sub> و تیمار U<sub>3</sub> مشاهده شد. میانگین شدت افزایش غلظت نیترات بخش هوایی با افزایش سطح نیتروژن در تیمارهای اوره ۱/۷۷ برابر تیمارهای تلفیقی UNHA بود. نتایج نشان داد که آبشویی نیترات از خاک با کاربرد تیمار U<sub>3</sub>NHA<sub>3</sub> حدود ۴۰/۵ درصد نسبت به تیمار U<sub>3</sub> کاهش یافت. یافته‌های این پژوهش نشان داد که کود تلفیقی UNHA می‌تواند به‌عنوان یک کود نیتروژن دار در افزایش عملکرد و شاخص‌های رشد گیاه دارویی مرزه مطرح گردد.

واژه‌های کلیدی: آبشویی نیترات، آنزیم نیترات ردوکتاز، اوره، تیمار تلفیقی، لئوناردیت

## مقدمه

گیاهان دارویی و معطر است که در صنایع مختلف غذایی و دارویی کاربرد دارد و به‌طور گسترده در مناطق مختلف ایران کشت می‌شود (Mehdizadeh et al., 2020). این گیاه از خانواده Lamiaceae

مرزه با نام علمی *Satureja hortensis* L. یکی از مهم‌ترین

۱، ۲، ۳ و ۴- به ترتیب دانشجوی دکتری و استادان گروه علوم و مهندسی خاک، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران

\* - نویسنده مسئول: (Email: mansourmirzaei63@gmail.com)

چند که کمترین میزان اسانس مرزه را نیز برای همین تیمار گزارش کردند. بعلاوه، مکی‌زاده تفتی و همکاران (Makizadeh *et al.*, 2012) بالاترین میزان ارتفاع گیاه، تعداد شاخه فرعی و وزن خشک اندام هوایی را برای تیمار تلفیقی کود زیستی و ۵۰ درصد کود اوره (۷۵ کیلوگرم نیتروژن در هکتار) و بالاترین میزان اسانس را برای تیمار کود شیمیایی (۱۰۰ کیلوگرم نیتروژن در هکتار) مشاهده کردند.

از طرفی، گزارش‌ها نشان می‌دهند که تقریباً ۲۰ تا ۷۰ درصد از اوره مصرف‌شده در زمین‌های زراعی از طریق آبیاری، نیترات‌زدایی و تصعید هدر می‌رود (Naz and Sulaiman, 2016) که می‌تواند منجر به مشکلات جدی زیست‌محیطی از طریق آلودگی آب‌های زیرزمینی و انتشار N<sub>2</sub>O و آمونیاک در اتمسفر شود (Shi *et al.*, 2020). یکی از تدابیر مدیریتی در جهت کاهش تلفات نیتروژن و مقابله با اثرات منفی کودهای شیمیایی، استفاده از کودهای کندرها است که رهاسازی تأخیری نیتروژن را تضمین کرده و شرایط خاک و رشد گیاه را نیز بهبود می‌بخشد (Trenkel, 2010). مواد هیومیک می‌توانند به‌عنوان کود کندرها، نیتروژن مورد نیاز گیاه را فراهم نمایند (Ozkan and Ozkan, 2017). نتایج پژوهش‌های پیشین حاکی از آن است که هیومیک اسید (HA) سبب افزایش معنادار صفات زراعی مرزه از جمله طول ریشه، ارتفاع بوته، تعداد شاخه‌های فرعی، وزن خشک برگ در بوته، وزن خشک و تر بخش هوایی، عملکرد ماده خشک، عملکرد اسانس، عملکرد بذر، طول ساقه و سطح برگ گیاه می‌گردد (Farahani and Madani, 2014; Zaremanesh *et al.*, 2022). اما با توجه به اینکه HA دارای درصد نیتروژن پایینی است، بنابراین استفاده از مقادیر زیاد آن می‌تواند برای رشد گیاه محدودکننده باشد (Kalaichelvi *et al.*, 2006). در این رابطه، هیومیک اسیدهای نیتروژن‌دار شده یا نیتروهیومیک اسیدها (NHAs) به‌عنوان کود نیتروژن (Yan *et al.*, 2022; Wang *et al.*, 2022) و محرک رشد گیاه (Patti *et al.*, 1992) مورد توجه قرار گرفته‌اند. معمولاً NHAs از اکسیدشدن منابعی همچون کمپوست (Syahren and Wong, 2008) و یا زغال سنگ (Thorn and Cox, 2016) با نیتریک اسید (فرآیند نیترودار کردن) تولید می‌شوند. طی این فرآیند، گروه‌های نیترو (-NO<sub>2</sub>) به HA افزوده می‌شوند (Fatima *et al.*, 2021). در محیط خاک NHA به‌وسیله آنزیم نیتروژن‌کناز احیا شده و سپس برای تولید یون‌های NH<sub>4</sub><sup>+</sup> دامینه می‌شود (Ju and Parales, 2010). در برخی پژوهش‌ها فواید مصرف توام هیومیک اسید و اوره به اثبات رسیده است (Kong *et al.*, 2022) با این حال، خواص برتر محصول حاصل از واکنش مواد هیومیک و نیتریک اسید اخیراً مورد توجه قرار گرفته (Huang *et al.*, 2019) و مصرف مواد هیومیک غنی شده از نیتروژن به‌عنوان کود توصیه شده است (Li *et al.*, 2022).

به‌طور کلی، تحقیقات اندکی در مورد اثر نیتروهیومیک اسید بر رشد

(نعناعیان) بوده و به‌صورت بوته‌ای رشد می‌کند (Skubij and Dzida, 2019). سرشاخه‌های گل‌دار از مهم‌ترین بخش‌های قابل استفاده این گیاه بوده و معمولاً بعد از برداشت در سایه خشک می‌شوند. گیاه مرزه به‌طور گسترده در کشور کشت می‌شود (Sabouri *et al.*, 2018). به دلیل اهمیت زیاد گیاهان دارویی، لازم است که فعالیت‌های پژوهشی بیش‌تری در راستای افزایش کمی و کیفی این محصولات به‌ویژه مرزه انجام گیرد.

نیتروژن یکی از مهم‌ترین عناصر پرمصرف برای گیاهان دارویی است که نقش مهمی در تولید زیاده گیاه ایفا می‌کند و به‌طور مستقیم و غیرمستقیم تولید متابولیت‌های ثانویه گیاه را تحت تأثیر قرار می‌دهد (Skubij and Dzida, 2019). نیتروژن با تأثیر بر رشد ریشی و زایشی گیاهان دارویی، کمی و کیفیت مواد مؤثره آن‌ها را تحت تأثیر قرار می‌دهد (Gruandwald and Buttle, 1996). بر اساس نتایج مطالعات پیشین، نیتروژن با افزایش طول دوره رشد و نیز با شدت بخشیدن فرآیند ماده‌سازی، اسکلت کربنی مورد نیاز برای سنتز هرچه بیشتر متابولیت‌های ثانویه در گیاه مرزه را فراهم می‌آورد (Arvin, 2019).

توصیه کودی برای گیاهان دارویی بایستی با دقت انجام شود، زیرا ممکن است یک تیمار کودی سبب افزایش محصول گردد درحالی‌که میزان و یا کیفیت ماده مؤثره گیاهان دارویی را کاهش دهد و یا سبب تجمع برخی ترکیبات مضر مانند نیترات در گیاه شود (Karamian *et al.*, 2013). علاوه بر این، از آنجایی که طبیعی بودن مواد استحصال شده از گیاهان دارویی اهمیت خاصی دارد، ضروری است که به‌کارگیری کودهای شیمیایی نیز دقت بیشتری شود (Alizadeh Sahzabi *et al.*, 2007). کود اوره یکی از پرمصرف‌ترین کودهای نیتروژن محسوب می‌شود (Mariano *et al.*, 2019). این کود حدود ۸۰ درصد از مصرف کودهای نیتروژن را تشکیل می‌دهد (Guha *et al.*, 2022) که می‌تواند سبب افزایش عملکرد گیاهان دارویی مانند مرزه شود. در این راستا، علیزاده سهزابی و همکاران (Alizadeh Sahzabi *et al.*, 2007) اثر تیمارهای کودی مختلف شامل کاربرد اوره به‌صورت خاکی در چهار سطح صفر، ۵۰، ۱۰۰ و ۱۵۰ کیلوگرم نیتروژن خالص در هکتار و به‌صورت محلول‌پاشی در چهار سطح صفر، ۴/۵، ۶ و ۷/۵ درصد نیتروژن خالص در هکتار را بر ویژگی‌های کمی و کیفی گیاه مرزه را بررسی کردند. نتایج آنان نشان داد که بیشترین عملکرد بیولوژیک، بذر و سرشاخه گل‌دار گیاه مرزه به‌ترتیب به میزان ۴۴۳۴، ۸۷۵/۳ و ۱۸۵۵ کیلوگرم در هکتار با اعمال ۱۰۰ کیلوگرم نیتروژن خالص در هکتار به‌صورت محلول‌پاشی به دست آمد. از سوی دیگر، کرمان و همکاران (Karamian *et al.*, 2013) بیش‌ترین وزن تر و خشک گیاه مرزه را برای تیمار کودی ۲۰۰ کیلوگرم نیتروژن در هکتار مشاهده کردند؛ هر

**جدول ۱** ارائه شده است. همان‌طور که در این جدول مشاهده می‌شود، مقدار نیتروژن NHA تولید شده حدود ۲ برابر مقدار نیتروژن HA بوده و به علاوه نسبت به HA، از میزان اسیدیته کل و گروه‌های کربوکسیل و فنلی بالاتری نیز برخوردار است. در واقع، واکنش نیترودار کردن، از طریق اکسایش HA با نیتریک اسید، سبب افزایش محتوای نیتروژن در ساختار NHA، به واسطه استخلاف گروه‌های نیترو ( $\text{NO}_2$ ) (Boral *et al.*, 2021) شده که در طیف‌های FTIR (شکل ۱) نشان داده شده است. پیک‌های موجود در دامنه‌های  $1546-1529 \text{ cm}^{-1}$  و  $1377-1327 \text{ cm}^{-1}$  به ارتعاش کششی پیوندهای گروه‌های نیترو ( $\text{NO}_2$ ) نسبت داده می‌شوند (Nasir *et al.*, 2011).

### آزمون جوانه‌زنی بذر

برای ارزیابی احتمال سمیت HA و NHA، یک آزمایش جوانه‌زنی بذر انجام شد. برای این کار، تعداد ۳۰ عدد بذر مرزه (رقم اورامانی) در ۳ تکرار در پتری دیش‌هایی با قطر ۱۲ سانتی‌متر روی کاغذ صافی قرار داده شدند. سپس، ۱۰ میلی‌لیتر از عصاره HA استخراج شده و NHA تولید شده از لئوناردیت با غلظت ۲۵۰ میلی‌گرم در لیتر به هر پتری اضافه شده و در دمای ۲۲ درجه سلسیوس انکوباتور به مدت ۴۸ ساعت نگهداری شدند. در نهایت، نسبت جوانه‌زنی بذر ( $\text{RSG}^1$ )، نسبت رشد ریشه‌چه ( $\text{RRG}^2$ )، جوانه‌زنی بذر ( $\text{SG}^3$ ) و شاخص جوانه‌زنی ( $\text{GI}^4$ ) به ترتیب با استفاده از معادله‌های ۱، ۲، ۳ و ۴ محاسبه شدند (Luo *et al.*, 2018).

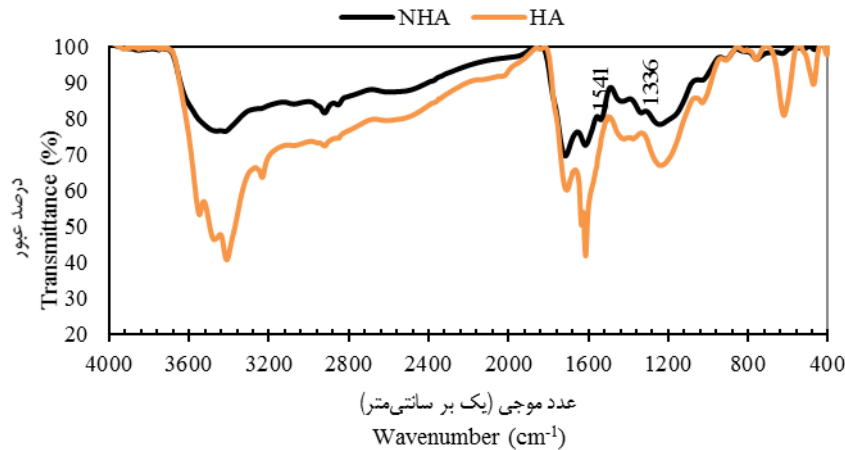
و عملکرد گیاهان مختلف انجام شده است. از این‌رو، با توجه به اهمیت و فواید مصرف کودهای آلی در کشت گیاهان دارویی، در این پژوهش یک هیومیک اسید غنی‌شده با نیتروژن تولید شد و برای اولین بار اثر آن بر ویژگی‌های مورفولوژیک و فیزیولوژیک گیاه دارویی مرزه و هدررفت نیتروژن در مقایسه با کود اوره بررسی گردید.

## مواد و روش‌ها

### تولید نیترو هیومیک اسید (NHA)

برای تهیه NHA، از لئوناردیت به عنوان یک منبع غنی از HA (Akimbekov *et al.*, 2020) استفاده شد. برای استخراج HA، لئوناردیت (حاوی ۳۲ درصد HA) خریداری شده از شرکت گل‌سنگ کویر یزد در محلول NaOH نیم مولار در نسبت جامد به محلول ۱ گرم به ۱۰ میلی‌لیتر در ۱۶۰ دور در دقیقه به مدت ۲۴ ساعت در تاریکی تکان داده شد. سپس، سوسپانسیون حاصله به مدت ۱۵ دقیقه با سرعت ۶۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد و محلول رویی جمع‌آوری گردید. محلول جمع‌آوری شده با افزودن قطره قطره HCl ۶ مولار تا  $\text{pH}=1$  اسیدی شد و HA رسوب داده شده بعد از ۲۴ ساعت جمع‌آوری گردید. HA به دست آمده با مخلوطی از HCl (۰/۱ مولار) و HF (۰/۳ مولار) به مدت ۲۴ ساعت تکان داده شد تا ناخالصی‌های معدنی حذف شوند. سپس، HA با آب مقطر شسته شد تا یون‌های کلرید آزاد حذف شوند (Swift, 1996). در نهایت، HA ابتدا هوا خشک شده و سپس در دسیکاتور حاوی سیلیکاژل خشک گردید. HA استخراج شده با نیتریک اسید ۵۰ درصد (حجمی/حجمی) با نسبت جامد به محلول ۱ به ۲/۵ به مدت ۲۴ ساعت در حمام یخ خیسانده شد. سپس، به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۹۰ درجه سلسیوس حرارت داده شد. در ادامه، با آب مقطر به نسبت ۱:۱۰۰، سه بار شسته شد و در دمای ۴۰ درجه سلسیوس خشک گردید (Almendros and Dorado, 1999). تجزیه عنصری (درصدهای کربن، هیدروژن، نیتروژن، گوگرد و اکسیژن) با دستگاه CHNS Analyzer مدل (vario EL III Element Analyzer)، شناسایی گروه‌های عاملی با استفاده از دستگاه FT-IR مدل (Vector 22 ساخت شرکت Bruker Optics کشور آلمان)، اسیدیته کل با استفاده از روش هیدروکسید باریم، فراوانی گروه‌های کربوکسیل با استفاده از روش استات کلسیم و فراوانی گروه‌های هیدروکسیل فنولی از تفاضل اسیدیته کل و گروه‌های کربوکسیلی به دست آمد (Swift, 1996). برای تعیین مقدار خاکستر، ۱ گرم از HA و NHA به مدت ۴ ساعت در کوره با دمای ۷۵۰ درجه سلسیوس قرار داده شد (Standard, 2011).

ویژگی‌های HA استخراج شده و NHA تولید شده از لئوناردیت در



شکل ۱- طیف FT-IR نیترو هیومیک اسید (NHA) در مقایسه با هیومیک اسید (HA)  
 Figure 1- FT-IR spectrum of nitronitrohumic acid (NHA) compared to humic acid (HA)

جدول ۱- مقادیر اسیدیته کل، گروه‌های کربوکسیل و فنولی، تجزیه عنصری، نسبت‌های اتمی و درصد خاکستر هیومیک اسید (HA) و نیترو هیومیک اسید (NHA) به دست آمده از لئوناردیت

Table 1-The measured values of total acidity, carboxylic group, phenolic group, elemental composition, atomic ratios, and ash content for HA and NHA extracted from leonardite

منبع آلی Organic Source	%						C/N	(meq g <sup>-1</sup> )		
	C کربن	H هیدروژن	N نیتروژن	S گوگرد	O اکسیژن	Ash خاکستر		اسیدیته کل Total acidity	گروه‌های کربوکسیل Carboxylic groups	گروه‌های فنولی Phenolic groups
HA	61.2	3.1	1.6	0.82	25.1	8.3	45.4	14.9	3.2	11.7
NHA	57.7	2.6	3.3	0.71	31.1	4.6	20.5	16.4	3.85	12.6

C/N = [(%C / 12.011) / (%N / 14.0067)]      %O = [100 - (C % + H % + N % + S % + Ash %)]

$$GI = RSG \times RRG \quad [4]$$

$$RSG = \frac{\text{تعداد بذر جوانه زده در نمونه}}{\text{تعداد بذر جوانه زده در شاهد}} \quad [1]$$

$$RRG = \frac{\text{طول کل ریشه‌چه‌های بذرهای جوانه زده در نمونه}}{\text{طول کل ریشه‌چه‌های بذرهای جوانه زده در شاهد}} \quad [2]$$

$$SG = \frac{\text{تعداد بذرهای جوانه زده}}{\text{تعداد کل بذر}} \times 100 \quad [3]$$

نتایج مربوط به آزمون جوانه زنی بذر مرزه در جدول ۲ آورده شده است. به طور کلی، با توجه به اینکه مقادیر GI بزرگتر از ۰/۸ بیانگر عدم سمیت است (Luo et al., 2018). لذا، NHA تولید شده از لئوناردیت برای گیاه سمی نخواهند بود.

جدول ۲- نتایج آزمون جوانه زنی بذر مرزه در تیمارهای هیومیک اسید (HA) و نیترو هیومیک اسید (NHA) به دست آمده از لئوناردیت  
 Table 2- Results of seed germination test of savory obtained at each treatment of HA and NHA extracted from leonardite

تیمار Treatment	تعداد بذرهای جوانه زده Number of germinated seeds	طول کل ریشه‌چه‌ها Total radicle length of germinated seeds (cm)	SG	RSG	RRG	GI
HA (شاهد)	26.3	43.3	0.88			
NHA	26	52.2	0.87	0.99	1.21	1.20

SG: جوانه زنی بذر، RSG: نسبت جوانه زنی بذر، RRG: نسبت رشد ریشه‌چه، GI: شاخص جوانه زنی بذر  
 SG: Seed germination, RSG: Relative seed germination, RRG: Relative radical growth, GI: Germination index

### آماده‌سازی و تعیین ویژگی‌های خاک

ابتدا خاک مورد نظر از عمق صفر تا ۲۰ سانتی متری اراضی دانشگاه کردستان با مختصات جغرافیایی ۳۵ درجه و ۲۸ دقیقه ۸ ثانیه شمالی و ۴۸ درجه و ۱۰ ثانیه شرقی نمونه برداری شده و بعد از هوا خشک شدن و نرم شدن از الک ۲ میلی متری عبور داده شد. سپس، برخی از ویژگی‌های شیمیایی و فیزیکی خاک شامل بافت (Gee and Or, 2002)، رطوبت معادل مکش ۰/۱ بار (Klute and Dirksen, 1986)، قابلیت هدایت الکتریکی (EC<sub>1:2</sub>) و pH<sub>1:2</sub> (Gavlak et al., 2003)، کربن آلی (Nelson and Sommers, 1996)، ظرفیت تبادل کاتیونی (CEC) در pH ۸/۲ (Chapman, 1965)، کربنات کلسیم معادل (CCE) (Allison and Moodie, 1965)، نیتروژن کل (Jones, 2001)، فسفر قابل جذب با روش اولسن (Kuo, 1996) و پتاسیم قابل جذب با عصاره گیر اساتت آمونیوم (Pansu and Gautheyrou, 2007) اندازه گیری شدند. نیترات و آمونیوم خاک به ترتیب با استفاده از K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ۰/۰۵ مولار (Black and Waring, 1978) و ۲ KCl مولار (Keeney and Nelson, 1982) استخراج شده و با روش‌های سالیسیلیک اسید (Vendrell and Zupancic, 1990) و ایندوفنول بلو (Riley and Sinhaseni, 1957) اندازه گیری شدند. خاک نمونه برداری شده یک خاک لوم شنی آهکی فقیر از نظر کربن آلی و نیتروژن کل بود (جدول ۳).

### آزمایش گلخانه‌ای (کشت گلدانی، اعمال تیمارها و آبنویی گلدان‌ها)

یک آزمایش گلخانه‌ای در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۳ تکرار انجام شد. تیمارهای آزمایشی در ۱۶ سطح شامل: بدون هیومیک اسید و اوره (HA<sub>0</sub>-U<sub>0</sub>) (شاهد)، سطح اول کود اوره (U<sub>1</sub>)، سطح دوم کود

اوره (U<sub>2</sub>)، سطح سوم کود اوره (U<sub>3</sub>)، سطح اول هیومیک اسید (HA<sub>1</sub>)، سطح دوم هیومیک اسید (HA<sub>2</sub>)، سطح سوم هیومیک اسید (HA<sub>3</sub>)، سطح اول نیترو هیومیک اسید (NHA<sub>1</sub>)، سطح دوم نیترو هیومیک اسید (NHA<sub>2</sub>)، سطح سوم نیترو هیومیک اسید (NHA<sub>3</sub>)، سطح اول کود اوره-هیومیک اسید (U<sub>1</sub>HA<sub>1</sub>)، سطح دوم کود اوره-هیومیک اسید (U<sub>2</sub>HA<sub>2</sub>)، سطح سوم کود اوره-هیومیک اسید (U<sub>3</sub>HA<sub>3</sub>)، سطح اول کود اوره-نیترو هیومیک اسید (U<sub>1</sub>NHA<sub>1</sub>)، سطح دوم کود اوره-نیترو هیومیک اسید (U<sub>2</sub>NHA<sub>2</sub>) و سطح سوم کود اوره-نیترو هیومیک اسید (U<sub>3</sub>NHA<sub>3</sub>)، بودند. سطوح تیمارها به میزان ۴۰ میلی گرم نیتروژن در کیلوگرم خاک برای سطح اول، ۸۰ میلی گرم نیتروژن در کیلوگرم خاک برای سطح دوم و ۱۲۰ میلی گرم نیتروژن در کیلوگرم خاک برای سطح سوم تعیین شد (Alizadeh Sahzabi et al., 2007). همچنین، در تیمارهای مخلوط، سهم برابری از نیتروژن برای اوره و NHA یا HA در نظر گرفته شد. برای اعمال تیمارها، HA و NHA قبل از کشت بذر به خاک گلدان‌ها افزوده شده و به مدت ۲ هفته در رطوبت ۰/۱ بار انکوبه شدند. اوره نیز به صورت تقسیط شده در سه نوبت در روزهای ۵، ۲۵ و ۵۵ بعد از کشت بذر همراه با آب آبیاری به گلدان‌ها اضافه شد.

در این آزمایش تعداد ۴۸ گلدان پلاستیکی ۲ کیلوگرمی تهیه شد و گلدان‌ها بعد از اعمال تیمارها به مدت ۲ هفته در رطوبت ۰/۱ بار انکوبه شدند. سپس، تعداد ۳۰ عدد بذر مرزه (رقم اورامانی) در عمق ۰/۵ تا ۱ سانتی متری گلدان‌ها کشت شد. پس از سبز شدن بوته‌ها و اطمینان از استقرار آن‌ها، تعداد بوته‌ها در هر گلدان به ۲۰ عدد کاهش یافت. رطوبت گلدان‌ها با استفاده از توزین در ۷۰ تا ۸۰ درصد رطوبت معادل مکش ۰/۱ بار نگهداری شد.

جدول ۳- برخی از ویژگی‌های فیزیوشیمیایی خاک مورد استفاده در مطالعه

Table 3- Some of the physicochemical properties of the soil sample used in the study

پارامتر Parameter	نتایج Results	پارامتر Parameter	نتایج Results
pH <sub>1:2</sub>	8.03	پتاسیم قابل جذب Available potassium (mg kg <sup>-1</sup> )	304
قابلیت هدایت الکتریکی EC <sub>1:2</sub> (dS m <sup>-1</sup> )	0.2	کربنات کلسیم معادل CCE (%)	24
نیتروژن آمونیومی NH <sub>4</sub> -N (mg kg <sup>-1</sup> )	7.93	کربن آلی OC (%)	0.46
نیتروژن نیتراتی NO <sub>3</sub> -N (mg kg <sup>-1</sup> )	9.15	شن Sand (%)	14
ظرفیت تبادل کاتیونی CEC (cmol <sub>c</sub> kg <sup>-1</sup> )	15.4	سیلت Silt (%)	75
نیتروژن کل TN (mg kg <sup>-1</sup> )	320	رس Clay (%)	11
فسفر قابل جذب Available phosphorus (mg kg <sup>-1</sup> )	22.3	بافت Texture	لوم شنی Sandy loam



در ۴ درجه سلسیوس با ۸ میلی‌لیتر محلول حاوی بافر فسفاتی (۱ pH=7.5، ۰/۱ مولار)، EDTA (۱ میلی‌مولار)، دی‌تیوتربیتول (۱ میلی‌مولار) و کازئین ۲/۲ درصد (وزنی/حجمی) ساییده شد. سپس، عصاره صاف شد و با سانتیفریوژ یخچال‌دار (Hettich, Universal 320R) در ۵۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۵ دقیقه و دمای ۲ درجه سلسیوس سانتیفریوژ شد. برای سنجش سینتیکی غلظت آنزیم نیترات ردوکتاز، لوله آزمایش حاوی ۱/۷ میلی‌لیتر محلول محتوی ترکیبات ۰/۱ میلی‌لیتر بافر فسفات (۱ pH=7.5، ۱ مولار)، ۰/۱ میلی‌لیتر NADH (۱ میلی‌گرم در لیتر)، ۰/۲ میلی‌لیتر KNO<sub>3</sub> (۰/۱ مولار)، ۱/۲ میلی‌لیتر آب مقطر و ۰/۱ میلی‌لیتر عصاره آنزیمی، به مدت ۲۰ دقیقه در حمام آبی در دمای ۲۷ درجه سلسیوس قرار گرفت. واکنش با افزودن ۱ میلی‌لیتر سولفانیلامید (۱ گرم در ۱۰۰ میلی‌لیتر اسید کلریدریک نرمال) متوقف شد. بعد از ۵ دقیقه، ۱ میلی‌لیتر N-نفتیل اتیلن دی‌آمین دی‌کلراید (۰/۱ درصد، وزنی/حجمی) اضافه شد و نمونه سانتیفریوژ (۲۰۰۰ دور در دقیقه، ۱۵ دقیقه، ۲ درجه سلسیوس) گردید. سپس، جذب در طول موج ۵۴۰ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر UV-VIS (Analytik Jena- Specord 210 Plus) قرائت شد. محلول‌های استاندارد با استفاده از نیتريت سدیم (NaNO<sub>2</sub>) تهیه شدند و غلظت آنزیم بر حسب میکرومول نیتريت در گرم وزن تازه بافت در ساعت محاسبه گردید.

### تجزیه آماری

در این پژوهش، تجزیه واریانس و مقایسه میانگین‌ها (آزمون دانکن در سطح احتمال ۵ درصد) با استفاده از نرم‌افزار SAS و رسم نمودارها با نرم‌افزار Excel انجام شد.

### نتایج و بحث

#### ویژگی‌های مورفولوژیک

نتایج تجزیه واریانس نشان داد که اثر تیمارها بر همه ویژگی‌های مورفولوژیک گیاه مرزه (به‌استثنای طول ریشه) در سطح احتمال ۰/۱ درصد معنادار بود (جدول ۴). مقایسه میانگین اثر تیمارها نیز در جدول ۵ ارائه شده است.

#### سطح برگ

بیش‌ترین میزان سطح برگ مربوط به تیمار U<sub>3</sub> (۴۵۰ سانتی‌متر مربع) بود که با تیمارهای U<sub>3</sub>NHA<sub>3</sub>، U<sub>3</sub>HA<sub>3</sub> و NHA<sub>3</sub> تفاوت معناداری نداشت. در واقع، HA و به‌ویژه NHA در رشد برگ‌های گیاه مؤثر بوده و از این طریق میزان مصرف کود اوره را کاهش دادند.

شرایط دمایی گلخانه در محدوده ۱۸ تا ۲۲ درجه سلسیوس بود. شاخص کلروفیل برگ‌ها ۷۰ روز بعد از کشت با استفاده از کلروفیل‌سنج OPTI-SCIENCE مدل CCM-200 تعیین شد (Uzoma et al., 2011). به‌منظور بررسی اثر تیمارها بر میزان آیشویی نیترات از خاک، گلدان‌ها در فواصل زمانی معین (هر ۱۰ روز یک‌بار) آیشویی شدند. بر این اساس، برای جمع‌آوری آیشویه گلدان‌ها، ۲۵ درصد آب مازاد بر رطوبت مکش ۰/۱ بار برای تأمین نیاز آیشویی لحاظ شد. بعد از هر بار آیشویی، غلظت نیترات در آیشویه اندازه‌گیری شده و آیشویه جمع‌آوری شده تا زمان برگرداندن شدن به گلدان در مواقع آبیاری منجمد شد.

#### تعیین صفات مورفولوژیک و فیزیولوژیک گیاه مرزه

در پایان دوره رشد رویشی که ۷۵ روز طول کشید، ارتفاع گیاه و تعداد برگ‌ها تعیین شدند. همچنین، بعد از کف‌بردن گیاهان، وزن تر ریشه و بخش هوایی، طول ریشه، حجم ریشه و سطح برگ (با استفاده از سطح سنج برگ پرتابل مدل AM200 کمپانی ADC) و قطر ساقه (با استفاده از کولیس دیجیتال) اندازه‌گیری شدند. همچنین، وزن‌های خشک بعد از خشک‌کردن ریشه‌ها و بخش‌های هوایی در خشک‌کن فن‌دار (SELECTA، ساخت اسپانیا) در دمای ۷۰ درجه سلسیوس به مدت ۷۲ ساعت تعیین شدند. صفات فیزیولوژیک گیاه شامل نیتروژن کل به روش کلدال (Jones, 2001) و غلظت فسفر و پتاسیم بعد از خشک‌سوزانی (Westerman, 1990) به ترتیب به روش‌های رنگ‌سنجی (Cottenie, 1980) و نشر شعله‌ای (Wallinga et al., 1989) تعیین شدند.

#### تعیین غلظت نیترات در گیاه

استخراج نیترات از گیاه به‌روش عصاره‌گیری با سولفات آلومینیم انجام شد (Jones, 2001). بر این اساس، مقدار ۴۰۰ میلی‌گرم از برگ خشک شده به یک فالکون ۵۰ میلی‌لیتری انتقال داده شد و به آن ۴۰ میلی‌لیتر محلول ۰/۰۲۵ مولار سولفات آلومینیم (Al<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>3</sub>) اضافه گردید و به مدت ۱۵ دقیقه در شیکر رفت و برگشتی با ۱۲۰ دور در دقیقه تکان داده شد. سپس، با استفاده از کاغذ صافی واتمن شماره ۴۰ صاف گردید. در نهایت، غلظت نیترات به‌روش سالیسیلیک اسید (Cataldo et al., 1975) تعیین شد.

#### تعیین غلظت آنزیم نیترات ردوکتاز در گیاه

غلظت آنزیم نیترات ردوکتاز در بافت تازه بخش هوایی و ریشه در پایان دوره رشد رویشی تعیین گردید (Stewart et al., 1973). نمونه‌ها تا زمان اندازه‌گیری در دمای ۷۰- درجه سلسیوس نگهداری شدند. برای تهیه عصاره آنزیمی، ۱ گرم از نمونه‌های برگ و ریشه در هاون چینی



UNHA مؤثرتر از تیمارهای منفرد NHA بودند و به‌طور میانگین طول ریشه در تیمارهای تلفیقی ۱/۲ سانتی‌متر بیش‌تر از تیمارهای منفرد بود.

#### ارتفاع گیاه

بیشترین ارتفاع گیاه در تیمار  $U_3NHA_3$  (۲۶/۷ سانتی‌متر) مشاهده شد که با تیمارهای  $U_2NHA_2$  و  $U_3HA_3$  تفاوت معناداری نداشت. کمترین ارتفاع گیاه متعلق به تیمار شاهد (۱۶/۳ سانتی‌متر) بود. ارتفاع گیاه در تیمارهای NHA در مقایسه با تیمارهای HA به‌طور میانگین ۲/۱ سانتی‌متر بیش‌تر بود. با این حال، اثر مثبت HA بر ارتفاع گیاه مرزه توسط سایر پژوهشگران گزارش شده است (Farahani and Madani, 2014). در مورد ارتفاع گیاه نیز همانند دو صفت قبلی، دو تیمار تلفیقی  $U_3NHA_3$  و  $U_3HA_3$  اثر مثبت بیش‌تری را در مقایسه با سایر تیمارها نشان دادند. به‌علاوه، ارتفاع گیاه با افزایش سطح نیتروژن فقط در تیمارهای تلفیقی به‌طور معنی‌داری افزایش یافت. علیرضا سهرابی و همکاران (Alizadeh Sahzabi et al., 2007) نیز افزایش ارتفاع گیاه مرزه با افزایش سطح نیتروژن را گزارش کرده و علت آن را افزایش رشد رویشی به دلیل افزایش تقسیم سلول‌های مرستمی و تورژانس سلول‌های مرستمی بیان کردند.

#### وزن تر و خشک ریشه

وزن تر ریشه در تیمارهای  $U_2$  و  $U_3$  (۴ گرم در گلدان) بیش‌ترین بود که با تیمارهای  $U_2NHA_2$ ،  $U_3NHA_3$ ،  $U_3HA_3$  و  $NHA_3$  تفاوت معناداری نداشت.

فراهانی و مدنی (Farahani and Madani, 2014) اثرات مثبت تیمار تلفیقی U+HA را بر شاخص سطح برگ گیاه مرزه گزارش کردند. در تیمار شاهد نیز کمترین میزان سطح برگ (۲۰۹ سانتی‌متر مربع) مشاهده شد که با تیمار  $HA_1$  تفاوت معنی‌داری نداشت. نتایج نشان داد که با افزایش سطح نیتروژن، میزان سطح برگ یک‌روند افزایشی داشت. بیش‌ترین شدت افزایش مربوط به تیمارهای NHA و کمترین آن مربوط به تیمارهای UNHA بود. عظیم و همکاران (Azeem et al., 2015) نیز افزایش سطح برگ با افزایش سطح نیتروژن را گزارش کردند. نیتروژن با افزایش تقسیم و تورژانس سلول‌های مرستمی سبب افزایش رشد رویشی گیاهان می‌شود (Zare et al., 2013). میانگین سطح برگ در ۳ سطح HA (۲۹۷/۳ سانتی‌متر مربع) بیش‌تر از شاهد ولی کم‌تر از NHA (۳۳۱ سانتی‌متر مربع) بود.

#### طول ریشه

بیش‌ترین طول ریشه در تیمار  $U_3HA_3$  (۱۵ سانتی‌متر) مشاهده شد که با تیمارهای  $U_3NHA_3$ ،  $U_2NHA_2$ ،  $U_1NHA_1$ ،  $NHA_3$ ،  $U_3$  و  $U_2$  تفاوت معناداری نداشت. همچنین، کمترین طول ریشه در تیمار شاهد (۱۱/۶ سانتی‌متر) مشاهده شد که با برخی دیگر از تیمارها به‌ویژه ۳ سطح HA تفاوت معنی‌داری نداشت. فراهانی و مدنی (Farahani and Madani, 2014) نیز کمترین طول ریشه مرزه را در تیمار شاهد (۱۰/۱ سانتی‌متر) و بیش‌ترین آن را در تیمار کود دامی (۱۳/۱۲ سانتی‌متر) مشاهده کردند که با تیمار تلفیقی HA+کود دامی و U+HA تفاوت معناداری نداشت. به‌طوری‌که ملاحظه می‌شود، تیمارها، برخلاف سطح برگ، اثر ضعیف‌تری بر طول ریشه داشتند. تیمارهای تلفیقی

جدول ۴- تجزیه واریانس اثر تیمارها بر ویژگی‌های مورفولوژیک گیاه مرزه

Table 4-ANOVA analysis for the effect of treatments on the morphological characteristics of the savory plant

منابع تغییر S.O.V	درجه آزادی Df	میانگین مربعات Mean squares								
		سطح برگ Leaf surface	طول ریشه Root length	ارتفاع گیاه plant height	وزن تر ریشه Root fresh weight	وزن خشک ریشه Root dry weight	وزن خشک بخش هوایی Shoot dry weight	وزن خشک بخش هوایی Shoot dry weight	حجم ریشه Root volume	قطر ساقه Stem diameter
تیمار Treatment	15	18753.1***	3.49*	18.12***	1.40***	0.02***	22.68***	0.38***	0.34***	0.08***
خطا Error	22	141.75	1.71	2.41	0.17	0.003	0.13	0.002	0.04	0.008
ضریب تغییرات C.V (%)	-	3.39	10.33	6.77	13.34	13.37	3.40	3.43	13.24	6.44

\*\*\* و \* : به ترتیب معنادار در سطح احتمال ۰/۱ و ۵ درصد می‌باشد.

\*\*\* and \* : significant at  $p \leq 0.001$  and  $p \leq 0.05$ , respectively

وزن خشک ریشه تقریباً مشابه وزن تر ریشه بود، به‌طوری‌که در تیمارهای  $U_2$  و  $U_3$  (۰/۵۲ گرم در گلدان) بیش‌ترین و در تیمار شاهد

به‌علاوه، کمترین وزن تر ریشه متعلق به تیمار شاهد (۱/۹ گرم در گلدان) بود که با برخی دیگر از تیمارها تفاوت معناداری نشان نداد. نتایج

گیاه مرزه می‌شود (Azizi et al., 2020).

### حجم ریشه

بیشترین حجم ریشه مربوط به تیمار  $U_3$  (۲/۱ سانتی‌متر مکعب) بود که با تعدادی از دیگر تیمارها تفاوت معناداری نداشت. کمترین حجم ریشه نیز در تیمارهای  $HA_1$  و شاهد (۱ سانتی‌متر مکعب) مشاهده شد که با تعدادی از دیگر تیمارها تفاوت معناداری نداشت. نتایج حجم ریشه با نتایج وزن ریشه هماهنگی داشت.

### قطر ساقه

بیشترین قطر ساقه در تیمار  $U_3NHA_3$  (۱/۷ میلی‌متر) مشاهده شد که با تیمارهای  $U_3$  و  $U_3HA_3$  تفاوت معناداری نداشت. کمترین قطر ساقه نیز متعلق به تیمار شاهد (۱/۱ میلی‌متر) بود که با تیمارهای  $HA_1$  و  $HA_2$  تفاوت معناداری نشان نداد.

به‌طورکلی، نتایج این پژوهش نشان داد که تیمارهای تلفیقی UNHA فقط در سطح سوم ( $U_3HA_3$ ) ولی تیمارهای تلفیقی UNHA در هر سه سطح سبب افزایش رشد رویشی گیاه مرزه و در نتیجه کاهش مصرف کود اوره شدند.  $HA$  با بهبود وضعیت pH خاک، ظرفیت نگهداری آب در خاک و افزایش فراهمی عناصر غذایی برای گیاه سبب افزایش رشد گیاه می‌شود (El-Ghamry et al., 2009). همچنین، نتایج این پژوهش حاکی از اثرات بهتر تیمارهای NHA نسبت به تیمارهای  $HA$  بر ویژگی‌های مورفولوژیک گیاه مرزه بود. مطالعات نشان داده است که فعالیت شیمیایی NHA نسبت به  $HA$  از نظر اسیدیته کل و CEC بیشتر بوده و NHA می‌تواند برای بهبود ساختمان خاک، حفظ عناصر غذایی، تحریک فعالیت ریزجانداران خاک و بهبود ظرفیت بافیری خاک مفید باشد (Patti et al., 1992). گروه‌های عاملی کربوکسیل و هیدروکسیل فنلی نقش مهمی در تعیین فعالیت مواد هیومیک دارند (Malcolm and Vaughan, 1979). نتایج جدول ۱ نشان می‌دهد که به واسطه افزایش هر دو گروه کربوکسیل و هیدروکسیل فنولی، اسیدیته کل NHA تولید شده در مقایسه با  $HA$  بیش‌تر بود.

(۰/۲۵ گرم در گلدان) کمترین بود. وزن‌های تر و خشک ریشه با افزایش سطح نیتروژن از اول به سوم در تیمارهای NHA به‌ترتیب ۱ و ۰/۱۴ گرم در گلدان افزایش نشان دادند، درحالی‌که این افزایش در مورد تیمارهای  $HA$  معنی‌دار نبود. باین‌حال، نتایج فراهانی و مدنی (Farahani and Madani, 2014) حاکی از اثر مثبت و معنادار  $HA$  بر وزن خشک ریشه مرزه در مقایسه با شاهد بود. زارع‌منش و همکاران (Zaremanesh et al., 2022) بیشترین وزن خشک ریشه گیاه مرزه با میانگین ۱/۰۸ گرم در گلدان را در بالاترین سطح  $HA$  (۱۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم در خاک) به دست آوردند. عزیززی و همکاران (Azizi et al., 2020) نیز بیشترین وزن خشک ریشه مرزه را در تیمار تلفیقی  $HA$ +ورمی‌کمپوست مشاهده کردند.

### وزن تر و خشک بخش هوایی

بیشترین وزن تر بخش هوایی مربوط به تیمارهای  $U_3$  و  $U_3NHA_3$  (۱۳/۷ گرم در گلدان) بود که با تیمار  $U_3HA_3$  تفاوت معناداری نداشت. کمترین مقدار این صفت نیز مربوط به تیمار شاهد (۵/۲ گرم در گلدان) بود که با تیمار  $HA_1$  تفاوت معناداری نداشت. مشابه با وزن تر، بیشترین وزن خشک بخش‌هوائی در تیمارهای  $U_3$  و  $U_3NHA_3$  (۱/۷۷ گرم در گلدان) و کمترین آن در تیمار شاهد (۰/۶۸ گرم در گلدان) مشاهده شد. مشابه سطح برگ، با افزایش سطح نیتروژن در همه گروه‌های تیماری، وزن‌های تر و خشک بخش هوایی روند افزایشی نشان دادند. بیشترین شدت افزایش مربوط به تیمارهای NHA و کمترین آن مربوط به تیمارهای UNHA بود. به‌طوری‌که، وزن خشک بخش هوایی از سطح اول به سطح سوم در تیمارهای NHA و UNHA، به‌ترتیب ۴۹/۵ و ۲۰ درصد افزایش یافت. این افزایش در تیمارهای U نیز پایین بوده و فقط ۲۲ درصد بود. در پژوهش‌های پیشین نیز اثر نیتروژن در افزایش وزن تر و خشک بخش هوایی گیاه مرزه گزارش شده و علت آن نقش نیتروژن در افزایش تولید ماده خشک و افزایش طول دوره رشد گیاه بیان شده است (Makkizadeh et al., 2012). همچنین، میانگین وزن خشک بخش هوایی در تیمارهای NHA به میزان ۲۱/۳ درصد بیش‌تر از تیمارهای  $HA$  بود که نشان‌دهنده برتری NHA نسبت به  $HA$  می‌باشد. در مرحله ساقه رفتن که مرحله رشد سریع گیاه است، NHA از طریق افزایش فراهمی عناصر غذایی سبب افزایش شاخص‌های رشدی گیاه می‌شود (Patti et al., 1992). نتایج یادگاری (Yadegari, 2022) در بررسی اثر تیمارهای کودی مختلف شامل کود کامل NPK، بوتامیسول و  $HA$  بر ویژگی‌های مورفوفیزیولوژیک گیاه مرزه تحت شرایط تنش خشکی نشان داد که متوسط وزن خشک گیاه مرزه در تیمارهای حاوی  $HA$  (۲۶/۶۱ گرم در مترمربع) بیشتر از تیمارهای بدون  $HA$  (۲۲/۲۳ گرم در مترمربع) بود.  $HA$  با تحریک فتوسنتز باعث افزایش وزن خشک

جدول ۵- مقایسه میانگین اثر تیمارها بر ویژگی‌های مورفولوژیک گیاه مرزه

Table 5-Mean comparisons of the effect of treatments on the morphological characteristics of the savory plant

تیمار Treatment	سطح برگ Leaf area (cm <sup>2</sup> )	طول ریشه Root length (cm)	ارتفاع گیاه Plant height (cm)	وزن تر ریشه Root fresh weight (g pot <sup>-1</sup> )	وزن خشک ریشه Root dry weight (g pot <sup>-1</sup> )	وزن تر بخش هوایی Shoot dry weight (g pot <sup>-1</sup> )	وزن خشک بخش هوایی Shoot dry weight (g pot <sup>-1</sup> )	حجم ریشه Root volume (cm <sup>3</sup> )	قطر ساقه Stem diameter (mm)
شاهد	209 <sup>g</sup>	11.6 <sup>c</sup>	16.3 <sup>e</sup>	1.9 <sup>g</sup>	0.25 <sup>g</sup>	5.2 <sup>i</sup>	0.68 <sup>j</sup>	1 <sup>g</sup>	1.1 <sup>i</sup>
U <sub>1</sub>	351 <sup>c</sup>	11.7 <sup>c</sup>	22.6 <sup>c</sup>	3.5 <sup>abc</sup>	0.45 <sup>abc</sup>	11.2 <sup>cd</sup>	1.45 <sup>cd</sup>	1.7 <sup>abcd</sup>	1.4 <sup>defg</sup>
U <sub>2</sub>	395 <sup>b</sup>	12.7 <sup>abc</sup>	24 <sup>abc</sup>	4 <sup>a</sup>	0.52 <sup>a</sup>	12.3 <sup>b</sup>	1.60 <sup>b</sup>	2 <sup>ab</sup>	1.5 <sup>bcd</sup>
U <sub>3</sub>	450 <sup>a</sup>	13.3 <sup>abc</sup>	22.7 <sup>c</sup>	4 <sup>a</sup>	0.52 <sup>a</sup>	13.7 <sup>a</sup>	1.77 <sup>a</sup>	2.1 <sup>a</sup>	1.59 <sup>ab</sup>
HA <sub>1</sub>	219 <sup>g</sup>	12 <sup>bc</sup>	19.3 <sup>d</sup>	2 <sup>g</sup>	0.26 <sup>g</sup>	5.6 <sup>i</sup>	0.71 <sup>i</sup>	1 <sup>g</sup>	1.16 <sup>hi</sup>
HA <sub>2</sub>	295 <sup>e</sup>	11.7 <sup>c</sup>	22.7 <sup>c</sup>	2.1 <sup>ef</sup>	0.27 <sup>efg</sup>	7.3 <sup>h</sup>	0.95 <sup>h</sup>	1.1 <sup>fg</sup>	1.21 <sup>ghi</sup>
HA <sub>3</sub>	378 <sup>b</sup>	11.7 <sup>c</sup>	22.7 <sup>c</sup>	2.4 <sup>efg</sup>	0.31 <sup>defg</sup>	9.4 <sup>f</sup>	1.22 <sup>f</sup>	1.2 <sup>efg</sup>	1.3 <sup>fgh</sup>
U <sub>1</sub> HA <sub>1</sub>	309 <sup>de</sup>	12 <sup>bc</sup>	22.3 <sup>c</sup>	2.8 <sup>cdef</sup>	0.37 <sup>cde</sup>	10.1 <sup>e</sup>	1.32 <sup>e</sup>	1.6 <sup>bcd</sup>	1.38 <sup>cdefg</sup>
U <sub>2</sub> HA <sub>2</sub>	393 <sup>b</sup>	11.7 <sup>c</sup>	23 <sup>c</sup>	3.2 <sup>bcd</sup>	0.42 <sup>bc</sup>	12.3 <sup>b</sup>	1.59 <sup>b</sup>	1.43 <sup>def</sup>	1.41 <sup>cdef</sup>
U <sub>3</sub> HA <sub>3</sub>	433 <sup>a</sup>	15 <sup>a</sup>	26 <sup>ab</sup>	3.7 <sup>ab</sup>	0.48 <sup>ab</sup>	13.4 <sup>a</sup>	1.74 <sup>a</sup>	1.9 <sup>abc</sup>	1.54 <sup>abc</sup>
NHA <sub>1</sub>	241 <sup>f</sup>	12 <sup>bc</sup>	22.7 <sup>c</sup>	2.7 <sup>defg</sup>	0.35 <sup>cdef</sup>	8.6 <sup>g</sup>	1.11 <sup>g</sup>	1.36 <sup>defg</sup>	1.3 <sup>efgh</sup>
NHA <sub>2</sub>	324 <sup>d</sup>	12.3 <sup>bc</sup>	23.3 <sup>bc</sup>	2.8 <sup>cdef</sup>	0.37 <sup>cde</sup>	10.6 <sup>de</sup>	1.38 <sup>de</sup>	1.4 <sup>efg</sup>	1.4 <sup>cdef</sup>
NHA <sub>3</sub>	429 <sup>a</sup>	13.3 <sup>abc</sup>	25 <sup>abc</sup>	3.7 <sup>ab</sup>	0.49 <sup>ab</sup>	12.8 <sup>b</sup>	1.66 <sup>b</sup>	1.9 <sup>abc</sup>	1.51 <sup>bcd</sup>
U <sub>1</sub> NHA <sub>1</sub>	355 <sup>c</sup>	13 <sup>abc</sup>	22.5 <sup>c</sup>	3 <sup>bcd</sup>	0.39 <sup>bcd</sup>	11.3 <sup>c</sup>	1.47 <sup>c</sup>	1.5 <sup>cde</sup>	1.4 <sup>defg</sup>
U <sub>2</sub> NHA <sub>2</sub>	391 <sup>b</sup>	14.2 <sup>ab</sup>	25 <sup>abc</sup>	3.4 <sup>abcd</sup>	0.44 <sup>abc</sup>	12.4 <sup>b</sup>	1.61 <sup>b</sup>	1.7 <sup>abcd</sup>	1.47 <sup>bcd</sup>
U <sub>3</sub> NHA <sub>3</sub>	449 <sup>a</sup>	14 <sup>abc</sup>	26.7 <sup>a</sup>	3.3 <sup>abcd</sup>	0.43 <sup>abc</sup>	13.7 <sup>a</sup>	1.77 <sup>b</sup>	1.7 <sup>abcd</sup>	1.7 <sup>a</sup>

اعداد دارای حرف مشترک در هر ستون بر اساس آزمون مقایسه میانگین دانکن ( $p \leq 0.05$ ) فاقد اختلاف معنادار می‌باشند.

Values with the same letter in each column have no significant difference based on the Duncan's mean comparison test ( $p \leq 0.05$ ).

جدول ۶- تجزیه واریانس اثر تیمارها بر ویژگی‌های فیزیولوژیک گیاه مرزه

Table 6- ANOVA analysis for the effect of treatments on the physiological characteristics of the savory plant

منابع تغییر S.O.V	درجه آزادی Df	کلروفیل Chlorophyll	میانگین مربعات Mean squares									
			نیترات ردوکتاز NR		نیترات Nitrate		فسفر Phosphorus		نیتروژن Nitrogen		پتاسیم Potassium	
			بخش هوایی Shoot	ریشه Root	بخش هوایی Shoot	ریشه Root	بخش هوایی Shoot	ریشه Root	بخش هوایی Shoot	ریشه Root	بخش هوایی Shoot	ریشه Root
تیمار Treatment	15	6.90 <sup>**</sup>	2.09 <sup>**</sup>	0.046 <sup>**</sup>	81705.9 <sup>**</sup>	59776.6 <sup>**</sup>	0.0003 <sup>**</sup>	0.001 <sup>**</sup>	4.11 <sup>**</sup>	0.41 <sup>**</sup>	0.13 <sup>**</sup>	0.17 <sup>**</sup>
خطا Error	32	0.03	0.0004	0.0002	64.29	63.85	0.000001	0.0000009	0.002	0.003	0.0008	0.0001
ضریب تغییرات C.V (%)	-	1.11	0.92	0.87	2.29	2.62	0.57	0.48	1.7	3.46	0.87	0.76

\*\* بیانگر معناداری در سطح احتمال ۱ درصد می‌باشد.

\*\* : significant at  $p \leq 0.01$

ترکیب اوره با HA، اوره را از هیدرولیز سریع حفظ کرده و در نتیجه منجر به رهاسازی کنترل شده اوره و تأمین تدریجی و مداوم نیتروژن برای گیاه می‌شود (Dong and Yuan, 2009).

از سوی دیگر، ژانگ و همکاران (Zhang et al., 2019) مشاهده کردند که کاربرد HA در کنار اوره، کارایی مصرف کود نیتروژن را افزایش داده و هدررفت نیتروژن را کاهش داد. لیانگ و همکاران (Liang et al., 1999) نیز نشان دادند که گروه آسیل آمینو (N-) (C=O) اوره نقش مهمی در تشکیل کمپلکس بسیار پایدار U-HA دارد.

1- Acylamino

## ویژگی‌های فیزیولوژیک

نتایج تجزیه واریانس نشان داد که اثر تیمارها بر همه ویژگی‌های فیزیولوژیک گیاه مرزه در سطح احتمال ۱ درصد معنادار بود (جدول ۶).

## غلظت نیتروژن، فسفر، پتاسیم و نیترات در بخش هوایی و ریشه

اثر تیمارهای مورد مطالعه بر غلظت نیتروژن، فسفر، پتاسیم و نیترات در بخش هوایی مرزه در شکل ۲ مشاهده می‌شود. در همه گروه‌های تیماری، درصد نیتروژن بخش هوایی گیاه مرزه با افزایش سطح نیتروژن یک روند افزایشی را نشان داد. بیش‌ترین و کم‌ترین درصد نیتروژن به ترتیب مربوط به تیمارهای  $U_3$  ( $U_3$  ۴/۵ درصد) و شاهد ( $U_0$  ۱/۰ درصد) بود. بعد از تیمار  $U_3$ ، بیش‌ترین درصد نیتروژن متعلق به تیمارهای  $U_3NHA_3$  ( $U_3NHA_3$  ۴/۲ درصد) و  $NHA_3$  ( $NHA_3$  ۳/۵ درصد) بود. برتری تیمار تلفیقی UNHA نسبت به NHA در سطوح دوم و اول نیتروژن نیز دیده می‌شود. بر این اساس، NHA در تلفیق با اوره توانسته کارایی مصرف نیتروژن را بهبود بخشد (Mazumdar et al., 1988). با این حال، در سطوح سوم و دوم نیتروژن، اوره بر تیمار تلفیقی UNHA برتری داشته و در سطح اول نیتروژن نیز تفاوت معنی‌دار نبود. به علاوه، درصد نیتروژن بخش هوایی در تیمارهای NHA ( $NHA$  ۲/۳۵ درصد) بیش‌تر از تیمارهای HA ( $HA$  ۱/۳۳ درصد) بود (شکل ۲-a). با این حال، نجفی وفا و همکاران (Najafi Vafa et al., 2020) بیش‌ترین غلظت نیتروژن بخش هوایی گیاه مرزه را در بالاترین سطح HA به میزان ۰/۱۲۱ درصد وزن تر و کم‌ترین آن را در تیمار شاهد به میزان ۰/۰۲۳ درصد وزن تر مشاهده کردند. ریزک و همکاران (Rizk et al., 2013) نیز غلظت نیتروژن برگ سیب‌زمینی را در تیمار تلفیقی U+HA ( $U+HA$  ۱/۶۱ درصد) بیش‌تر از تیمار اوره به‌تنهایی (۱/۳۴ درصد) گزارش کردند. همچنین، نتایج سانگ و همکاران (Song et al., 2022) حاکی از افزایش ۲۰/۱ تا ۲۸/۴ درصدی نیتروژن کل گیاه ذرت با اعمال تیمار تلفیقی UHA در مقایسه با اوره به‌تنهایی بود.

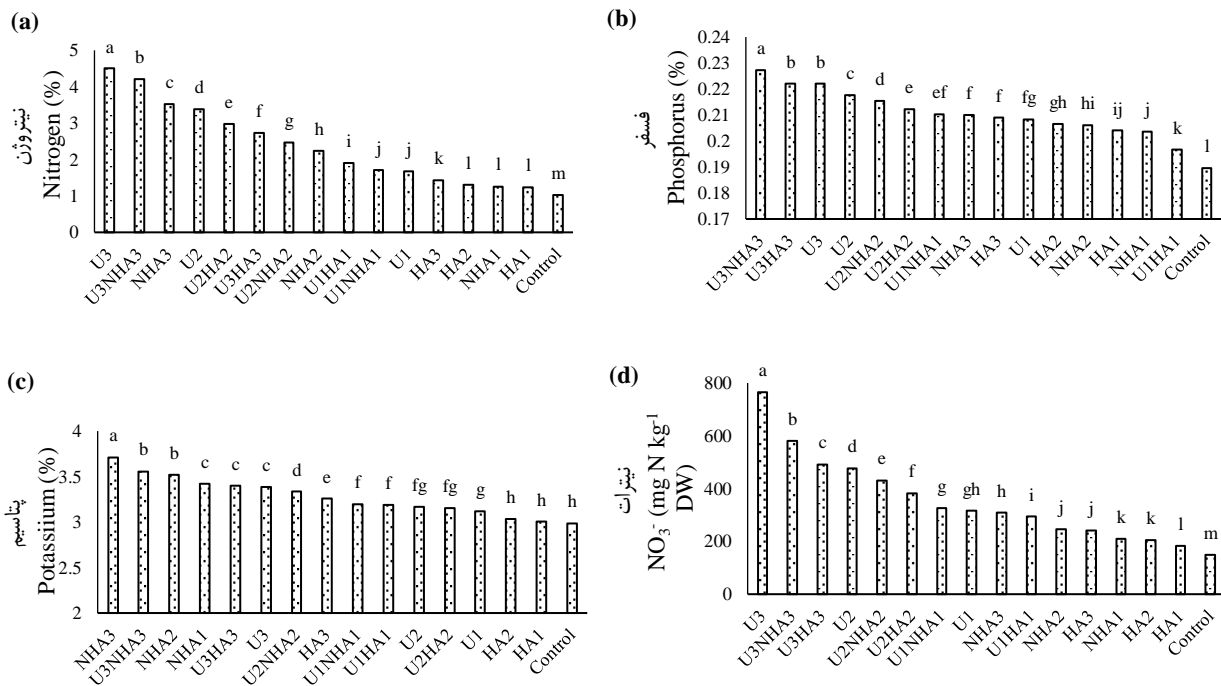
درصد فسفر بخش هوایی مرزه در تیمارهای مختلف در شکل ۲-b نشان داده شده است. بیش‌ترین درصد فسفر مربوط به تیمار  $U_3NHA_3$  ( $U_3NHA_3$  ۰/۲۳ درصد) بود. تیمارهای  $U_3$  و  $U_3HA_3$  بعد از این تیمار قرار داشتند. تیمار شاهد نیز کم‌ترین (۰/۱۹ درصد) درصد فسفر را نشان داد. ریزک و همکاران (Rizk et al., 2013) غلظت فسفر برگ سیب‌زمینی را در تیمار تلفیقی U+HA ( $U+HA$  ۰/۳۶ درصد) بیش‌تر از تیمار اوره به‌تنهایی (۰/۲۵ درصد) گزارش کردند. افزایش جذب فسفر در سطح سوم تیمارهای UNHA و UHA در مقایسه با تیمار اوره می‌تواند ناشی از نقش HA در جلوگیری از تثبیت فسفر در خاک و یا تشکیل کمپلکس‌های هیوموفسفو باشد که به راحتی به وسیله گیاه جذب

می‌شوند (Raina and Goswami, 1988). همان‌طور که در شکل ۲-b ملاحظه می‌شود، با افزایش سطح نیتروژن، درصد فسفر گیاه مرزه نیز افزایش پیدا کرد که می‌تواند به دلیل روابط سینرژیستی بین نیتروژن و فسفر باشد (Rietra et al., 2017).

بیش‌ترین غلظت پتاسیم در تیمارهای  $NHA_3$  ( $NHA_3$  ۳/۷۱ درصد) و  $U_3NHA_3$  ( $U_3NHA_3$  ۳/۵۶ درصد) و کم‌ترین آن در تیمار شاهد ( $U_0$  ۲/۹۹ درصد) مشاهده شد (شکل ۲-c). غلظت پتاسیم در تیمارهای NHA ( $NHA$  ۳/۵۵ درصد) بیش‌تر از تیمارهای HA ( $HA$  ۳/۱۰ درصد) بود. همچنین همانند فسفر، با افزایش سطح نیتروژن در تیمارها، درصد پتاسیم گیاه نیز افزایش پیدا کرد. نجفی وفا و همکاران (Najafi Vafa et al., 2020) بیش‌ترین غلظت پتاسیم در گیاه مرزه را در بالاترین سطح HA به میزان ۵۳/۷ میلی‌گرم پتاسیم در کیلوگرم وزن تر گیاه و کم‌ترین آن را در تیمار شاهد به میزان ۴۱/۹۵ میلی‌گرم پتاسیم در کیلوگرم وزن تر گیاه مشاهده کردند. ریزک و همکاران (Rizk et al., 2013) نیز غلظت پتاسیم برگ سیب‌زمینی را در تیمار تلفیقی UHA ( $UHA$  ۰/۵۶۵ درصد) بیش‌تر از تیمار اوره به‌تنهایی (۰/۴۵۵ درصد) گزارش کردند.

غلظت نیترات بخش هوایی مرزه در شکل ۲-d نشان داده شده است. ترتیب تیمارها در غلظت نیترات تقریباً مشابه با غلظت نیتروژن بود (شکل ۲-a). مشابه با نیتروژن، تیمارهای  $U_3$  ( $U_3$  ۷۶۵/۹ میلی‌گرم نیتروژن در کیلوگرم وزن خشک) و شاهد ( $U_0$  ۱۴۸/۷ میلی‌گرم نیتروژن در کیلوگرم وزن خشک) به ترتیب بیش‌ترین و کم‌ترین غلظت نیترات را نشان دادند. با افزایش سطح نیتروژن در تیمارهای مختلف غلظت نیترات نیز افزایش پیدا کرد. از سوی دیگر، سطوح دوم و سوم تیمارهای تلفیقی UNHA نسبت به این سطوح در تیمارهای اوره سبب تجمع کمتری از نیترات در بخش هوایی مرزه شدند. به طوری که میانگین شدت افزایش غلظت نیترات بخش هوایی با افزایش سطح نیتروژن در تیمارهای اوره ۱/۷۷ برابر تیمارهای تلفیقی UNHA بود. این نتایج با یافته‌های حقیقی و کافی (Haghighi and Kafi, 2010) مطابقت دارد که نشان دادند با استفاده از HA تجمع نیترات در بخش هوایی گیاه کاهش یافت. میزان جذب نیترات به وزن مولکولی و اسیدیته HA بستگی دارد (Haghighi and Kafi, 2010).

در واقع، HAهای با وزن مولکولی کم و گروه‌های کربوکسیل زیاد سبب افزایش جذب نیترات به وسیله گیاه می‌شوند (Piccolo et al., 1992; Cacco et al., 2000). کواگیوتی و همکاران (Quaggiotti et al., 2004) غلظت نیترات در برگ‌های گیاه ذرت تیمار شده با HA با وزن مولکولی کم را ۱۴۸/۸ میلی‌گرم نیتروژن در کیلوگرم وزن خشک گزارش کردند که حدود ۵۰ درصد بیش‌تر از تیمار شاهد بود.



شکل ۲- اثر تیمارهای آزمایشی بر غلظت نیتروژن (a)، فسفر (b)، پتاسیم (c) و نیترات (d) در بخش هوایی مرزه

ستون‌های دارای حرف مشترک بر اساس آزمون مقایسه میانگین دانکن ( $p \leq 0.05$ ) فاقد اختلاف معنادار می‌باشند.

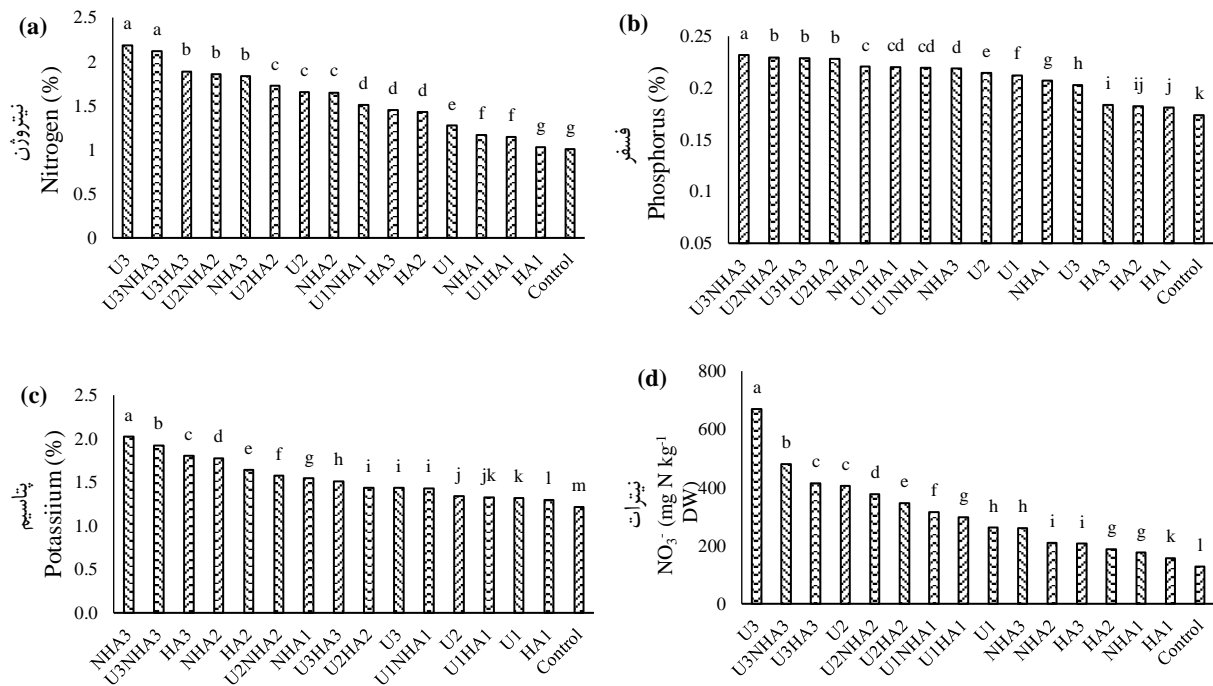
Figure 2- The effect of the experimental treatments on the concentration of nitrogen (a), phosphorus (b), potassium (c) and nitrate (d) in the Shoot of Savory plant

Columns with a same letter have no significant difference based on Duncan's mean comparison test ( $p \leq 0.05$ ).

U<sub>3</sub> (۶۶۹ میلی‌گرم نیتروژن در کیلوگرم وزن خشک) و شاهد (۱۲۷ میلی‌گرم نیتروژن در کیلوگرم وزن خشک) بود. نتایج همچنین نشان‌دهنده افزایش غلظت نیترات در ریشه با افزایش سطح نیتروژن بود. غلظت نیترات ریشه در تیمارهای تلفیقی UHA و UNHA بیش‌تر از تیمارهای HA و NHA بود. مطالعات پیشین حاکی از افزایش جذب نیترات در ریشه در حضور HA بود (Quaggiotti et al., 2004)؛ سیستم ریشه و افزایش نقل و انتقالات فعال در گیاه در حضور HA افزایش می‌یابد (Hernandez et al., 2015).

به‌طور کلی، بر اساس نتایج این مطالعه، تیمار تلفیقی UNHA جذب و انتقال عناصر غذایی را افزایش داد که می‌تواند ناشی از اثرات مفید NHA بر بهبود فعالیت میکروبی، ساختمان خاک و ظرفیت تبادل کاتیونی باشد. در واقع، NHA نگهداری عناصر غذایی را افزایش داده و از این‌رو سبب می‌شود تا رهاسازی آن‌ها در محلول خاک آهسته‌تر شود (Patti et al., 1992).

اثر تیمارهای مختلف بر غلظت نیتروژن، فسفر، پتاسیم و نیترات در ریشه گیاه مرزه در شکل ۳ نشان داده شده است. بیش‌ترین غلظت نیتروژن متعلق به تیمار U<sub>3</sub> (۲/۱۸ درصد) بود که با تیمار U<sub>3</sub>NHA<sub>3</sub> (۲/۱۲ درصد) تفاوت معناداری نداشت. به‌علاوه، کم‌ترین درصد نیتروژن ریشه در تیمار شاهد (۱ درصد) مشاهده شد که از این نظر تفاوت معناداری با تیمار HA<sub>1</sub> (۱/۰۳ درصد) نداشت (شکل ۳-a). کم‌ترین درصد فسفر ریشه در تیمار شاهد (۰/۱۹ درصد) و بیش‌ترین آن در تیمار U<sub>3</sub>NHA<sub>3</sub> (۰/۲۳ درصد) مشاهده شد. به‌علاوه، درصد فسفر در تیمارهای ترکیبی بیشتر از سایر تیمارها بود (شکل ۳-b). بیش‌ترین درصد پتاسیم نیز در تیمار NHA<sub>3</sub> (۲/۰۲ درصد) مشاهده شد (شکل ۳-c). در تیمار شاهد نیز کم‌ترین درصد پتاسیم (۱/۲۲ درصد) مشاهده شد. همانند بخش هوایی، افزایش سطح نیتروژن تأثیر مثبتی بر افزایش درصد پتاسیم ریشه نشان داد. همچنین، تیمارهای NHA در مقایسه با تیمارهای HA، از درصد فسفر و پتاسیم ریشه بالاتری برخوردار بودند. بیش‌ترین و کم‌ترین غلظت نیترات ریشه به‌ترتیب مربوط به تیمار



شکل ۳- اثر تیمارهای آزمایشی بر غلظت نیتروژن (a)، فسفر (b)، پتاسیم (c) و نیترات (d) در ریشه مرزه

ستون‌های دارای حرف مشترک بر اساس آزمون مقایسه میانگین دانکن ( $p \leq 0.05$ ) فاقد اختلاف معنادار می‌باشند.

Figure 3- The effect of the experimental treatments on the concentration of nitrogen (a), phosphorus (b), potassium (c) and nitrate (d) in the root of savory plant

Columns with same letter have no significant difference based on Duncan's mean comparison test ( $p \leq 0.05$ ).

درصد افزایش داد. دابینگ و همکاران (Da-Bing *et al.*, 2012) گزارش کردند که HA دارای خاصیت شبه‌اکسینی بوده و از این رو سبب افزایش غلظت کلروفیل در گیاه خیار می‌شود. به علاوه، HA سبب افزایش فعالیت آنزیم رویسکو می‌شود که وجودش در واکنش‌های تاریکی فتوسنتز ضروری است (Amini *et al.*, 2018). فررا و بروتی (Ferrara and Brunetti, 2010) نیز معتقدند که HA سنتز کلروفیل را افزایش داده و یا تخریب آن را به تأخیر می‌اندازد.

#### فعالیت آنزیم نیترات ردوکتاز

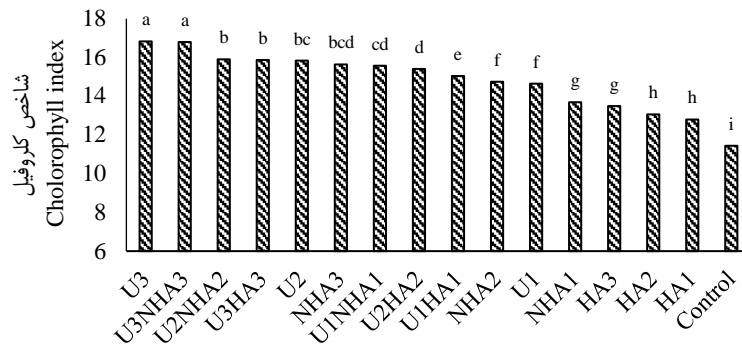
اثر تیمارهای مختلف بر فعالیت آنزیم نیترات ردوکتاز بخش هوایی و ریشه گیاه مرزه در شکل ۵ نشان داده شده است. بیش‌ترین و کم‌ترین فعالیت این آنزیم در بخش هوایی مرزه به ترتیب ۳/۹۵ و ۱/۰۷ میکرومول نیتريت در گرم وزن تازه بافت در ساعت و مربوط به تیمارهای U3NHA3 و U3NHA3 و شاهد بود. تیمار U3 بعد از تیمار U3NHA3 بیش‌ترین فعالیت آنزیم نیترات ردوکتاز را دارا بود. به علاوه، فعالیت آنزیم نیترات ردوکتاز در تیمارهای NHA بیش‌تر از تیمارهای HA بود (شکل ۵-ا).

#### شاخص کلروفیل

مقایسه میانگین تیمارها نشان داد که بیش‌ترین شاخص کلروفیل مربوط به تیمار U3 (۱۶/۸۳) بود که با تیمار U3NHA3 (۱۶/۸) تفاوت معناداری نداشت (شکل ۴). کم‌ترین شاخص کلروفیل (۱۱/۴۳) نیز در تیمار شاهد مشاهده شد. در همه تیمارها با افزایش سطح تیمار، شاخص کلروفیل نیز افزایش پیدا کرد. با این حال، تیمارهای HA1 و HA2 تفاوت معناداری با هم نداشتند. همچنین، شاخص کلروفیل در تیمارهای NHA (۱۴/۷) بیش‌تر از تیمارهای HA (۱۳/۱) بود که نشان‌دهنده اثرات بهتر NHA نسبت به HA بر عملکرد فتوسنتزی گیاه مرزه بود. بر مبنای شاخص کلروفیل، در سطح اول نیتروژن، هر دو تیمار UNHA و UHA برتری داشتند. در حالی که، در سطح دوم نیتروژن، فقط تیمار UNHA بر U برتری داشت. در سطح سوم نیتروژن، هیچ یک از این دو تیمار بر U برتری نداشتند.

در پژوهش‌های پیشین اثرات مثبت کاربرد HA بر میزان کلروفیل برگ مرزه گزارش شده است (Sabouri *et al.*, 2018; Zaremanesh, 2022; Song *et al.*, 2022; Yadegari, 2022). سانگ و همکاران (Song *et al.*, 2022) نشان دادند که تیمار تلفیقی U+HA در مقایسه با تیمار اوره به تنهایی شاخص کلروفیل برگ گیاه ذرت را به میزان ۵/۰ تا ۲۴/۳



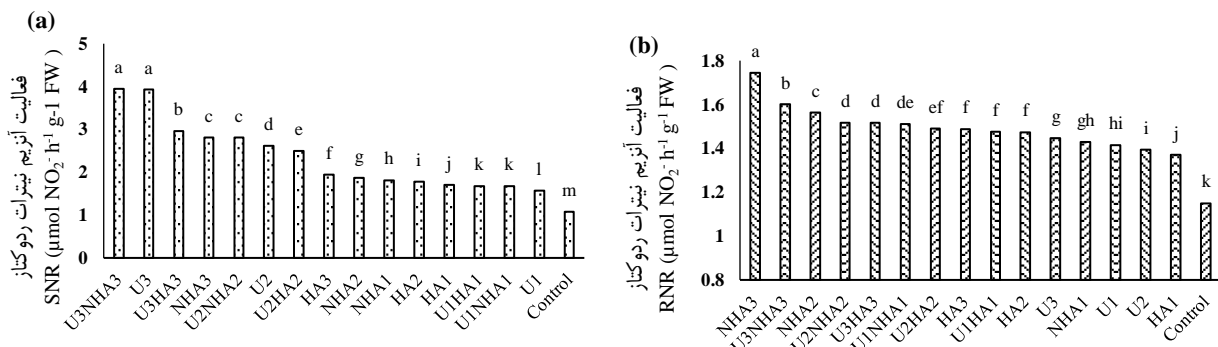


شکل ۴- اثر تیمارهای آزمایشی بر شاخص کلروفیل برگ

ستون‌های دارای حرف مشترک بر اساس آزمون مقایسه میانگین دانکن ( $p \leq 0.05$ ) فاقد اختلاف معنادار می‌باشند.

Figure 4- Effect of the experimental treatments on the leaf chlorophyll index

Columns with a same letter have no significant difference based on Duncan's mean comparison test ( $p \leq 0.05$ ).



شکل ۵- اثر تیمارهای آزمایشی بر فعالیت آنزیم نیترات ردوکتاز در (a) بخش هوایی (SNR) و (b) ریشه (RNR) مرزه

ستون‌های دارای حرف مشترک بر اساس آزمون دانکن ( $p \leq 0.05$ ) فاقد اختلاف معنادار می‌باشند.

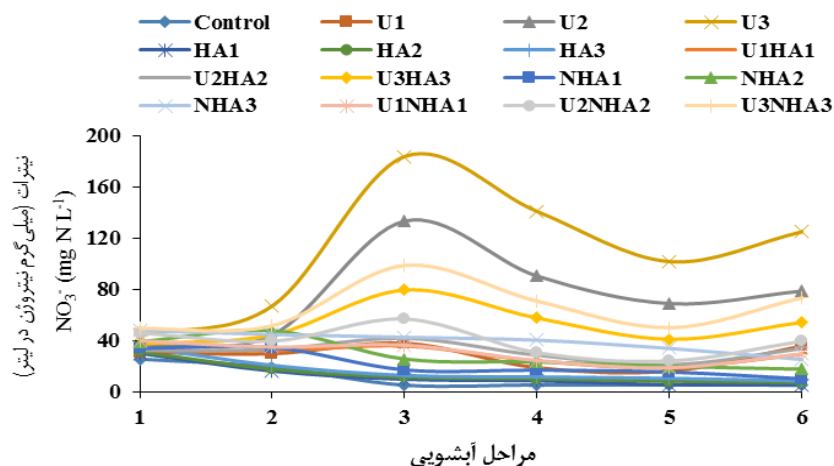
Figure 5- Effect of the experimental treatments on the nitrate reductase (NR) enzyme concentration in the shoot (a) and root (b) of savory plant

Columns with the same letter have no significant difference based on the Duncan's test ( $p \leq 0.05$ ).

آنزیم در ریشه مرزه شدند. این امر نشان‌دهنده نقش این مواد در تسریع تبدیل نیترات به آمونیوم و ممانعت از تجمع آن در گیاه است (Haghighi and Kafi, 2010). در مجموع، میانگین فعالیت آنزیم نیترات ردوکتاز در ریشه مرزه ۳۵/۷ درصد کمتر از بخش هوایی بود که توسط سایر پژوهشگران نیز گزارش شده است (Mehta and Srivastava, 1980). فعالیت این آنزیم در بخش هوایی مرزه و در تیمارهای U به میزان ۱/۲۵ برابر بیشتر از تیمارهای NHA بود. در حالی که، همین فعالیت در ریشه و در تیمارهای NHA به میزان ۱/۱ برابر بیشتر از تیمارهای U بود.

به‌طور کلی، بیش‌ترین فعالیت این آنزیم در تیمارهایی مشاهده شد که بیش‌ترین غلظت نیترات را دارا بودند (شکل ۲-د) که این موضوع توسط سایر پژوهشگران نیز گزارش شده است (Hernandez et al., 2015; Khan et al., 2019).

بیش‌ترین و کم‌ترین فعالیت آنزیم نیترات ردوکتاز در ریشه مرزه به‌ترتیب ۱/۷۴ و ۱/۱۵ میکرومول نیتريت در گرم وزن تر در ساعت بود که در تیمارهای NHA<sub>3</sub> و شاهد مشاهده شد (شکل ۵-ب). بر اساس گزارش‌ها، فعالیت آنزیم نیترات ردوکتاز ریشه یک شاخص مهم برای تعیین توانایی گیاه در همگون‌سازی<sup>۱</sup> نیتروژن است (Taghavi and Babalar, 2007). با توجه به شکل ۵-ب می‌توان نتیجه‌گیری کرد که به‌طور کلی، ترکیبات HA و به‌ویژه NHA سبب افزایش فعالیت این



شکل ۶- غلظت نیترات در آبشویه تیمارهای آزمایشی در مراحل مختلف آبشویی

Figure 6-Nitrate concentration in the leachate of experimental treatments at different leaching steps

### نتیجه گیری

در پژوهش حاضر، محتوای نیتروژن HA استخراج شده از لئوناردیت و نیز اسیدیته کل و گروه‌های کربوکسیل و هیدروکسیل فنلی آن از طریق فرآیند نیترودار کردن ارتقا داده شد و اثر NHA تولید شده بر برخی ویژگی‌های مورفولوژیک و فیزیولوژیک گیاه دارویی مرزه و آبشویی نیترات در مقایسه با تیمارهای اوره به‌تنهایی و نیز تیمارهای تلفیقی در سطوح مختلف بررسی گردید. نتایج نشان داد که در مورد اغلب صفات مورفولوژیک و فیزیولوژیک گیاه، بالاترین سطح تیمار تلفیقی UNHA و گاهی بالاترین سطح تیمارهای U و UHA بهترین نتیجه را نشان دادند. تیمارهای NHA نیز اغلب مؤثرتر از تیمارهای HA بودند. علاوه بر این، میزان آبشویی نیترات در تیمارهای UNHA در مقایسه با تیمارهای اوره به حدود نصف کاهش یافت. یافته‌های این پژوهش حاکی از بالا بودن نیاز مرزه به نیتروژن (حتی بالاتر از ۱۲۰ میلی‌گرم نیتروژن در کیلوگرم وزن خشک) در کشت گلدانی بود. همچنین، پاسخ صفات مختلف به تیمارهای آزمایشی قدری متفاوت بوده ولی در مجموع تیمارهای تلفیقی UNHA و UHA نتیجه بهتری را در مقایسه با تیمارهای منفرد NHA و HA نشان دادند. علت این امر می‌تواند اثر مثبت HA یا NHA بر هیدرولیز تدریجی اوره و یا اثر منفی کاربرد NHA و HA به‌تنهایی باشد که نیاز به پژوهش‌های بیشتری دارد. به‌علاوه، برخی اثرات مثبت تلفیق NHA و اوره بر عملکرد مرزه ممکن است مربوط به ویژگی‌هایی از NHA و یا صفات گیاهی باشد که در این پژوهش مورد مطالعه قرار نگرفته‌اند. همچنین، پیشنهاد می‌شود که تأثیر NHA بر تغییرات اسانس و یا متابولیت‌های ثانویه گیاه مرزه مورد بررسی قرار گیرد.

### آبشویی نیترات

غلظت نیترات آبشویه در مراحل مختلف آبشویی گلدان‌ها برای تیمارهای مختلف در شکل ۶ نشان داده شده است. نتایج نشان داد که بیش‌ترین آبشویی نیترات (۱۸۳/۷ میلی‌گرم نیتروژن در لیتر) در تیمارهای حاوی اوره اتفاق افتاد و با افزایش سطح نیتروژن بر غلظت نیترات آبشویه افزوده شد. به‌عبارت دیگر، با ۴ برابر شدن سطح نیتروژن، غلظت نیترات در آبشویه ۳/۹ برابر افزایش یافت. لیانگ و همکاران (Liang et al., 2011) نیز گزارش کردند که با ۴ برابر شدن سطح نیتروژن کود اوره مصرفی، آبشویی نیترات ۲/۳ برابر شد. در مقابل، تیمارهای فاقد اوره (NHA و HA) کم‌ترین میزان آبشویی نیترات را داشتند. میانگین آبشویی نیترات در تیمارهای اوره، ۳/۳ برابر تیمارهای یاد شده بود. از سوی دیگر، میانگین غلظت نیترات در آبشویه تیمار تلفیقی  $U_3NHA_3$  نسبت به تیمار  $U_3$  حدود ۴۰/۵ درصد کاهش یافت. این نتایج با یافته‌های ژانگ و همکاران (Zhang et al., 2019) مطابقت دارد که نشان دادند تیمار تلفیقی U+HA در مقایسه با کود اوره به‌تنهایی سبب افزایش ۱۱/۵ تا ۲۹/۵ درصدی جذب نیتروژن و کاهش ۱۲ تا ۳۰ درصدی تلفات نیتروژن شد. به‌علاوه، نتایج سانگ و همکاران (Song et al., 2022) نشان داد که کاربرد تیمار تلفیقی U+HA کارایی مصرف نیتروژن را حدود ۴۴/۷ و ۷۷/۷ درصد افزایش داد. شی و همکاران (Shi et al., 2020) کاهش ۴۴ درصدی آبشویی نیترات را با استفاده از کود اوره-بیوپلاز در مقایسه با اوره به‌تنهایی گزارش کردند.

## منابع

1. Akimbekov, N., Qiao, X., Digel, I., Abdieva, G., Ualieva, P., & Zhubanova, A. (2020). The effect of leonardite-derived amendments on soil microbiome structure and potato yield. *Agriculture*, 10(5), 147. <https://doi.org/10.3390/agriculture10050147>
2. Alizadeh Sahzabi, A., Sharifi Ashorabadi, E., Shiranirad, A.H., & Abaszadeh, B. (2007). The effects of different methods and levels of using nitrogen on some quality and quantity characteristics of *Satureja hortensis* L. *Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants Research*, 23(3), 416-431. (In Persian with English abstract)
3. Allison, L.E., & Moodie, C.D. (1965). Carbonates. P. 1379-1396. *Methods of soil analysis. Part, 2. Chemical and Microbiological Properties*. American Society of Agronomy, Madison.
4. Almendros, G., & Dorado, J. (1999). Molecular characteristics related to the biodegradability of humic acid preparations. *European Journal of Soil Science* 50(2): 227-236. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2389.1999.00240.x>
5. Amini, B., Farahbakhsh, M., & Kianirad, M. (2018). Study on the effects of humic acid-urea fertilizers application on some agronomic characteristics of maize (*Zea mays* L.). *Journal of Applied Soil Research*, 5(2), 31-40. (In Persian with English abstract)
6. Arvin, P. (2019). Study of different levels of nitrogen, phosphorus and potassium on physiological and morphological parameters and essential oils in savory plant (*Satureja hortensis* L.). *Journal of Plant Research*, 32(2), 260-279. (In Persian with English abstract)
7. Azeem, K., Shah, S., Ahmad, N., Shah, S.T., Khan, F., Arafat, Y., Naz, F., Azeem, I., & Ilyas, M. (2015). Physiological indices, biomass and economic yield of maize influenced by humic acid and nitrogen levels. *Russian Agricultural Sciences*, 41(2), 115-119. <https://doi.org/10.3103/S1068367415020020>
8. Azizi, E., Jannati, N., & Armin, M. (2020). The effect of different levels of humic acid on some morpho-physiological traits and essential oils of garden savory (*Satureja hortensis* L.) under vermicompost application. *Journal of Plant Environmental Physiology*, 15(59), 99-112. (In Persian with English abstract)
9. Azizi, M., & Safaei, Z. (2017). The effect of foliar application of humic acid and nano fertilizer (Pharmks) on morphological traits, yield, essential oil content and yield of Black Cumin (*Nigella sativa* L.). *Journal of Horticultural Science*, 30(4), 671-680. (In Persian with English abstract)
10. Black, A.S., & Waring, S.A. (1978). Nitrate determination in an oxisol using K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> extraction and the nitrate-specific ion electrode. *Plant and Soil*, 49(1), 207-211. <https://doi.org/10.1007/BF02149924>
11. Boral, P., Varma, A.K., & Maity, S. (2021). Nitration of Jharia basin coals, India: a study of structural modifications by XRD and FTIR techniques. *International Journal of Coal Science & Technology*, 8(5), 1034-1053. <https://doi.org/10.1007/s40789-021-00422-8>
12. Cacco, G., Attinà, E., Gelsomino, A., & Sidari, M. (2000). Effect of nitrate and humic substances of different molecular size on kinetic parameters of nitrate uptake in wheat seedlings. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 163(3), 313-320. [https://doi.org/10.1002/1522-2624\(200006\)163:3%3C313::AID-JPLN313%3E3.0.CO;2-U](https://doi.org/10.1002/1522-2624(200006)163:3%3C313::AID-JPLN313%3E3.0.CO;2-U)
13. Cataldo, D.A., Maroon, M., Schrader, L.E., & Youngs, V.L. (1975). Rapid colorimetric determination of nitrate in plant tissue by nitration of salicylic acid. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 6(1), 71-80.
14. Cazetta, J.O., & Villela, L.C.V. (2004). Nitrate reductase activity in leaves and stems of tanner grass (*Brachiaria radicans* Napper). *Scientia Agricola*, 61, 640-648. <https://doi.org/10.1590/S0103-90162004000600012>
15. Chapman, H.D. (1965). *Cation exchange capacity*. P. 891-901. In: Black C.A. (eds) *Methods of Soil Analysis*. Soil Science Society of America, Madison.
16. Cottenie, A. (1980). *Soil and Plant Testing as a Basis of Fertilizer Recommendations*. F.A.O. Soils Bulletin, Belgium.
17. Da-Bing, X., Qiu-Jun, W., Yun-Cheng, W., Guang-Hui, Y., Qi-Rong, S., & Huang, Q. (2012). Humic-like substances from different compost extracts could significantly promote cucumber growth. *Pedosphere*, 22(6), 815-824. [https://doi.org/10.1016/S1002-0160\(12\)60067-8](https://doi.org/10.1016/S1002-0160(12)60067-8)
18. Dong, L., & Yuan, H. (2009). Nitrogen incorporation into lignite humic acids during microbial degradation. *Geomicrobiology Journal*, 26(7), 484-490. <https://doi.org/10.1080/01490450903061085>
19. El-Ghamry, A.M., Abd El-Hai, K.M., & Ghoneem, K.M. (2009). Amino and humic acids promote growth, yield and disease resistance of faba bean cultivated in clayey soil. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*, 3(2), 731-739.
20. Farahani, E., & Madani, H. (2014). Evaluate the usefulness of humic acid organic matter in comparison to chemical fertilizer and manure and their combination in summer savory (*Satureja hortensis* L.). *New Finding in Agriculture*, 8(4), 323-337. (In Persian with English abstract)
21. Fatima, N., Jamal, A., Huang, Z., Liaquat, R., Ahmad, B., Haider, R., Ali, M.I., Shoukat, T., Alothman Z.A., Ouladsmame, M., Ali, T., Ali S., Akhtar, N., & Sillanpää, M. (2021). Extraction and chemical characterization of

- humic acid from nitric acid treated lignite and bituminous coal samples. *Sustainability*, 13(16), 8969. <https://doi.org/10.3390/su13168969>
22. Ferrara, G., & Brunetti, G. (2010). Effects of the times of application of a soil humic acid on berry quality of table grape (*Vitis vinifera* L.) cv Italia. *Spanish Journal of Agricultural Research*, 8(3), 817-822. <https://doi.org/10.5424/1283>
  23. Gavlak, R., Horneck, D., Miller, R.O., & Kotuby-Amacher, J. (2003). *Soil, plant and water reference methods for the western region*. WCC-103 Publication, Fort Collins, CO.
  24. Gee, G.W., & Or, D. (2002). *Particle size analysis*. P. 255-293. In: Dane J.H., Topp G.C. (eds) *Methods of Soil Analysis: Part 4. Physical Methods*. Soil Science Society of America, Madison. <https://doi.org/10.2136/sssabookser5.4.c12>
  25. Gruandwald, J., & Buttle K. (1996). The European phytotherapeutics market. *Drugs Made in Germany*, 36, 6-11.
  26. Guha, T., Gopal, G., Mukherjee, A., & Kundu, R. (2022). Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-urea nanocomposites as a novel nitrogen fertilizer for improving nutrient utilization efficiency and reducing environmental pollution. *Environmental Pollution*, 292: 118301. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2021.118301>
  27. Haghighi, M., & Kafi, M. (2010). Effect of humic acid on the accumulation of cadmium, nitrate and changes of nitrate reductase activity in lettuce. *Journal of Horticultural Science*, 24(1), 53-58. (In Persian with English abstract)
  28. Hernandez, O.L., Calderín, A., Huelva, R., Martínez-Balmori, D., Guridi, F., Aguiar, N.O., Olivares, F.L., & Canellas, L.P. (2015). Humic substances from vermicompost enhance urban lettuce production. *Agronomy for Sustainable Development*, 35(1), 225-232. <https://doi.org/10.1007/s13593-014-0221-x>
  29. Huang, B., Liu, G., Wang, P., Zhao, X., & Xu, H. (2019). Effect of nitric acid modification on characteristics and adsorption properties of lignite. *Processes*, 7(3), 167. <https://doi.org/10.3390/pr7030167>
  30. Jones, J.B. (2001). *Laboratory guide for conducting soil tests and plant analysis*. CRC press. New York.
  31. Ju, K.S., & Parales, R.E. (2010). Nitroaromatic compounds, from synthesis to biodegradation. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 74(2), 250-272. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00006-10>
  32. Kalaichelvi, K., Chinnusamy, C., & Swaminathan, A.A. (2006). Exploiting the natural resource-lignite humic acid in agriculture-a review. *Agricultural Reviews*, 27(4), 276-283.
  33. Karamian, Z., Nasirzadeh, A., & Mohseli, V. (2012). *Effect of nitrogen on yield, essential oil and extract of savory plant*. 12<sup>th</sup> Soil Science Congress, 3 September 2011. Iranian Soil Science Society, Tabriz, Iran. (In Persian)
  34. Keeney, D.R., & Nelson, D.W. (1982). *Nitrogen: inorganic forms*. P. 643-698. In: Page A.L., Miller R.H., Keeney D.R. (eds) *Methods of Soil Analysis: Part 2. Chemical and Microbiological Properties*. Soil Science Society of America, Madison.
  35. Khan, S.A., Khan, S.U., Qayyum, A., Gurmani, A.R., Khan, A., Khan, S.M., Ahmed, W., Mehmood, A., & Amin, B.A.Z. (2019). Integration of humic acid with nitrogen yields an auxiliary impact on physiological traits, growth and yield of maize (*Zea mays* L.) varieties. *Applied Ecology and Environmental Research*, 17(3), 6783-6799. [http://dx.doi.org/10.15666/aeer/1703\\_67836799](http://dx.doi.org/10.15666/aeer/1703_67836799)
  36. Klute, A., & Dirksen, C. (1986). *Hydraulic conductivity and diffusivity: Laboratory methods*. P. 687-734. In: Klute A. (eds). *Method of Soil Analysis: Part 1. Physical and Mineralogical Methods*. Soil Science Society of America, Madison. <https://doi.org/10.2136/sssabookser5.1.2ed.c28>
  37. Kong, B., Wu, Q., Li, Y., Zhu, T., Ming, Y., Li, C., Wang, F., Jiao, Sh., Shi, L., & Dong, Z. (2022). The Application of Humic Acid Urea Improves Nitrogen Use Efficiency and Crop Yield by Reducing the Nitrogen Loss Compared with Urea. *Agriculture*, 12(12), 1996. <https://doi.org/10.3390/agriculture12121996>
  38. Kuo, S. (1996). *Phosphorus*. P. 869-919. In: Sparks D.L. Page A.L., Helmke P.A., Loeppert R.H., Soltanpour P.N., Tabatabai M.A., Johnston C.T., Sumner M.E. (eds) *Methods of Soil Analysis: Part 3. Chemical Methods*. Soil Science Society of America, Madison.
  39. Li, X., She, D., Zhao, P., Jin, H., Jia, T., Zhou, H., & Zheng, J. (2022). Facile synthesis a potential nitrogen-enriched weathered coal fertilizer: excellent slow-release performance and improving plant quality. *Waste and Biomass Valorization*, 13(12), 4685-4700. <https://doi.org/10.1007/s12649-022-01778-x>
  40. Liang, X.O., Xu, L., Li, H., He, M. M., Qian, Y.C., Liu, J., Nie, Z.Y., Ye, Y.S., & Chen, Y. (2011). Influence of N fertilization rates, rainfall, and temperature on nitrate leaching from a rainfed winter wheat field in Taihu watershed. *Physics and Chemistry of the Earth, Parts A/B/C*, 36(9-11), 395-400. <https://doi.org/10.1016/j.pce.2010.03.017>
  41. Liang, Z.C., Cheng, S.X., & Wu, L. (1999). Study on mechanism of interaction between coal humic acid and urea. *Journal of Fuel Chemistry and Technology*, 27(2), 176-181.
  42. Luo, Y., Liang, J., Zeng, G., Chen, M., Mo, D., Li, G., & Zhang, D. (2018). Seed germination test for toxicity evaluation of compost: Its roles, problems and prospects. *Waste Management*, 71, 109-114. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2017.09.023>
  43. Makkizadeh, M., Chaichi, M., Nasrollahzadeh, S., & Khavazi, K., (2012). Effect of different types of nitrogen fertilizers on quantitative and qualitative characteristics of *Satureja hortensis* L. *Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants*, 28(2), 330-341. (In Persian with English abstract).



44. Malcolm, R.E., & Vaughan, D. (1979). Effects of humic acid fractions on invertase activities in plant tissues. *Soil Biology and Biochemistry*, 11(1), 65-72. [https://doi.org/10.1016/0038-0717\(79\)90120-2](https://doi.org/10.1016/0038-0717(79)90120-2)
45. Mariano, E., de Sant Ana Filho, C.R., Bortoletto-Santos, R., Bendassolli, J.A., & Trivelin, P.C. (2019). Ammonia losses following surface application of enhanced-efficiency nitrogen fertilizers and urea. *Atmospheric Environment* 203: 242-25. <https://doi.org/10.1016/j.atmosenv.2019.02.003>
46. Mazumdar, B.K., Basu, S.K., & Kumar, S. (1988). Urea-coal acids combination fertiliser: some recent developments. *Urja;(India)* 23(5).
47. Mehdizadeh, L., Moghaddam, M., & Lakzian, A. (2020). Amelioration of soil properties, growth and leaf mineral elements of summer savory under salt stress and biochar application in alkaline soil. *Scientia Horticulturae* 267: 109319. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2020.109319>
48. Mehta, P., & Srivastava, H.S. (1980). Comparative stability of ammonium-and nitrate-induced nitrate reductase activity in maize leaves. *Phytochemistry*, 19(12), 2527-2530. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)83912-6](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)83912-6)
49. Najafi Vafa, Z., Sohrabi, Y., & Samir, Z. (2020). Humic acid and nano Zn chelated fertilizer regulates nutrient uptake and growth and production of summer savory. *Journal of Biology and Nature*, 5-15.
50. Nasir, S., Sarfaraz, T.B., Verheyen, T.V., & Chaffee, A.L. (2011). Structural elucidation of humic acids extracted from Pakistani lignite using spectroscopic and thermal degradative techniques. *Fuel Processing Technology*, 92(5), 983-991. <https://doi.org/10.1016/j.fuproc.2010.12.020>
51. Naz, M.Y., & Sulaiman, S.A. (2016). Slow release coating remedy for nitrogen loss from conventional urea: a review. *Journal of Controlled Release*, 225, 109-120. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2016.01.037>
52. Nelson, D.W., & Sommers, L.E. (1996). *Total carbon, organic carbon, and organic matter*. P. 961-1010. In: Sparks D.L., Page A.L., Helmke P.A., Loeppert R.H., Soltanpour P.N., Tabatabai M.A., Johnston C.T., Sumner M.E. (eds) *Methods of Soil Analysis: Part 3. Chemical Methods*. Soil Science Society of America, Madison. <https://doi.org/10.2136/sssabookser5.3.c34>
53. Ozkan, S., & Ozkan, S.G. (2017). Investigation of humate extraction from lignites. *International Journal of Coal Preparation and Utilization*, 37(6), 285-292. <https://doi.org/10.1080/19392699.2016.1171761>
54. Pansu, M., & Gautheryou, J. (2007). *Handbook of Soil Analysis: Mineralogical, Organic and Inorganic Methods*. Springer Science & Business Media.
55. Patti, A.F., Verheyen, T.V., Douglas, L., & Wang, X. (1992). Nitrohumic acids from Victorian brown coal. *Science of the Total Environment*, 113(1-2), 49-65. [https://doi.org/10.1016/0048-9697\(92\)90016-L](https://doi.org/10.1016/0048-9697(92)90016-L)
56. Piccolo, A., Nardi, S., & Concheri, G. (1992). Structural characteristics of humic substances as related to nitrate uptake and growth regulation in plant systems. *Soil Biology and Biochemistry*, 24(4), 373-380. [https://doi.org/10.1016/0038-0717\(92\)90197-6](https://doi.org/10.1016/0038-0717(92)90197-6)
57. Quaggiotti, S., Ruperti, B., Pizzeghello, D., Francioso, O., Tugnoli, V., & Nardi, S. (2004). Effect of low molecular size humic substances on nitrate uptake and expression of genes involved in nitrate transport in maize (*Zea mays* L.). *Journal of Experimental Botany*, 55(398), 803-813. <https://doi.org/10.1093/jxb/erh085>
58. Raina, J.N., & Goswami, K.P. (1988). Effect of fulvic acid and fulvates on the growth and nutrient uptake by maize plant. *Journal of the Indian Society of Soil Science*, 36, 264-268.
59. Rietra, R.P., Heinen, M., Dimkpa, C.O., & Bindraban, P.S. (2017). Effects of nutrient antagonism and synergism on yield and fertilizer use efficiency. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 48(16), 1895-1920. <https://doi.org/10.1080/00103624.2017.1407429>
60. Riley, J.P., & Sinhaseni, P. (1957). The determination of ammonia and total ionic inorganic nitrogen in sea water. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 36(1), 161-168. <https://doi.org/10.1017/S0025315400017161>
61. Rizk, F.A., Shaheen, A.M., Singer, S.M., & Sawan, O.A. (2013). The productivity of potato plants affected by urea fertilizer as foliar spraying and humic acid added with irrigation water. *Middle East Journal of Agriculture Research*, 2(2), 76-83.
62. Sabouri, F., Sirousmehr, A., & Gorgini Shabankareh, H. (2018). Effect of irrigation regimes and application of humic acid on some morphological and physiological characteristics of savory (*Satureja hortensis* L.). *Iranian Journal of Plant Biology*, 9(4), 13-24. (In Persian with English abstract)
63. Shi, W., Ju, Y., Bian, R., Li, L., Joseph, S., Mitchell, D.R., Munroe, P., Taherymoosavi, S., & Pan, G. (2020). Biochar bound urea boosts plant growth and reduces nitrogen leaching. *Science of the Total Environment*, 701, 134424.
64. Skubij, N., & Dzida, K. (2019). Influence of nitrogen dose and harvesting date on the yield and biological value of raw garden savory (*Satureja hortensis* L.) of Saturn cv. *Acta Scientiarum Polonorum Hortorum Cultus*, 18, 171-180. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.134424>
65. Song, X., Guo, W., Xu, L., & Shi, L. (2022). Beneficial effect of humic acid urea on improving physiological characteristics and yield of maize (*Zea mays* L.). *Acta Physiologiae Plantarum*, 44(7), 1-11. <https://doi.org/10.1007/s11738-022-03401-x>
66. Standard, A.S.T.M. (2011). *Annual Book of ASTM Standards*. Test Method for Ash in the Analysis Sample of Coal

- and Coke.
67. Stewart, G.R., Lee, J.A., & Orebamjo, T.O. (1973). Nitrogen metabolism of halophytes II. Nitrate availability and utilization. *New Phytologist*, 72(3), 539-546. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.1973.tb04405.x>
  68. Swift, R.S. (1996). *Organic matter characterization*. P. 1011-1069. In: Sparks D.L., Page A.L., Helmke P.A., Loeppert R.H., Soltanpour P.N., Tabatabai M.A., Johnston C.T., Sumner M.E. (eds) *Methods of Soil Analysis: Part 3. Chemical Methods*. Soil Science Society of America, Madison. <https://doi.org/10.2136/sssabookser5.3.c35>
  69. Syahren, A.M., & Wong, N.C. (2008). Extraction and chemical characteristics of nitro-humic acids from coals and composts. *Journal of Tropical Agriculture and Food Science*, 36(2), 269-279.
  70. Taghavi, T.S., & Babalar, M. (2007). The effect of nitrate and plant size on nitrate uptake and in vitro nitrate reductase activity in strawberry (*Fragaria × ananassa* cv. Selva). *Scientia Horticulturae*, 112(4), 393-398. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2007.01.002>
  71. Thorn, K.A., & Cox, L.G. (2016). Nitrosation and nitration of fulvic acid, peat and coal with nitric acid. *Plos One*, 11(5), e0154981. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0154981>
  72. Tomasi, N., Monte, R., Rizzardo, C., Venuti, S., Zamboni, A., Cesco, S., Pinton, R., & Varanini, Z. (2009). *Effects of water-extractable humic substances on molecular physiology of nitrate uptake in two maize inbred lines with different nitrogen use efficiency*. The Proceedings of the International Plant Nutrition Colloquium XVI. Department of Plant Sciences, University of California, Davis, CA.
  73. Trenkel, T. (2021). *Slow-and Controlled-Release and Stabilized Fertilizers: An Option for Enhancing Nutrient Use Efficiency in Agriculture*. International Fertilizer Industry Association (IFA).
  74. Uzoma, K.C., Inoue, M., Andry, H., Fujimaki, H., Zahoor, A., & Nishihara, E. (2011). Effect of cow manure biochar on maize productivity under sandy soil condition. *Soil Use and Management*, 27(2), 205-212. <https://doi.org/10.1111/j.1475-2743.2011.00340.x>
  75. Vendrell, P.F., & Zupancic, J. (1990). Determination of soil nitrate by transnitration of salicylic acid. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 21(13-16), 1705-1713. <https://doi.org/10.1080/00103629009368334>
  76. Wallinga, I., Van Vark, W., Houba, V.J.G., & Van der Lee, J.J. (1989). *Soil and plant analysis*, series of syllabi part 7, Plant analysis procedure. Wageningen Agriculture University, Wageningen.
  77. Wang, D., Chen, X., Tang, Z., Liu, M., Jin, R., Zhang, A., & Zhao, P. (2022). Application of humic acid compound fertilizer for increasing sweet potato yield and improving the soil fertility. *Journal of Plant Nutrition*, 45(13), 1933-1941. <https://doi.org/10.1080/01904167.2022.2046064>
  78. Westerman, R.L. (1990). *Soil testing and plant analysis*. 3rd editio. Soil Science Society of America, Madison. <https://doi.org/10.1080/01904167.2022.2046064>
  79. Yadegari, M. (2022). Effects of NPK, botamisol, and humic acid on morphophysiological traits and essential oil of three *Satureja* species under drought stress. *Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants Research*, 38(1), 61-80. (In Persian with English abstract)
  80. Yan, L., Ya-fu, T., Yue-chao, Y., Yuan-mao, J., & Dong-dong, CH. (2022). Effects of large-grained activated humic acid fertilizer on soil aggregates and organic carbon in apple orchard soil. *Yingyong Shengtai Xuebao*, 33(4), <https://doi.org/10.13287/j.1001-9332.202204.012>
  81. Zare, SH., Sirousmehr, A., Ghanbari, A., & Tabatabaei, S.J. (2013). The effect of different rates of municipal compost and n fertilizer on the essential oil and some vegetative characteristics of summer savoury (*Satureja hortensis* L.). *Iranian Journal of Field Crops Reseach*, 11(1), 191-199. (In Persian with English abstract) <https://doi.org/10.22067/GSC.V11I1.24129>
  82. Zaremanesh, H., Eisvand, H.R., Akbari, N., Ismaili, A., & Fezian, M. (2022). The effect of humic acid on germination indices and some growth traits of Khuzestani savory (*Satureja khuzistanica*, Jamzad) Andimeshk's ecotype under salinity stress. *Seed Science and Technology*, 10(4), 149-161. (In Persian with English abstract)
  83. Zhang, S.Q., Liang, Y., Wei, L., Lin, Z., Li, Y.T., Hu, S.W., & Zhao, B.Q. (2019). Effects of urea enhanced with different weathered coal-derived humic acid components on maize yield and fate of fertilizer nitrogen. *Journal of Integrative Agriculture*, 18(3), 656-666. [https://doi.org/10.1016/S2095-3119\(18\)61950-1](https://doi.org/10.1016/S2095-3119(18)61950-1)