

Research Article

Effect of Application of Nitrogen-Enriched Humic Acid (NHA) on Morphological and Physiological Characteristics of Maize (Single Cross 704)

M Mirzaei Varoei^{1*}, Sh Oustan², A Reyhanitabar³, N Najafi⁴

Received: November 20, 2022

Accepted: February 9, 2023

Revised: January 23, 2023

Published online: March 20, 2024

1. Ph.D. candidate, Soil Science Dept., Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Iran

2. Prof., Soil Science Dept., Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Iran

3. Prof., Soil Science Dept., Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Iran

4. Prof., Soil Science Dept., Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Iran

* Corresponding Author, Email: mansourmirzaei63@gmail.com

Abstract

Background and Objectives

Nitrogen (N) plays a major role in maize growth and yield. Therefore, adequate supply of N is required for successful maize production. However, application of chemical nitrogen fertilizers is associated with some problems such as groundwater pollution, nitrogen enrichment of surface waters, and nitrate accumulation in agricultural products. Accordingly, nowadays a great attention has been paid to the slow-release fertilizers. Nitrogen-enriched humic acids (NHAs) are considered as promising slow-release nitrogen fertilizers in agricultural systems. However, the effects of these types of fertilizers on plant growth and physiological characteristics have not been well understood. For this purpose, the present study investigates the effectiveness of NHAs on the morphological and physiological characteristics of maize as well as nitrogen loss through leaching.

Methodology

The Nitrogen-enriched humic acids (NHAs) were prepared through the simple process of nitration, and from the reaction of nitric acid with humic acid (HA) extracted from leonardite of Yazd Golsang Kavir Company as an organic carbon source. Then, a greenhouse experiment in a completely randomized design (CRD) with three replications was conducted to determine the effects of 16 treatments, including control, urea (U_1 , U_2 and U_3), humic acid (HA_1 , HA_2 and HA_3), nitrogen-enriched humic acid (NHA_1 , NHA_2 and NHA_3), urea-humic acid (U_1HA_1 , U_2HA_2 and U_3HA_3), and urea-nitrogen-enriched humic acid (U_1NHA_1 , U_2NHA_2 and U_3NHA_3) on the morphological and physiological characteristics of maize plant (Single cross-704). The levels of treatments were determined as the quarter (50 mg N kg^{-1}), half (100 mg N kg^{-1}) and equal (200 mg N kg^{-1}) to the maize fertilizer requirement. In the combined treatments of urea and HA or NHA, an equal fraction of the total nitrogen was considered. After the end of the experiment, using the standard methods, some 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 and nitrate, and nitrate reductase activity in both shoot and root were determined. Moreover, during the experiment and on given days, the maize pots were leached and the obtained leachate was collected for the nitrate measurement.

Findings

According to the results, the nitrogen content of the produced NHA (3.3%) was about two times higher than the HA (1.6%). In addition, the NHA had higher carboxyl and phenolic hydroxyl content than the HA. The FT-IR analysis showed the characteristic peaks of nitro (NO_2) groups at wavenumbers of 1541 and 1336 cm^{-1} in the spectrum of NHA. Germination test indicated that the NHA was not toxic to the maize seeds. The results showed that the NHA treatments had a much better influence on the plant morphological characteristics than the HA treatments. This observation may be due to the negative effects of HA application at high dosages. In comparison, the UNHA treatments were only slightly more efficient than the

urea treatments. Combining NHA with urea diminishes the adverse impacts of separate application of these two fertilizers. On average, leaf chlorophyll index and concentrations of total nitrogen, nitrate and nitrate reductase enzyme in shoot part of plants in the NHA treatments were 11.5, 17.0, 35.2 and 29.4% higher than the HA treatments. The nitrate reductase concentration in the roots was 40.4% lower than the shoots. However, the UNHA and urea treatments showed almost similar efficiency in improving physiological characteristics. The U_3NHA_3 or U_3 treatments, i.e. the highest level of nitrogen, showed the highest efficiency which means the high nitrogen requirements of maize in pot experiments. Based on the results, the nitrogen supply to the maize plant increased the shoot concentration of potassium higher than that of phosphorus. Although the U_3 treatment indicated the highest nitrogen and nitrate concentrations in both root and shoot, the highest nitrate leaching was also observed for this treatment. However, by using the U_3NHA_3 treatment, the mean concentration of nitrate in the leachate decreased by about 48.7% as compared to the U_3 treatment.

Conclusion

Findings of this research revealed that the combined fertilizer of UNHA can be a good alternative for urea. It could not only supply nitrogen for plants, but could improve plant vegetative growth, and in turn considerably reduce nitrate leaching, which has highly beneficial effects on nitrogen use efficiency as well as environmental issues.

Keywords: Leonardite, Nitric acid, Nitrate leaching, Nitrate reductase enzyme, Urea.

مقاله پژوهشی

تأثیر کاربرد هیومیک‌اسید غنی‌شده با نیتروژن (NHA) بر ویژگی‌های مورفولوژیک و فیزیولوژیک ذرت (سینگل کراس ۷۰۴)

منصور میرزایی و رویی^{۱*}، شاهین اوستان^۲، عادل ریحانی‌تبار^۳، نصرت‌اله نجفی^۴

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۸/۲۹

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۱۲/۲۰

تاریخ ویرایش: ۱۴۰۱/۱۲/۱۳

تاریخ انتشار آنلاین: ۱۴۰۳/۰۱/۰۱

- ۱- دانشجوی دکتری، گروه علوم و مهندسی خاک، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز
 - ۲- استاد، گروه علوم و مهندسی خاک، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز
 - ۳- استاد، گروه علوم و مهندسی خاک، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز
 - ۴- استاد، گروه علوم و مهندسی خاک، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز
- *مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: mansourmirzaei63@gmail.com

چکیده

هیومیک‌اسیدهای غنی‌شده با نیتروژن (NHA) به‌عنوان کود نیتروژن و محرک رشد گیاه مورد استفاده قرار گرفته‌اند. در پژوهش حاضر، NHA از واکنش نیتریک‌اسید با هیومیک‌اسید (HA) استخراج‌شده از لئوناردیت تهیه شد و درصد نیتروژن آن به‌روش آنالیز CHNS تعیین گردید. سپس، یک آزمایش گلخانه‌ای با کشت ذرت در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۱۶ تیمار شامل شاهد (بدون مصرف اوره، HA و NHA) و اوره (U)، هیومیک‌اسید (HA)، اوره-هیومیک‌اسید (UHA)، هیومیک‌اسید غنی‌شده با نیتروژن (NHA) و اوره-هیومیک‌اسید غنی‌شده با نیتروژن (UNHA) هرکدام در سه سطح و در سه تکرار انجام شد. سطوح تیمارها بر مبنای ربع (50 mg N kg^{-1})، نصف (100 mg N kg^{-1}) و برابر نیاز کودی ذرت (mg kg^{-1}) تعیین شدند و در تیمارهای مخلوط، سهم برابری از نیتروژن برای اوره، HA و NHA در نظر گرفته شد. نتایج حاکی از کارایی مطلقاً زیاده‌تر NHA نسبت به HA و نیز کارایی قدری زیاده‌تر UNHA نسبت به اوره در ارتقای اغلب ویژگی‌های مورفولوژیک ذرت بود. همچنین، به‌طور متوسط، شاخص کلروفیل برگ و غلظت‌های نیتروژن، نیترات و فعالیت آنزیم نیترات‌ردوکتاز شاخساره در تیمارهای NHA به‌ترتیب $1/5$ ، $0/17$ ، $2/35$ و $4/29$ درصد بیش‌تر از تیمارهای HA بود. با این حال، تیمارهای UNHA و اوره در اغلب صفات فیزیولوژیک نتایج تقریباً مشابهی را نشان دادند. بیش‌ترین غلظت نیتروژن و نیترات در گیاه متعلق به تیمار U_3 بود، اما بالاترین میزان آبشویی نیترات نیز در همین تیمار مشاهده شد که با کاربرد تیمار U_3NHA_3 حدود $8/7$ درصد کاهش یافت. با توجه به یافته‌ها، UNHA می‌تواند به‌عنوان کود نیتروژن مطرح شود که نیاز به پژوهش‌های بیش‌تری دارد.

واژه‌های کلیدی: آبشویی نیترات، آنزیم نیترات‌ردوکتاز، اسید نیتریک، اوره، لئوناردیت.

مقدمه

ذرت به عنوان یکی از مهم ترین محصولات زراعی، نه تنها یک ماده غذایی مهم است، بلکه یک ماده خام با ارزش صنعتی نیز محسوب می شود که جایگاه خاصی در اقتصاد کشورها دارد (ژنگ و همکاران ۲۰۱۸). نیتروژن نقش اصلی را در فرآیندهای مختلف فیزیولوژیک و در نتیجه عملکرد ذرت به عهده دارد (ماهسواری و همکاران ۲۰۱۷). کمبود این عنصر غذایی یکی از مهم ترین عوامل افت عملکرد ذرت محسوب می شود زیرا به راحتی هدر می رود (خان و همکاران ۲۰۱۹).

بر اساس پیش بینی فائو (بی نام ۲۰۱۹) جمعیت جهان در سال ۲۰۵۰ به ۹/۷ میلیارد نفر خواهد رسید. لذا، ضروری است که تولید محصولات غذایی در فاصله سال های ۲۰۰۵ تا ۲۰۵۰ دو برابر شود تا پاسخ گوی نیازهای غذایی جمعیت در حال رشد باشد. نیتروژن یک عامل اصلی محدودکننده برای تولید محصول بوده و معمولاً به شکل کودهای شیمیایی یا آلی به خاک اضافه می شود (ژانگ ۲۰۱۷). در میان کودهای نیتروژن، کود اوره یکی از پرمصرف ترین کودهای شیمیایی نیتروژن در کشاورزی محسوب می شود (ماریانو و همکاران ۲۰۱۹). با این حال، گزارش ها نشان می دهد که تقریباً ۲۰ تا ۷۰ درصد از اوره مصرف شده در زمین های زراعی از طریق آبشویی، نیترات زدایی و تصعید هدر می رود (ناز و سلیمان ۲۰۱۶) که می تواند منجر به مشکلات جدی زیست محیطی از طریق آلودگی آب های زیرزمینی و انتشار N_2O و آمونیاک در اتمسفر شود (شی و همکاران ۲۰۲۰). یکی از تدابیر مدیریتی در جهت کاهش تلفات نیتروژن و مقابله با آثار منفی کودهای متداول، استفاده از کودهای نیتروژن با کارایی زیاد مانند کودهای کندرهای نیتروژن است (وانگ و همکاران ۲۰۲۲a). کودهای کندرها رهاسازی تأخیری نیتروژن را تضمین

کرده و شرایط خاک و رشد گیاه را نیز بهبود می بخشد (ترنکل ۱۹۹۷).

مواد هیومیک می توانند به عنوان کود کندرها، نیتروژن مورد نیاز گیاه را فراهم نموده (اوزکان و اوزکان ۲۰۰۷) و از این طریق کارایی مصرف نیتروژن به وسیله گیاه را افزایش دهند. با توجه به اینکه این مواد دارای درصد نیتروژن کمی هستند، استفاده از مقادیر زیاد آن ها می تواند برای رشد گیاه محدودکننده باشد (کالایچلوی و همکاران ۲۰۰۶). در این رابطه، هیومیک اسید غنی شده با نیتروژن^۱ یا نیترو هیومیک اسید^۲ (NHA) به عنوان کود نیتروژن (وانگ و همکاران ۲۰۲۲b) و محرک رشد گیاه (پاتی و همکاران ۱۹۹۲) مورد توجه قرار گرفته اند. در واقع، NHA ساختار شیمیایی مشابه با هیومیک اسید (HA) دارد اما با گروه های نیترو ($-NO_2$) اضافی که طی فرآیند نیترودار کردن^۳ به NHA اضافه می شوند (فاطیما و همکاران ۲۰۲۱).

هیومیک اسیدهای غنی شده با نیتروژن معمولاً از اکسید شدن منابعی همچون کمپوست (شیارن و وونگ ۲۰۰۸) و یا زغال سنگ (تورن و کاکس ۲۰۱۶) با اسید نیتریک تولید می شوند. نقش HA در تشدید جذب نیتروژن حاصله از کود اوره به وسیله گیاه گزارش شده است (ژانگ و همکاران ۲۰۱۹). با این حال، اثر مهارکنندگی NHAs بر نیترات سازی نیز مشاهده شده است (پاتی و همکاران ۱۹۹۲). در محیط خاک NHA به وسیله آنزیم نیترو ردوکتاز احیا شده و سپس برای تولید یون های NH_4^+ آمین زدایی^۴ می شود (جو و پارالس ۲۰۱۰).

با توجه به اهمیت کودهای آلی از جنبه های کشاورزی و زیست محیطی، این پژوهش با هدف تولید یک کود هیومیک اسید غنی شده با نیتروژن از طریق بارگذاری نیتروژن بر روی هیومیک اسید و بررسی اثر آن بر ویژگی های مورفولوژیک و فیزیولوژیک گیاه ذرت

³ Nitration⁴ Deamination¹ Nitrogen-enriched humic acid² Nitohumic acid

(درصد های کربن، هیدروژن، نیتروژن، گوگرد و اکسیژن) با دستگاه CHNS Analyzer (vario EL III Element Analyzer)، شناسایی گروه های عامل با استفاده از دستگاه FT-IR (Vector 22) ساخت شرکت Bruker Optics (کشور آلمان)، اسیدیته کل با استفاده از روش هیدروکسید باریم، فراوانی گروه های کربوکسیل با استفاده از روش استات کلسیم و فراوانی گروه های هیدروکسیل فنولی از تفاضل اسیدیته کل و گروه های کربوکسیلی به دست آمد (سویفت ۱۹۹۶). برای تعیین مقدار خاکستر، یک گرم از HA و NHA به مدت ۴ ساعت در کوره با دمای ۷۵۰ درجه سلسیوس قرار داده شد (استاندارد ای اس تی ام دی ۳۱۷۴، ۲۰۱۱).

آزمون جوانه زنی بذر

برای ارزیابی احتمال سمیت HA و NHA، یک آزمایش جوانه زنی بذر انجام شد. برای این کار، تعداد ۳۰ عدد بذر ذرت علوفه ای (رقم سینگل کراس ۷۰۴) در سه تکرار در پتری دیش هایی با قطر ۱۲ سانتی متر روی کاغذ صافی قرار داده شدند. سپس، ۱۰ میلی لیتر از عصاره HA استخراج شده و NHA تولید شده از لئوناردیت با غلظت ۲۵۰ میلی گرم در لیتر به هر پتری دیش اضافه شده و در دمای ۲۲ درجه سلسیوس انکوباتور به مدت ۴۸ ساعت نگهداری شدند. در نهایت، نسبت جوانه زنی بذر (RSG^6)، نسبت رشد ریشه چه (RRG^7)، جوانه زنی بذر (SG^8) و شاخص جوانه زنی (GI^9) به ترتیب با استفاده از معادلات ۱، ۲، ۳ و ۴ محاسبه شدند (لئو و همکاران ۲۰۱۸).

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

$$RRG = \frac{\text{زده در نمونه های بذریه های جوانه چه طول کل ریشه}}{\text{زده در شاهد های بذریه های جوانه چه طول کل ریشه}} \quad [2]$$

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

و هدررفت نیتروژن از کود تولید شده در مقایسه با هیومیک اسید و کود اوره در شرایط گلخانه ای انجام شد.

مواد و روش ها

تولید هیومیک اسید غنی شده با نیتروژن (NHA)

برای تهیه NHA در این پژوهش از لئوناردیت^۵ به عنوان یک منبع غنی از HA (آکیمبو و همکاران ۲۰۲۰) استفاده شد. لئوناردیت مورد استفاده که از شرکت گل سنگ کویر یزد خریداری شد دارای ۳۲ درصد HA بود که ۸۲ درصد از آن به NHA تبدیل شد. با این حال، با بهینه سازی شرایط آزمایشی می توان به درصد های بازیابی بالاتر نیز دست یافت. برای تولید NHA، ابتدا نمونه لئوناردیت در محلول NaOH نیم مولار در نسبت جامد به محلول ۱ به ۱۰ با سرعت 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 جمع آوری گردید. محلول جمع آوری شده با افزودن قطره قطره HCl ۶ مولار تا pH=۱ اسیدی شد و HA رسوب داده شده بعد از ۲۴ ساعت جمع آوری گردید. هیومیک اسید به دست آمده با مخلوطی از HCl (۰/۱ مولار) و HF (۰/۳ مولار) به مدت ۲۴ ساعت تکان داده شد تا ناخالصی های معدنی حذف شوند. سپس، HA با آب مقطر شسته شد تا یون های کلرید آزاد حذف شوند (سویفت ۱۹۹۶). در نهایت، HA ابتدا هوا خشک شد و سپس در دسیکاتور حاوی سیلیکاژل خشک گردید. هیومیک اسید استخراج شده با اسید نیتریک ۵۰ درصد (حجمی/حجمی) با نسبت جامد به محلول ۱ به ۲/۵ به مدت تماس 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 (آلمندروس و دوردو ۱۹۹۹). تجزیه عنصری

⁸ Seed germination

⁹ Germination index

⁵ Leonardite

⁶ Relative seed germination

⁷ Relative radical growth

[۴]

$$GI = RSG \times RRG$$

آماده‌سازی و تعیین ویژگی‌های خاک

ابتدا خاک مورد نظر از عمق ۲۰-۰ سانتی‌متری اراضی دانشگاه کردستان با مختصات جغرافیایی ۳۵ درجه و ۲۸ دقیقه ۸ ثانیه شمالی و ۴۸ درجه و ۱۰ ثانیه شرقی نمونه‌برداری شده و بعد از هواخشک شدن و نرم شدن از الک ۲ میلی‌متری عبور داده شد. سپس، برخی از ویژگی‌های شیمیایی و فیزیکی خاک شامل بافت (گی و اُر ۲۰۰۲)، رطوبت معادل مکش ۰/۱ بار (کلوت و دیرکسن ۱۹۸۶)، قابلیت هدایت الکتریکی ($EC_{1:2}$) و $pH_{1:2}$ (گاولاک و همکاران ۲۰۰۵)، کربن آلی (نلسون و سامرز ۱۹۹۶)، ظرفیت تبادل کاتیونی (CEC) (چپمن ۱۹۶۵)، کربنات کلسیم معادل (CCE) (آلیسون و مودیه ۱۹۶۵)، نیتروژن کل (جونز ۲۰۰۱)، فسفر قابل جذب از روش اولسن (کیو ۱۹۹۶) و پتاسیم قابل جذب با عصاره‌گیر استات آمونیوم (نلسون ۱۹۸۲) اندازه‌گیری شد. نیترات و آمونیوم خاک به‌ترتیب با استفاده از K_2SO_4 ۰/۰۵ مولار (بلک و وارینگ ۱۹۷۸) و KCl ۲ مولار (کینی و نلسون ۱۹۸۲) استخراج شده و با روش‌های اسید سالیسیلیک (وندل و زوپانچیک ۱۹۹۰) و ایندوفنول‌بلو (رایلی و سینهاسنی ۱۹۵۷) اندازه‌گیری شدند.

آزمایش گلخانه‌ای (کشت گلدانی، اعمال تیمارها و آبشویی گلدان‌ها)

یک آزمایش گلخانه‌ای در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار انجام شد. در این آزمایش، ۱۶ تیمار آزمایشی شامل شاهد (بدون مصرف اوره، HA و NHA)، اوره (U)، هیومیک اسید (HA)، هیومیک اسید غنی‌شده با نیتروژن (NHA)، اوره+ هیومیک اسید (UHA) و اوره+ هیومیک اسید غنی‌شده با نیتروژن (UNHA) هریک (به استثنای شاهد) در سه سطح به‌ترتیب بر مبنای ربع (mg $50 N kg^{-1}$)، نصف ($100 mg N kg^{-1}$) و برابر نیاز کودی نرت ($200 mg N kg^{-1}$) (غیبی و همکاران ۲۰۱۳) گنجانده شد. در تیمارهای مخلوط، سهم برابری از نیتروژن برای اوره و HA و یا NHA در نظر گرفته شد. اوره، HA و

NHA به‌ترتیب دارای ۴۶، ۱/۶ و ۳/۳ درصد نیتروژن بودند. HA و NHA قبل از کشت بذر به خاک گلدان‌ها افزوده شده و به‌مدت ۲ هفته در رطوبت ۰/۱ بار انکوبه شدند. اوره نیز به‌صورت تقسیط شده در سه نوبت در روزهای ۵، ۲۵ و ۵۵ بعد از کشت بذر همراه با آب آبیاری به گلدان‌ها اضافه شد. با توجه به غنی‌بودن خاک از نظر فسفر و پتاسیم قابل جذب گیاه، از افزودن این عناصر غذایی به‌شکل کودی صرف نظر گردید.

در این پژوهش، تعداد ۴۸ گلدان پلاستیکی ۲ کیلوگرمی تهیه شد و گلدان‌ها بعد از اعمال تیمارها به‌مدت ۲ هفته در رطوبت ۰/۱ بار انکوبه شدند. سپس، تعداد ۴ عدد بذر ذرت علوفه‌ای (رقم سینگل کراس ۷۰۴) در عمق ۴ تا ۵ سانتی‌متری گلدان‌ها کشت شد. پس از سبز شدن بوته‌ها و اطمینان از استقرار آن‌ها، تعداد بوته‌ها در هر گلدان به ۳ عدد کاهش یافت. رطوبت گلدان‌ها با استفاده از توزین در ۷۰ تا ۸۰ درصد رطوبت معادل مکش ۰/۱ بار نگهداری شد. 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 (اوزما و همکاران ۲۰۱۱). به‌منظور بررسی اثر تیمارها بر میزان آبشویی نیترات از خاک، گلدان‌ها در فواصل زمانی معین (هر ۱۰ روز یکبار) آبشویی شدند. بر این اساس، برای جمع‌آوری آبشویه گلدان‌ها، ۲۵ درصد آب مازاد بر رطوبت مکش ۰/۱ بار برای تأمین نیاز آبشویی لحاظ شد. بعد از هر بار آبشویی، غلظت نیترات در آبشویه اندازه‌گیری و آبشویه جمع‌آوری شد و تا زمان برگردانده شدن به گلدان‌ها در مواقع آبیاری منجمد شد (لو و همکاران ۲۰۲۱).

تعیین صفات مورفولوژیک و فیزیولوژیک گیاه ذرت

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 شاخساره، طول ریشه، حجم ریشه و سطح برگ (با استفاده از

میلی لیتر محلول محتوی ترکیبات ۰/۱ میلی لیتر بافر فسفات (1 M, pH=7.5)، ۰/۱ میلی لیتر NADH (1 mg L^{-1})، ۰/۲ میلی لیتر KNO_3 (0.1 M)، ۱/۲ میلی لیتر آب مقطر و ۰/۱ میلی لیتر عصاره آنزیمی، به مدت ۲۰ دقیقه در حمام آبی در دمای ۲۷ درجه سلسیوس قرار گرفت. واکنش با افزودن ۱ میلی لیتر سولفانیلامید (۱ گرم در ۱۰۰ میلی لیتر اسید کلریدریک نرمال) متوقف شد. بعد از ۵ دقیقه، ۱ میلی لیتر N-نفتیل اتیلن دی آمین دی کلراید (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_2) تهیه شدند و فعالیت آنزیم بر حسب میکرومول نیتريت در گرم وزن تازه بافت در ساعت ($\mu\text{mol NO}_2^- \text{ h}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ FW}$) محاسبه گردید.

تجزیه آماری

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

نتایج و بحث

ویژگی‌های خاک

جدول ۲ ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی نمونه خاک مورد استفاده در آزمایش گلخانه‌ای را نشان می‌دهد. به‌طور کلی، بر اساس نتایج جدول ۲، نمونه خاک استفاده شده در این پژوهش یک خاک لوم شنی، آهکی و فقیر از نظر کربن آلی و نیتروژن کل بود.

ویژگی‌های HA و NHA استخراج‌شده

ویژگی‌های HA استخراج‌شده و NHA تولیدشده از لئوناردیت در جدول ۳ ارائه شده است. همان‌طور که در جدول ۳ مشاهده می‌شود، غلظت نیتروژن در NHA (۳/۳ درصد) حدود دو برابر همین غلظت در HA (۱/۶ درصد) بود. در مطالعات پیشین نیز مقادیر ۰/۹ و ۱/۶۸

سطح سنج برگ پرتابل مدل AM200 کمپانی (ADC) و قطر ساقه (با استفاده از کولیس دیجیتالی) اندازه‌گیری شدند. همچنین، وزن خشک ریشه و شاخساره بعد از خشک کردن نمونه‌ها در خشک‌کن فن‌دار (SELECTA، اسپانیا) در دمای ۷۰ درجه سلسیوس به مدت ۷۲ ساعت تعیین شد. صفات فیزیولوژیک گیاه شامل نیتروژن کل به روش کج‌لال (جونز ۲۰۰۱) و غلظت فسفر و پتاسیم بعد از خشک سوزانی (وسترمن ۱۹۹۰) به ترتیب به روش‌های رنگ‌سنجی (کوتینی ۱۹۸۰) و نشر شعله‌ای (والینگ و همکاران ۱۹۸۹) تعیین شدند.

تعیین غلظت نیترات در گیاه

استخراج نیترات از گیاه به روش بکر و اسمیت (جونز ۲۰۰۱) انجام شد. بر این اساس، مقدار ۴۰۰ میلی گرم از برگ خشک شده به یک فاکون ۵۰ میلی لیتری انتقال داده شد و به آن ۴۰ میلی لیتر محلول ۰/۰۲۵ مولار سولفات آلومینیم [$\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$] اضافه گردید و به مدت ۱۵ دقیقه در ۱۲۰ رفت و برگشت در دقیقه تکان داده شد. سپس، با استفاده از کاغذ صافی واتمن شماره ۴۰ صاف گردید. در نهایت، غلظت نیترات به روش سالیسیلیک اسید (کاتالدو و همکاران ۱۹۷۵) تعیین شد.

تعیین فعالیت آنزیم نیترات ردوکتاز در گیاه

فعالیت آنزیم نیترات ردوکتاز در بافت تازه شاخساره و ریشه در پایان دوره رشد رویشی تعیین گردید (استوارت و همکاران ۱۹۷۳). نمونه‌ها تا زمان اندازه‌گیری در دمای ۷۰- درجه سلسیوس نگهداری شدند. برای تهیه عصاره آنزیمی، یک گرم از نمونه‌های برگ و ریشه در هاون چینی در ۴ درجه سلسیوس با ۸ میلی لیتر محلول حاوی بافر فسفاتی (0.1 M, pH=7.5)، EDTA (1 mM)، دی تیوتریتول (1 mM) و کازئین ۲/۲ درصد (وزنی/حجمی) سائیده 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 فعالیت سینتیکی آنزیم نیترات ردوکتاز، لوله آزمایش حاوی ۱/۷

درصد نیتروژن برای HAهای استخراج شده از به ترتیب لئوناردیت (شیارن و وونگ ۲۰۰۸) و لیگنیت (چنگ و همکاران ۲۰۱۹) و مقادیر ۱/۱ و ۲/۷ درصد نیتروژن برای NHAهای استخراج شده از به ترتیب لئوناردیت (شیارن و وونگ ۲۰۰۸) و لیگنیت (فاطمی و همکاران ۲۰۲۱) گزارش شده است. به علاوه، NHA از اسیدیته کل و گروه های کربوکسیل و فنولی بیشتری نسبت به HA برخوردار بود (جدول ۳) که توسط سایر پژوهشگران نیز گزارش شده است (شیارن و وونگ ۲۰۰۸). در واقع، واکنش نیترودار کردن (اکسایش با اسید نیتریک) HA سبب افزایش محتوای نیتروژن در NHA تولیدی به واسطه استخلاف گروه های نیترو (NO_2) شده (بورال

و همکاران ۲۰۲۱) که در طیف FT-IR نشان داده شده است. به طور کلی، پیک های موجود در دامنه های cm^{-1} ۱۵۲۹-۱۵۴۶ و cm^{-1} ۱۳۲۷-۱۳۷۷ به ارتعاش کششی گروه های نیترو (NO_2) نسبت داده می شوند (پاتی و همکاران ۱۹۹۲؛ نصیر و همکاران ۲۰۱۱) که فقط در طیف مربوط به NHA مشاهده شد (شکل ۱). همچنین، پیک موجود در cm^{-1} ۱۷۱۲ مربوط به پیوند $\text{C}=\text{O}$ در گروه کربوکسیل و پیک موجود در cm^{-1} ۲۴۲۱ مربوط به گروه های هیدروکسیل می باشد (شیارن و وونگ ۲۰۰۸) که در هر دو نمونه HA و NHA تشخیص داده شد (شکل ۱). با این حال، تفاوت فراوانی گروه کربوکسیل در HA و NHA به قدری نیست که در طیف FT-IR مشخص باشد.

جدول ۱- برخی ویژگی های فیزیکوشیمیایی خاک مورد استفاده در مطالعه.

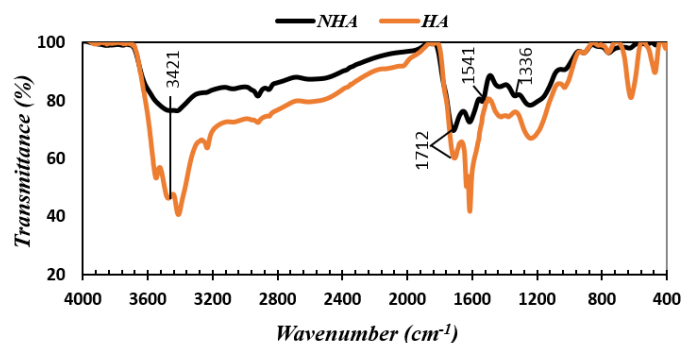
رس	سیلت	شن	OC	CCE	CEC	TN	$\text{NO}_3\text{-N}$	$\text{NH}_4\text{-N}$	P	K	$\text{EC}_{1:2}$	$\text{pH}_{1:2}$	بافت
			%		($\text{cmol}_c \text{ kg}^{-1}$)			(mg kg^{-1})			(dS m^{-1})		
۱۱	۱۴	۷۵	۰/۴۶	۲۴	۱۵/۴	۳۲۰	۹/۱۵	۷/۹۳	۲۲/۳	۳۰۴	۰/۲	۸/۰۳	لوم شنی

OC: کربن آلی، TN: نیتروژن کل، CEC: ظرفیت تبادل کاتیونی، CCE: کربنات کلسیم معادل، P: فسفر قابل جذب، K: پتاسیم قابل جذب

جدول ۲- مقادیر اسیدیته کل، گروه های کربوکسیل و فنولی، تجزیه عنصری، نسبت های اتمی و درصد خاکستر هیومیک اسید (HA) و هیومیک اسید غنی شده با نیتروژن (NHA) به دست آمده از لئوناردیت

منبع	C	H	N	S	O	خاکستر	C/N	اسیدیته کل	گروه های کربوکسیل	گروه های فنولی
آلی				(%)				(meq g^{-1})		
HA	۶۱/۲	۳/۱	۱/۶	۰/۸۲	۲۵/۱	۸/۳	۴۵/۴	۱۴/۹	۳/۲	۱۱/۷
NH A	۵۷/۷	۲/۶	۳/۳	۰/۷۱	۳۱/۱	۴/۶	۲۰/۵	۱۶/۴	۳/۸۵	۱۲/۶

$$\text{C/N} = [(\% \text{C} / 12.011) / (\% \text{N} / 14.0067)] \quad \% \text{O} = [100 - (\text{C} \% + \text{H} \% + \text{N} \% + \text{S} \% + \text{Ash} \%)]$$



شکل ۱- طیف FT-IR هیومیک اسید غنی شده با نیتروژن (NHA) در مقایسه با هیومیک اسید (HA) استخراج شده از لئوناردیت.

به‌طور کلی، با توجه به اینکه مقادیر GI بزرگتر از ۰/۸ بیانگر عدم سمیت است (لئو و همکاران ۲۰۱۸)، لذا بر اساس نتایج جدول ۳، NHA تولیدشده در این پژوهش برای گیاه سمی نخواهد بود. گرچه برای اطمینان بیشتر نیاز است که این آزمون در غلظت‌های بیش‌تر نیز انجام شود.

اثر تیمارهای کودی بر ویژگی‌های مورفولوژیک

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

سطح برگ

بیش‌ترین و کم‌ترین سطح برگ به‌ترتیب مربوط به تیمارهای NHA_3 ($845 \text{ cm}^2 \text{ pot}^{-1}$) و شاهد ($822 \text{ cm}^2 \text{ pot}^{-1}$)

۵۴۷) بود (جدول ۵). در همه تیمارها، سطح برگ با افزایش سطح نیتروژن یک روند افزایشی داشت. بیش‌ترین شدت افزایش مربوط به تیمارهای اوره (U) و کم‌ترین آن مربوط به تیمارهای HA بود. عظیم و همکاران (۲۰۱۵) نیز افزایش سطح برگ با افزایش سطح نیتروژن را گزارش کردند و دلیل آن را نقش نیتروژن در بهبود رشد رویشی گیاه بیان کردند. همچنین، میانگین سطح برگ در سه سطح HA ($622 \text{ cm}^2 \text{ pot}^{-1}$) بیش‌تر از شاهد ولی کمتر از سایر میانگین‌ها بود که حاکی از بروز اثرات منفی HA بر سطح برگ گیاه ذرت بود که توسط خان و همکاران (۲۰۱۹) نیز گزارش شده است. این در حالی بود که میانگین سطح برگ در سه سطح NHA (cm^2) 795 pot^{-1} بیش‌ترین بود.

جدول ۳- نتایج آزمون جوانه‌زنی بذر ذرت در تیمارهای هیومیک اسید (HA) و هیومیک اسید غنی‌شده با نیتروژن (NHA) به‌دست آمده از لئوناردیت.

تیمارها	تعداد بذرهای جوانه زده	طول کل ریشه‌چه‌ها (cm)	SG	RSG	RRG	GI
HA (شاهد)	۲۸/۳	۵۱/۵	۰/۹۴	-	-	-
NHA	۲۷	۶۰/۹	۰/۹۰	۰/۹۵	۱/۱۸	۱/۱۲

SG: جوانه‌زنی بذر، RSG: نسبت جوانه‌زنی بذر، RRG: نسبت رشد ریشه‌چه، GI: شاخص جوانه‌زنی بذر.

جدول ۴- تجزیه واریانس (میانگین مربعات) اثر تیمارها بر ویژگی‌های مورفولوژیک گیاه ذرت.

منبع	درجه	سطح برگ	طول ریشه	ارتفاع گیاه	وزن تر ریشه	وزن خشک ریشه	وزن تر شاخساره	وزن خشک شاخساره	حجم ریشه	قطر ساقه
تیمار	۱۵	۲۶۳۳۳**	۵۷/۸۲**	۴/۳۲**	۱/۵۲**	۰/۰۲**	۷/۶۷**	۰/۲۷**	۰/۳۹**	۰/۵۹**
خطا	۳۲	۱۰۴۱/۹	۷/۶۳	۱/۳۹	۰/۱۶	۰/۰۰۷	۰/۴۰۱	۰/۰۰۷	۰/۰۵	۰/۱۳
CV (%)	-	۴/۴۵	۸/۱۷	۷/۷۰	۸/۷۸	۱۸/۲۲	۴/۹۰	۴/۹۰	۹/۸۵	۶/۱۷

** معنادار در سطح احتمال ۱ درصد.

جدول ۵- مقایسه میانگین‌های ویژگی‌های مورفولوژیک گیاه ذرت برای تیمارهای مختلف.

تیمار	سطح برگ ($\text{cm}^2 \text{ pot}^{-1}$)	طول ریشه (cm pot^{-1})	ارتفاع گیاه (cm)	وزن تر ریشه (g pot^{-1})	وزن خشک ریشه (g pot^{-1})	وزن تر شاخساره (g pot^{-1})	وزن خشک شاخساره (g pot^{-1})	حجم ریشه ($\text{cm}^3 \text{ pot}^{-1}$)	قطر ساقه (mm)
شاهد	۵۴۷ ^g	۴۰/۳ ^{ab}	۱۲/۷ ^c	۴/۹ ^{bcd}	۰/۴۹ ^{abcd}	۹/۷ ⁱ	۱/۲۰ ⁱ	۲/۳ ^{cdef}	۴/۷ ^c
U ₁	۶۵۷ ^c	۳۲/۷ ^{cde}	۱۴/۳ ^{cde}	۴/۲ ^{def}	۰/۴۷ ^{abcd}	۱۲/۶ ^{fg}	۱/۴۷ ^{gh}	۲/۱ ^{defg}	۵/۸ ^{abc}
U ₂	۷۴۹ ^c	۴۳ ^a	۱۴/۸ ^{bcd}	۵/۲ ^{bc}	۰/۴۸ ^{abcd}	۱۳/۱ ^{efg}	۱/۸۳ ^{cd}	۲/۶ ^{bc}	۶ ^{abc}
U ₃	۸۲۸ ^{ab}	۴۱ ^{ab}	۱۵/۵ ^{ab}	۳/۵ ^f	۰/۳۴ ^d	۱۴/۷ ^{abc}	۲/۲۵ ^a	۱/۸۰ ^g	۶/۱ ^{ab}
HA ₁	۵۷۴ ^f	۳۵ ^{cd}	۱۴/۳ ^{cde}	۳/۶ ^{ef}	۰/۳۸ ^{cd}	۱۰/۸ ^h	۱/۲۶ ⁱ	۱/۸۳ ^g	۵ ^{de}
HA ₂	۶۲۴ ^{ef}	۳۷/۳ ^{bc}	۱۴/۸ ^{bcd}	۳/۸ ^{ef}	۰/۳۸ ^{cd}	۱۱/۱ ^h	۱/۳۱ ⁱ	۲ ^{efg}	۵/۳ ^{cde}

۵/۵ ^{bcd}	۱/۹ ^{fg}	۱/۴ ^{hi}	۱۱/۳ ^h	۰/۳۴ ^{cd}	۳/۹ ^{ef}	۱۳/۷ ^{de}	۳۰/۷ ^{de}	۶۶۹ ^{de}	HA ₃
۵/۸ ^{abc}	۲/۱ ^{defg}	۱/۵۸ ^{fg}	۱۲/۷ ^{efg}	۰/۳۵ ^{cd}	۴/۲ ^{def}	۱۶/۲ ^{abc}	۲۹/۷ ^{de}	۷۱۵ ^{cd}	U ₁ HA ₁
۵/۹ ^{abc}	۲/۳ ^{cdef}	۱/۵۹ ^{fg}	۱۳/۳ ^{defg}	۰/۴۳ ^{bcd}	۴/۵ ^{cde}	۱۶/۲ ^{abc}	۳۳ ^{cde}	۷۷۵ ^{bc}	U ₂ HA ₂
۶/۱ ^{ab}	۳/۱ ^a	۱/۸۹ ^{cd}	۱۵/۵ ^a	۰/۵۵ ^{ab}	۶/۱ ^a	۱۶/۴ ^{abc}	۳۱ ^{de}	۸۲۳ ^{ab}	U ₃ HA ₃
۵/۹ ^{abc}	۲/۲ ^{cdef}	۱/۶۵ ^{ef}	۱۲/۴ ^g	۰/۵۰ ^{abc}	۴/۵ ^{cde}	۱۵/۵ ^{abcd}	۳۱/۶ ^{de}	۷۲۵ ^{cd}	NHA ₁
۶ ^{abc}	۲/۵ ^{bcd}	۱/۷۸ ^{de}	۱۳/۷ ^{cdef}	۰/۵۵ ^{ab}	۴/۹ ^{bcd}	۱۵/۵ ^{abcd}	۳۱/۷ ^{de}	۸۱۶ ^{ab}	NHA ₂
۶/۳ ^a	۲/۸ ^{ab}	۱/۹ ^c	۱۴/۹۰ ^{ab}	۰/۵۹ ^a	۵/۵ ^{ab}	۱۶/۷ ^{ab}	۳۰/۳ ^{de}	۸۴۵ ^a	NHA ₃
۵/۷ ^{abc}	۲/۴ ^{bde}	۱/۶۷ ^{ef}	۱۳/۱ ^{efg}	۰/۴۷ ^{abcd}	۴/۷ ^{cd}	۱۴/۸ ^{bcd}	۳۴ ^{cd}	۶۷۹ ^{de}	U ₁ NHA ₁
۶ ^{abc}	۲/۷ ^{bc}	۱/۸۴ ^{cd}	۱۳/۸ ^{bcd}	۰/۵۶ ^{ab}	۵/۳ ^{bc}	۱۷/۲ ^a	۳۲/۶ ^{cde}	۷۴۵ ^c	U ₂ NHA ₂
۶/۲ ^a	۲/۳ ^{cdef}	۲/۰۸ ^b	۱۴/۴ ^{bcd}	۰/۴۹ ^{abcd}	۴/۶ ^{cde}	۱۶/۵ ^{abc}	۲۷/۷ ^c	۸۲۹ ^{ab}	U ₃ NHA ₃

اعداد دارای یک حرف لاتین مشترک با آزمون دانکن تفاوت معنادار ندارند ($p < 0.05$).

طول ریشه

بیشترین طول ریشه (43 cm pot^{-1}) در تیمار U₂ مشاهده شد، ولی تفاوت معناداری با شاهد (cm pot^{-1}) ($40/3$) نداشت. همچنین، بسیاری از تیمارها اثر معناداری بر طول ریشه نداشتند که حاکی از عدم پاسخ این صفت گیاهی به تیمارهای آزمایشی بود. با این حال، بشیر و همکاران (۲۰۱۲) کاهش طول ریشه ذرت با افزایش سطح کود اوره را گزارش کردند. به نظر می‌رسد که در پژوهش حاضر، کود اوره فقط رشد شاخساره مانند سطح برگ را افزایش داده و اثری بر رشد ریشه نداشته است. شریف و همکاران (۲۰۰۲) نیز نشان دادند که HA استخراج شده از زغال سنگ در غلظت‌های کم (mg kg^{-1}) (۱۰۰ و ۵۰) اثر مثبتی بر رشد ریشه داشته ولی این اثر در غلظت‌های زیاد (بیشتر از 100 mg kg^{-1}) معنادار نبود.

ارتفاع گیاه

بیشترین ارتفاع گیاه در تیمار U₂NHA₂ (cm) ($17/2$) و کمترین آن در تیمار شاهد ($12/7 \text{ cm}$) مشاهده شد. همچنین، میانگین ارتفاع گیاه در سطوح تیمارهای NHA ($15/9 \text{ cm}$) بیش‌تر از سطوح تیمارهای HA (cm) ($14/3$) بود که نشان‌دهنده برتری NHA بر HA از نظر این صفت گیاهی است. اثر مثبت مصرف توأم اوره و HA (در مقایسه با مصرف اوره به تنهایی) بر ارتفاع گیاه ذرت توسط امینی و همکاران (۲۰۱۸) نیز گزارش شده است.

وزن تر و خشک و حجم ریشه

بیشترین و کمترین وزن تر ریشه به ترتیب مربوط به تیمارهای U₃HA₃ (1 g pot^{-1}) و U₃ (g pot^{-1}) ($3/1$) بود. این در حالی بود که تیمار NHA₃ بیشترین ($0/59 \text{ g pot}^{-1}$) و تیمار U₃ کمترین ($0/34 \text{ g pot}^{-1}$) وزن خشک ریشه را نشان دادند. رشد ضعیف ریشه در تیمار U₃ می‌تواند به دلیل مسمومیت آمونیاک باشد که توسط فن و مک‌کنزی (۱۹۹۵) نیز گزارش شده است. میانگین وزن تر ریشه در سطوح تیمارهای NHA ($0/55 \text{ g pot}^{-1}$) و ۱/۵ برابر سطوح تیمارهای HA ($0/37 \text{ g pot}^{-1}$) بود. همچنین، بیشترین و کمترین حجم ریشه به ترتیب مربوط به تیمارهای U₃HA₃ و U₃ بود که با وزن تر ریشه هماهنگی داشت.

وزن تر و خشک شاخساره

بیشترین و کمترین وزن تر شاخساره به ترتیب در تیمارهای U₃HA₃ ($15/5 \text{ g pot}^{-1}$) و شاهد ($9/7 \text{ g pot}^{-1}$) مشاهده شد. این در حالی بود که تیمار U₃ بیشترین (g) ($2/2 \text{ pot}^{-1}$) و تیمار شاهد کمترین ($1/2 \text{ g pot}^{-1}$) وزن خشک شاخساره را نشان دادند. بیشترین وزن تر ریشه و شاخساره مربوط به تیمار U₃HA₃ بود که نشان می‌دهد تقسیم مساوی سطح سوم نیتروژن (200 mg N kg^{-1}) بین اوره و HA نقش مهمی را در تأمین آب برای گیاه ذرت داشت. بیشترین ماده خشک ریشه در تیمار NHA₃ و بیشترین ماده خشک شاخساره در تیمار U₃ به دست آمد. نقش HA در افزایش رشد ریشه (خان و همکاران ۲۰۱۳) و نقش کود اوره در افزایش رشد شاخساره

که ترکیبات فنولی کمپلکس‌های پایداری را با پروتئین‌ها تشکیل می‌دهند و از این رو به عنوان بازدارنده‌های متابولیسم و جذب نیتروژن شناخته می‌شوند (هانتشوایلر و ویتوسک ۲۰۰۰). نتایج جدول ۱ نشان می‌دهد که در NHA تولید شده در مقایسه با HA استخراج شده، اسیدیته کل به واسطه افزایش هر دو گروه کربوکسیل و هیدروکسیل فنولی، افزایش یافته است و لذا بهینه‌سازی شرایط اکسایش برای کاهش گروه‌های هیدروکسیل فنولی و افزایش هرچه بیشتر گروه‌های کربوکسیل نیاز به پژوهش‌های بیشتری دارد.

اثر تیمارهای کودی بر ویژگی‌های فیزیولوژیک

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

غلظت نیتروژن، فسفر، پتاسیم و نیترات در

شاخساره و ریشه

اثر تیمارهای مورد مطالعه بر غلظت نیتروژن، فسفر، پتاسیم و نیترات در شاخساره ذرت در جدول ۷ مشاهده می‌شود. بیش‌ترین و کم‌ترین درصد نیتروژن به ترتیب مربوط به تیمار U_3 (۳/۱۸) و تیمار شاهد (۱/۱۳) بود و نکته قابل توجه اینکه شاهد تفاوت معناداری با سطوح اول و دوم تیمار HA نداشت. بعد از تیمار U_3 بیش‌ترین درصد نیتروژن متعلق به تیمار U_3NHA_3 (۳/۰۴) بود. به علاوه، درصد نیتروژن در سطوح مختلف تیمار NHA کم‌تر از سطوح تیمارهای U ، UHA و $UNHA$ بود (جدول ۷). آمینی و همکاران (۲۰۱۸) نیز کم‌ترین غلظت نیتروژن برگ گیاه ذرت (۱/۷ درصد) را در تیمار شاهد و بیش‌ترین آن (حدود ۴ درصد) را در تیمار تلفیقی اوره + هیومیک اسید خالص مستخرج از کمپوست بستر قارچ مشاهده کردند. همچنین، خان و همکاران (۲۰۱۹) کم‌ترین غلظت نیتروژن شاخساره برای دو رقم مختلف ذرت را در تیمار شاهد (۰/۲۴ و ۰/۲۷ درصد) و بیش‌ترین آن را در تیمار تلفیقی ۱/۲ کیلوگرم هیومیک اسید + ۱۲۰

(امینی فرد و همکاران ۲۰۱۰) پیش‌تر نیز گزارش شده است.

قطر ساقه

بیش‌ترین و کم‌ترین قطر ساقه به ترتیب در تیمارهای NHA_3 (۶/۳ mm) و شاهد (۴/۷ mm) مشاهده شد که با سطح برگ هماهنگی داشت. با این حال، قطر ساقه در تیمار NHA_3 فقط به طور معناداری بیش‌تر از تیمارهای HA بود و با بقیه تیمارها (به استثنای شاهد) اختلاف معنادار نداشت.

به طور کلی، نتایج این پژوهش نشان داد که در همه تیمارها، اثر مثبت NHA بر صفات زراعی ذرت نسبت به HA به طور معناداری بیش‌تر بود. به علاوه، در مورد برخی صفات، تیمارهای تلفیقی UNHA و UHA اثربخشی بیش‌تری را نشان دادند. این نتایج با یافته‌های مطالعات پیشین که نشان دادند ترکیب کود اوره با هیومیک اسید رشد و عملکرد ذرت را بهبود می‌بخشد، مطابقت دارد (وان ورن و کلاسنس ۲۰۰۹؛ امینی و همکاران ۲۰۱۸؛ ژانگ و همکاران ۲۰۱۹). ژانگ و همکاران (۲۰۱۹) مشاهده کردند که کاربرد هیومیک اسید در کنار اوره، کارایی مصرف کود نیتروژن را افزایش داده و هدررفت نیتروژن را کاهش داد. در این راستا، لیانگ و همکاران (۱۹۹۹) نشان دادند که گروه آسیل آمینوی $^{10} (N-C=O)$ اوره نقش مهمی در تشکیل کمپلکس بسیار پایدار هیومیک اسید-اوره دارد. ترکیب اوره با هیومیک اسید، اوره را از هیدرولیز سریع حفظ کرده و در نتیجه منجر به رهاسازی کنترل‌شده اوره و تأمین تدریجی و مداوم نیتروژن برای گیاه می‌شود (دانگ و یوانگ ۲۰۰۹). همچنین، مالکولم و وایوکان (۱۹۷۹) بیان کردند که گروه‌های عامل کربوکسیل و هیدروکسیل فنولی نقش مهمی در تعیین فعالیت مواد هیومیک دارند. موسکولا و سیداری (۲۰۰۹) گزارش کردند که گروه کربوکسیل هیومیک اسید سبب افزایش و گروه هیدروکسیل فنولی سبب کاهش زیتوده کاج سیاه شد. دلیل می‌تواند آن باشد

¹⁰ Acylamino

کیلوگرم نیتروژن در هکتار (۰/۳۷ و ۰/۴۴ درصد) گزارش کردند. تفاوت‌های مشاهده شده برای غلظت نیتروژن شاخساره ذرت در تیمارهای مختلف می‌تواند مربوط به تفاوت در سطوح کودی (ژانگ و همکاران ۲۰۱۹) و نیز نوع و مقدار هیومیک اسید مورد استفاده (عظیم و همکاران ۲۰۱۵) در آزمایش باشد.

جدول ۶- تجزیه واریانس (میانگین مربعات) اثر تیمارها بر ویژگی‌های فیزیولوژیک گیاه ذرت.

منبع تغییر	درجه آزادی	کلروفیل	نیترات ردوکتاز	نیترات	فسفر	نیتروژن	پتاسیم
تیمار	خطا	CV (%)	شاخساره	ریشه	شاخساره	ریشه	شاخساره
۱۵	۵/۱۹**	۰/۶۲**	۰/۳۱**	۱۴۴۲۳**	۲۰۶۳۸**	۰/۰۰۰۷**	۰/۵۶**
۳۲	۰/۰۴	۰/۰۰۰۹	۰/۰۰۰۲	۵۶/۴۵	۸۴/۳	۰/۰۰۰۰۱	۰/۰۰۰۸
-	۱/۴۱	۱/۲۳	۰/۸۹	۹/۱۸	۷/۵۱	۰/۴۳	۲/۹۷

** معنادار در سطح احتمال ۱ درصد.

اسید (۴/۳۴ گرم فسفر بر مترمربع) مشاهده کردند که حدود دو برابر مقدار جذب فسفر در تیمار اوره (۱/۹۲ گرم فسفر بر متر مربع) بود. افزایش جذب فسفر در تیمارهای هیومیک اسید می‌تواند ناشی از جلوگیری از تثبیت فسفر در خاک شنی و تشکیل کمپلکس‌های هیوموفسفو^{۱۱} باشد که به راحتی بوسیله گیاه جذب می‌شود (ریانا و گوسوامی ۱۹۸۸). همان‌طور که در جدول ۷ ملاحظه می‌شود، با افزایش سطح نیتروژن، درصد فسفر گیاه نیز افزایش پیدا کرد. این افزایش می‌تواند به دلیل روابط سینرژیستی بین نیتروژن و فسفر باشد (ریترا و همکاران ۲۰۱۷).

درصد فسفر شاخساره ذرت در تیمارهای مختلف در جدول ۷ ارائه شده است. تیمار U_3NHA_3 بیش‌ترین (۰/۲۲ درصد) و تیمار شاهد کم‌ترین (۰/۱۹ درصد) درصد فسفر را نشان دادند، هرچند که به دلیل عدم مصرف کود فسفوره، تفاوت‌ها ناچیز بود. امینی و همکاران (۲۰۱۸) کم‌ترین غلظت فسفر برگ ذرت را در تیمار شاهد (حدود ۰/۱۵ درصد) و بیش‌ترین آن (حدود ۰/۳ درصد) را در تیمار تلفیقی اوره + هیومیک اسید خالص مستخرج از کمپوست بستر قارچ مشاهده کردند. آواد و همکاران (۲۰۱۴) نیز کم‌ترین مقدار جذب فسفر در شاخساره گیاه ذرت را در تیمار شاهد (۱/۳۷ گرم فسفر بر مترمربع) و بیش‌ترین آن را در تیمار اوره + هیومیک

جدول ۷- مقایسه میانگین‌های غلظت نیتروژن، فسفر، پتاسیم و نیترات شاخساره ذرت برای تیمارهای مختلف.

تیمار	نیتروژن (%)	فسفر (%)	پتاسیم (mg N kg ⁻¹ DM)	نیترات (mg N kg ⁻¹ DM)
شاهد	۱/۱۳ ^k	۰/۱۹۳ ⁱ	۱/۲۱ ^l	۱۳۴/۵ ^l
U ₁	۲/۶۱ ^d	۰/۱۹۹ ^h	۱/۸۰ ^{ef}	۲۵۷/۸ ^{fg}
U ₂	۲/۸۲ ^c	۰/۲۰۷ ^c	۲/۰۹ ^c	۳۱۳/۳ ^c
U ₃	۳/۱۸ ^a	۰/۲۱۰ ^d	۲/۳۲ ^b	۳۷۴/۵ ^a
HA ₁	۱/۱۸ ^{jk}	۰/۱۹۴ ⁱ	۱/۲۳ ^l	۱۴۸/۷ ^k
HA ₂	۱/۱۹ ^{jk}	۰/۱۹۸ ^h	۱/۴۱ ^k	۱۵۹/۰ ^k
HA ₃	۱/۲۸ ⁱ	۰/۲۰۱ ^g	۱/۴۶ ^j	۱۸۵/۴ ^j
U ₁ HA ₁	۱/۹۵ ^f	۰/۱۹۷ ^h	۱/۵۹ ⁱ	۲۴۹/۳ ^g

۲۶۶/۳ ^f	۱/۸۲ ^e	۰/۲۰۴ ^f	۲/۵۲ ^d	U ₂ HA ₂
۳۰۰/۱ ^d	۱/۹۹ ^d	۰/۲۱۴ ^b	۲/۸۱ ^e	U ₃ HA ₃
۲۰۸/۹ ⁱ	۱/۶۹ ^h	۰/۱۹۸ ^h	۱/۲۳ ^{ij}	NHA ₁
۲۲۴/۹ ^h	۱/۷۴ ^g	۰/۲۰۹ ^d	۱/۴۲ ^h	NHA ₂
۲۳۱/۵ ^h	۲/۰۶ ^c	۰/۲۱۲ ^c	۱/۶۰ ^g	NHA ₃
۲۳۵/۲ ^h	۱/۷۵ ^{fg}	۰/۲۰۳ ^f	۱/۹۱ ^f	U ₁ NHA ₁
۲۸۷/۰ ^c	۲/۰۵ ^c	۰/۲۱۲ ^c	۲/۵۹ ^d	U ₂ NHA ₂
۳۴۹/۱ ^b	۲/۴۰ ^a	۰/۲۱۷ ^a	۳/۰۴ ^b	U ₃ NHA ₃

اعداد دارای یک حرف لاتین مشترک با آزمون دانکن تفاوت معنادار ندارند ($p < 0.05$).

بیشترین و کمترین غلظت پتاسیم به ترتیب در تیمارهای U₃NHA₃ (۲/۴ درصد) و شاهد (۱/۲۱ درصد) مشاهده شد (جدول ۷). این یافته نشان می‌دهد که بهبود شرایط تغذیه‌ای گیاه از نظر نیتروژن، توانایی گیاه برای جذب پتاسیم را بیش از فسفر افزایش داده است. برای همانند فسفر، با افزایش سطح نیتروژن در تیمارها، درصد پتاسیم گیاه نیز افزایش پیدا کرد. به علاوه، میانگین غلظت پتاسیم در تیمارهای NHA بیش‌تر از تیمارهای HA بود. همچنین، میانگین غلظت پتاسیم در تیمارهای UNHA بیش‌تر از تیمارهای UHA بود. این مشاهدات می‌توانند ناشی از اثر منفی مصرف مقادیر بیش‌تر HA در مقایسه با NHA باشند. امینی و همکاران (۲۰۱۸) بیش‌ترین و کمترین غلظت پتاسیم برگ گیاه ذرت را در تیمار شاهد و تیمارهای تلفیقی اوره + هیومیک اسید استخراج شده از کمپوست بستر قارچ (به ترتیب حدود ۳/۵ و ۲/۳ درصد) گزارش کردند. به علاوه، آواد و همکاران (۲۰۱۴) بیش‌ترین مقدار جذب پتاسیم به وسیله گیاه ذرت (۱۰/۷۲ گرم پتاسیم بر متر مربع) را در تیمار اوره + هیومیک اسید مشاهده کردند که بسیار بیش‌تر از تیمار اوره (۷/۴۱ گرم پتاسیم بر مترمربع) و تیمار شاهد (۳/۸۷ گرم پتاسیم بر متر مربع) با کمترین مقدار جذب پتاسیم بود. ترتیب غلظت نیترات در شاخساره ذرت تقریباً مشابه ترتیب درصد نیتروژن بود (جدول ۷). در واقع، در تیمار U₃ بیش‌ترین (۳۱۳/۳ میلی‌گرم نیتروژن در کیلوگرم ماده خشک) و در تیمار شاهد کمترین (۱۳۴/۵ میلی‌گرم نیتروژن در کیلوگرم ماده خشک) غلظت نیترات مشاهده

شد. از سوی دیگر، تیمار تلفیقی U₃NHA₃ نسبت به تیمار U₃ و تیمارهای HA نسبت به تیمارهای NHA سبب تجمع کمتری از نیترات در شاخساره ذرت شدند. این نتایج با یافته‌های حقیقی و کافی (۲۰۱۰) مطابقت دارد که نشان دادند که با مصرف HA، تجمع نیترات در شاخساره گیاه کاهش یافت. به علاوه، نتایج جینگ و همکاران (۲۰۲۰) نشان دادند که با افزایش غلظت HA مقدار جذب نیتروژن در گیاه ذرت ابتدا افزایش و سپس کاهش یافت. کاکسو و همکاران (۲۰۰۰) نشان دادند که HA در بیان ژنی که کدکننده ناقل پروتئینی نیترات در ریشه است نقش دارد. کواگیوتی و همکاران (۲۰۰۴) نیز گزارش کردند که غلظت نیترات در برگ‌های گیاه ذرت تیمار شده با HA حدود ۵۰ درصد بیش‌تر از تیمار شاهد بود. با افزایش اسیدیته HA (فراوانی گروه‌های کربوکسیل) نقش آن در افزایش جذب نیترات به وسیله گیاه نیز می‌شود (پیکولو و همکاران ۱۹۹۲؛ کاکسو و همکاران ۲۰۰۰). در پژوهش حاضر نیز تیمارهای NHA با اسیدیته و گروه‌های کربوکسیل بیش‌تر نسبت به تیمارهای HA غلظت بالاتری از نیترات را در شاخساره ذرت نشان دادند.

اثر تیمارهای مختلف بر غلظت نیتروژن، فسفر، پتاسیم و نیترات در ریشه گیاه ذرت در جدول ۸ نشان داده شده است. بیش‌ترین و کمترین درصد نیتروژن به ترتیب در تیمارهای U₃ (۲/۱۶ درصد) و شاهد (۰/۹ درصد) مشاهده شد. همچنین، اختلاف معناداری بین تیمار شاهد و تیمارهای HA₁ و HA₂ وجود نداشت. به علاوه، پس از تیمار U₃ بیش‌ترین غلظت نیتروژن متعلق

به تیمار U_3NHA_3 بود. بیشترین درصدهای فسفر ($0/12$) در تیمار U_3NHA_3 و پتاسیم ($1/81$ درصد) نیز در تیمار U_3NHA_3 مشاهده شد ولی اختلاف آن‌ها با برخی دیگر از تیمارها معنادار نبود. همانند شاخصاره (جدول ۷)، در اینجا نیز با افزایش سطح تیمار نیتروژن، درصدهای فسفر و پتاسیم در ریشه افزایش یافتند (جدول ۸).

جدول ۸- مقایسه میانگین اثر تیمارهای مختلف بر غلظت نیتروژن، فسفر، پتاسیم و نیترات در ریشه ذرت.

تیمار	نیتروژن (%)	فسفر (%)	پتاسیم (mg N kg ⁻¹ DM)	نیترات
شاهد	$0/90^k$	$0/106^g$	$1/27^g$	$92/2^i$
U_1	$1/61^d$	$0/113^{c-f}$	$1/52^{cd}$	$237/1^{cd}$
U_2	$1/81^c$	$0/116^{a-d}$	$1/78^a$	$293/6^b$
U_3	$2/16^a$	$0/114^{b-e}$	$1/77^a$	$350/0^a$
HA_1	$0/90^{jk}$	$0/107^{fg}$	$1/32^f$	$101/6^{hi}$
HA_2	$1/04^{jk}$	$0/109^{efg}$	$1/64^{cd}$	$128/0^g$
HA_3	$0/90^i$	$0/110^{d-g}$	$1/51^b$	$203/3^c$
U_1HA_1	$1/25^f$	$0/111^{d-g}$	$1/41^e$	$160/0^f$
U_2HA_2	$1/60^d$	$0/116^{a-d}$	$1/54^c$	$239/0^{cd}$
U_3HA_3	$1/93^c$	$0/116^{a-d}$	$1/76^a$	$278/5^b$
NHA_1	$1/04^{ij}$	$0/108^{efg}$	$1/47^d$	$112/9^{gh}$
NHA_2	$1/11^h$	$0/109^{efg}$	$1/51^{cd}$	$161/8^f$
NHA_3	$1/18^g$	$0/113^{b-f}$	$1/56^c$	$225/8^d$
U_1NHA_1	$1/94^f$	$0/111^{abc}$	$1/52^{cd}$	$289/8^b$
U_2NHA_2	$1/63^d$	$0/120^{ab}$	$1/78^a$	$242/7^c$
U_3NHA_3	$1/94^b$	$0/122^a$	$1/81^a$	$338/7^a$

اعداد دارای یک حرف لاتین مشترک با آزمون دانکن تفاوت معنادار ندارند ($p < 0.05$).

تیمارهای آلی (HA و NHA) بود. نتایج توماسی و همکاران (۲۰۰۹) حاکی از افزایش جذب نیترات در ریشه در حضور مواد هیومیک بود.

به‌طور کلی، تیمار تلفیقی U_3NHA_3 در مقایسه با سایر تیمارهای کودی جذب و انتقال عناصر غذایی را در گیاه ذرت به میزان بیش‌تری بهبود بخشید که می‌تواند ناشی از ویژگی‌های برتر NHA نسبت به HA (پاتی و همکاران ۱۹۹۲)، افزایش کارایی مصرف نیتروژن کود اوره در حضور NHA (مازومدار و همکاران ۱۹۸۸) و کاهش مصرف هر دو کود (HA و اوره) باشد.

شاخص کلروفیل

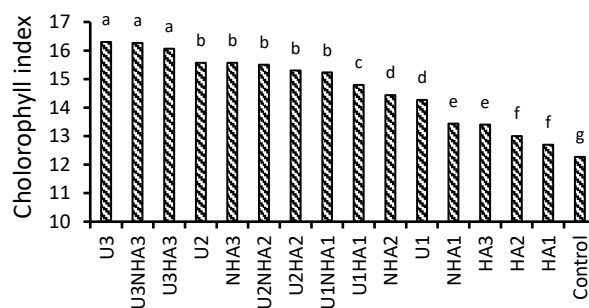
مقایسه میانگین‌ها (شکل ۲) نشان داد که بیش‌ترین شاخص کلروفیل مربوط به تیمار U_3 ($16/3$) بود که با تیمارهای U_3NHA_3 و U_3HA_3 اختلاف معناداری نداشت.

همچنین، سطوح مختلف تیمار NHA در مقایسه با سطوح مشابه در تیمار HA ، از درصد فسفر و پتاسیم بالاتری برخوردار بودند (به‌استثنای درصد پتاسیم در تیمارهای HA_3 و NHA_3). همچنین، نتایج نشان‌دهنده افزایش غلظت نیترات در ریشه با افزایش سطح تیمارهای کودی بود. بیش‌ترین غلظت نیترات ریشه مربوط به تیمار U_3 (350 میلی‌گرم نیتروژن در کیلوگرم ماده خشک) بود که با تیمار U_3NHA_3 ($238/7$ میلی‌گرم نیتروژن در کیلوگرم ماده خشک) تفاوت معناداری نداشت. کم‌ترین آن نیز در تیمار شاهد ($92/2$ میلی‌گرم نیتروژن در کیلوگرم ماده خشک) مشاهده شد که با تیمار HA_1 ($101/6$ میلی‌گرم نیتروژن در کیلوگرم ماده خشک) تفاوت معناداری نداشت. غلظت نیترات ریشه در تیمارهای ترکیب اوره با هیومیک اسید بیش‌تر از

شده است. داینینگ و همکاران (۲۰۱۲) گزارش کردند که HA دارای خاصیت شبه اکسینی بوده و از این رو سبب افزایش میزان کلروفیل در گیاه خیار می‌شود. به علاوه، HA سبب افزایش فعالیت آنزیم روبیسکو می‌شود که وجودش در واکنش‌های تاریکی فتوسنتز ضروری است (امینی و همکاران ۲۰۱۸). فررا و برونیتی (۲۰۱۰) نیز معتقدند که HA ساخت کلروفیل را افزایش داده و یا تخریب آن را به تأخیر می‌اندازد.

کم‌ترین شاخص کلروفیل نیز در تیمار شاهد (۱۲/۲۷) مشاهده شد. در همه تیمارها، با افزایش سطح تیمار، شاخص کلروفیل نیز افزایش پیدا کرد. با این حال، تیمارهای HA₁ و HA₂ اختلاف معناداری با هم نداشتند. همچنین، شاخص کلروفیل در سطوح مختلف تیمار NHA، ۱۱/۱ درصد بیشتر از تیمارهای HA بود.

اثرات مثبت کاربرد HA و نیتروژن (به تنهایی و توأم) بر افزایش محتوای کلروفیل برگ ذرت (امینی و همکاران ۲۰۱۸) و کینوا (عباس و همکاران ۲۰۱۳) گزارش

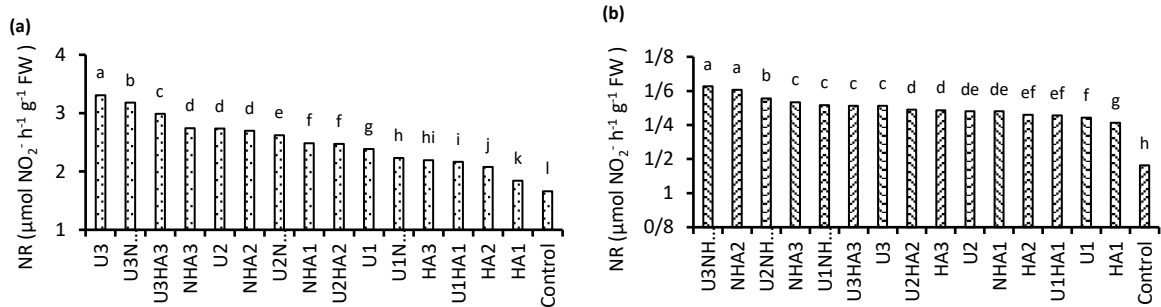


شکل ۲- اثر تیمارهای مختلف بر شاخص کلروفیل برگ. ستون‌های دارای یک حرف لاتین مشترک بر اساس آزمون دانکن تفاوت معنادار ندارند ($p < 0.05$).

(a). بیش‌ترین فعالیت این آنزیم در تیمارهایی مشاهده شد که بیش‌ترین غلظت نیترات را نشان دادند (جدول ۷). این موضوع توسط سایر پژوهشگران نیز گزارش شده است (کازتا و همکاران ۲۰۰۴؛ خان و همکاران ۲۰۱۹). بیش‌ترین و کم‌ترین فعالیت آنزیم نیترات ردوکتاز در ریشه ذرت به ترتیب ۱/۶۳ و ۱/۱۶ میکرومول نیتريت در گرم وزن تازه بافت در ساعت بود که در تیمارهای U₃NHA₃ و شاهد مشاهده شد (شکل ۳-ب). با این حال، فعالیت آنزیم در تیمار U₃NHA₃ تفاوت معناداری با تیمار NHA₂ نداشت. بر اساس گزارش‌ها، فعالیت آنزیم نیترات ردوکتاز ریشه یک شاخص مهم برای تعیین توانایی گیاه در همگون‌سازی^{۱۲} نیتروژن

فعالیت آنزیم نیترات ردوکتاز

اثر تیمارهای مختلف بر فعالیت آنزیم نیترات ردوکتاز شاخصاره و ریشه گیاه ذرت در شکل ۳ نشان داده شده است. بیش‌ترین و کم‌ترین فعالیت آنزیم در شاخصاره ذرت به ترتیب ۳/۳۱ و ۱/۶۶ میکرومول نیتريت در گرم وزن تازه بافت در ساعت بود که مربوط به تیمارهای U₃ و شاهد بودند (شکل ۳-ا). تیمار U₃NHA₃ بعد از تیمار U₃ بیش‌ترین فعالیت آنزیم نیترات ردوکتاز را دارا بود. نتایج کاکسو و همکاران (۲۰۰۰) نیز حاکی از فعالیت کم‌تر آنزیم نیترات ردوکتاز در تیمار هیومیک اسید نسبت به تیمار کود نیتروژن بود. به علاوه، فعالیت آنزیم در سطوح مختلف تیمار HA، کم‌تر از تیمارهای NHA بود (شکل ۳-۳).



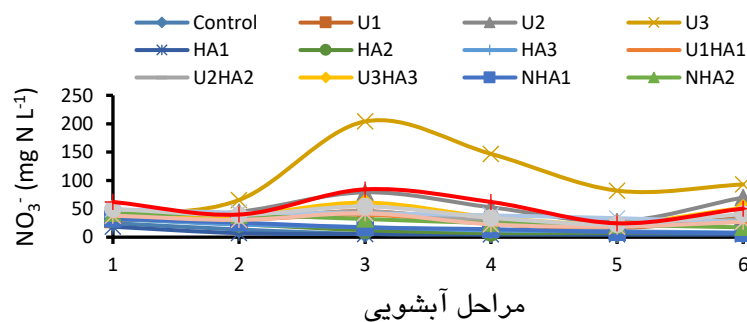
شکل ۳- اثر تیمارهای کودی مورد مطالعه بر فعالیت آنزیم نیترات ردوکتاز (NR) در شاخساره (a)، ریشه (b) ذرت. ستون‌های دارای یک حرف لاتین مشترک بر اساس آزمون دانکن تفاوت معنادار ندارند ($p < 0.05$).

بود که این موضوع توسط سایر پژوهشگران نیز گزارش شده است (کانلاس و همکاران ۲۰۱۳).

اثر تیمارهای کودی بر آبشویی نیترات

غلظت نیترات آبشویه در مراحل مختلف آبشویی گلدان‌ها برای تیمارهای مختلف در شکل ۴ نشان داده شده است. نتایج نشان داد که بیش‌ترین آبشویی نیترات ($203/9 \text{ mg N L}^{-1}$) در تیمارهای حاوی اوره بود و با افزایش سطح نیتروژن در تیمار بر غلظت نیترات آبشویه نیز افزوده شد. به‌طوری‌که با چهار برابر شدن سطح نیتروژن، غلظت نیترات در آبشویه ۳/۵ برابر شد. به‌طور مشابهی، لیانگ و همکاران (۲۰۱۱) افزایش غلظت نیترات در آبشویه با افزایش سطح نیتروژن کود اوره مصرفی را گزارش کردند.

است (تقوی و بابالار، ۲۰۰۷) و با توجه به شکل ۳-۲ می‌توان نتیجه‌گیری کرد که به‌طور کلی NHA و HA سبب افزایش فعالیت این آنزیم در ریشه ذرت شدند. این امر نشان‌دهنده نقش این مواد در تبدیل سریع نیترات به آمونیوم و ممانعت از تجمع آن در گیاه است (حقیقی و کافی ۲۰۱۰). هرناندز و همکاران (۲۰۱۵) و خان و همکاران (۲۰۱۹) نیز افزایش فعالیت آنزیم نیترات ردوکتاز با کاربرد HA را گزارش کردند. در واقع، HAها بر آنزیم‌های دخیل در متابولیسم نیتروژن و ساخت پروتئین اثر داشته (حقیقی و همکاران ۲۰۱۲) و با بهبود فراهمی عناصر غذایی، ارتقای فعالیت H^+ -ATPase (کانلاس و همکاران ۲۰۱۳) و جذب نیترات (خان و همکاران ۲۰۱۹) سبب افزایش فعالیت آنزیم نیترات ردوکتاز می‌شوند. در مجموع، میانگین فعالیت آنزیم نیترات ردوکتاز در ریشه ۴/۴ درصد کمتر از شاخساره



شکل ۴- غلظت نیترات در آبشویه تیمارهای مختلف در فواصل زمانی متفاوت.

در مقابل، تیمارهای فاقد اوره (HA و NHA) کمترین میزان آبشویی نیترات را داشتند. میانگین آبشویی نیترات در تیمارهای U، ۳ برابر این تیمارها بود. از سوی دیگر، میانگین غلظت نیترات در آبشویه تیمار تلفیقی U_3NHA_3 نسبت به تیمار U_3 حدود ۴۸/۷ درصد کمتر بود. این نتایج با یافته‌های ژانگ و همکاران (۲۰۱۹) مطابقت دارد که نشان دادند تیمار تلفیقی اوره-هیومیک اسید 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 شی و همکاران (۲۰۱۹) حاکی از کاهش درصد تلفات نیترات با استفاده از کود کندهای بیوچار-اوره نسبت به کود اوره برای گیاه ذرت بود؛ به‌طوری‌که آبشویی نیترات در تیمار اوره بیش از ۷۰ درصد و در تیمار بیوچار-اوره تنها ۳۹ درصد بود.

نتیجه‌گیری کلی

نتایج این پژوهش نشان داد که تیمارهای هیومیک اسید غنی‌شده با نیتروژن نسبت به تیمارهای هیومیک

اسید صفات زراعی و جذب و انتقال عناصر غذایی را در گیاه ذرت به‌طور معناداری افزایش دادند. به‌علاوه، استفاده از کود تلفیقی اوره-هیومیک اسید غنی‌شده با نیتروژن نسبت به اوره علاوه بر افزایش برخی ویژگی‌های موفولوژیک گیاه ذرت، فعالیت آنزیم نیترات ردوکتاز در ریشه و جذب و انتقال عناصر غذایی فسفر و پتاسیم را به‌طور معناداری افزایش داد. همچنین، در مورد شاخص کلروفیل نیز اختلاف معناداری بین این دو مشاهده نشد. علاوه‌براین، میزان آبشویی نیترات در تیمار اوره-هیومیک اسید غنی‌شده با نیتروژن در مقایسه با تیمار اوره به حدود نصف کاهش یافت. یافته‌های این پژوهش نشان داد که استفاده از کود اوره-هیومیک اسید غنی‌شده با نیتروژن نه‌تنها می‌تواند نیتروژن گیاه را تأمین کند، بلکه قادر است آبشویی نیترات را نیز به‌طور قابل توجهی کاهش دهد و از این طریق کارایی مصرف نیتروژن را افزایش دهد. هرچند لازم است که با انجام پژوهش‌های بیشتر تأثیر این تیمار کودی بر سایر ویژگی‌های مورفولوژیک و فیزیولوژیک به‌ویژه در سایر گیاهان و خاک‌ها نیز بررسی شود.

منابع مورد استفاده

- Abbas T, Ahmad S, Ashraf M, Shahid MA, Yasin M, Balal RM, Pervez MA and Abbas S, 2013. Effect of humic and application at different growth stages of Kinnow mandarin (*Citrus reticulata*, Blanco) on the basis of physio-biochemical and reproductive responses. *Academia Journal of Biotechnology* 1(1):14-20.
- Akimbekov N, Qiao X, Digel I, Abdieva G and Ualieva P, 2020. The effect of leonardite-derived amendments on soil microbiome structure and potato yield. *Agriculture* 10(5):147.
- Allison LE and Moodie CD, 1965. Carbonate. Pp. 1379-1396. In: Black CA (ed.). *Methods of Soil Analysis: Part 2. Chemical and Microbiological Properties*. American Society of Agronomy, Madison.
- Almendros G and Dorado J, 1999. Molecular characteristics related to the biodegradability of humic acid preparations. *European Journal of Soil Science* 50:227-236.
- Amini B, Farahbakhsh M and Kianirad M, 2018. Study on the effects of humic acid-urea fertilizers application on some agronomic characteristics of maize (*Zea mays* L.). *Journal of Water and Soil* 37(2):333-352. (In Persian with English abstract)
- Aminifard MH, Aroiee H, Fatemi H, Ameri A and Karimpour S, 2010. Responses of eggplant (*Solanum melongena* L.) to different rates of nitrogen under field condition. *Journal of Central European Agriculture* 11(4):453-458.
- Anonymous, 2019. FAO, World Fertilizer Trends and Outlook to 2022: Summary Report.
- ASTM Standard D3174-11, 2011. Annual Book of ASTM Standards. Test method for ash in the analysis sample of coal and coke. West Conshohocken.
- Awaad MS, El-Shiekh GF and Elsis SEM, 2014. Effect of slow-release nitrogen fertilizers on maize plants grown on new reclaimed soil. *Fayoum Journal of Agricultural Research and Development* 28(2):25-34.

- Azeem K, Shah S, Ahmad N, Shah ST, Khan F, Arafat Y, Naz F, Azeem I and 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.
- Bashir N, Malik SA, Mahmood S and Athar M, 2012. Influence of urea application on growth, yield and mineral uptake in two corn (*Zea mays* L.) cultivars. *African Journal of Biotechnology* 11(46):10494-10503.
- Bashirifar N, Aliasgharzad N and Zehtab Salmasi S, 2016. Effects of nitrogen on growth and some morphological traits of inoculated savory plant (*Satureja hortensis* L.) with *Azospirillum irakense* and *Pseudomonas putida*. *Water and Soil Science* 26(1-2):79-91. (In Persian with English abstract)
- Black AS and Waring SA, 1978. Nitrate determination in an oxisol using K_2SO_4 extraction and the nitrate-specific ion electrode. *Plant and Soil* 49:207-211.
- Boral P, Varma AK and 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* 8:1034-1053.
- Cacco G, Attinà E, Gelsomino A and 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.
- Canellas LP, Balmori DM, Médici LO, Aguiar NO, Campostrini E, Rosa RC, Façanha AR and Olivares FL, 2013. A combination of humic substances and *Herbaspirillum seropedicae* inoculation enhances the growth of maize (*Zea mays* L.). *Plant and Soil* 366: 119-132.
- Cataldo DA, Maroon M, Schrader LE and Youngs VL, 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.
- Cazetta JO and Villela LCV, 2004. Nitrate reductase activity in leaves and stems of tanner grass (*Brachiaria radicans* Napper). *Scientia Agricola* 61:640-648.
- Chapman HD, 1965. Cation exchange capacity. Pp. 891-901. In: Black CA (ed.). *Methods of Soil Analysis*. Soil Science Society of America, Madison.
- Cheng G, Niu, Z, Zhang C, Zhang X and Li X, 2019. Extraction of humic acid from lignite by KOH-hydrothermal method. *Applied Sciences* 9(7):1356-1369.
- Cottenie A, 1980. *Soil and Plant Testing as a Basis of Fertilizer Recommendations*. FAO. Soils Bulletin, Belgium.
- Da-Bing X, Qiu-Jun WA, Yun-Cheng WU, Guang-Hui YU, Qi-Rong SH and Huang QW, 2012. Humic-like substances from different compost extracts could significantly promote cucumber growth. *Pedosphere* 22(6):815-824.
- Dong L and Yuan H, 2009. Nitrogen incorporation into lignite humic acids during microbial degradation. *Geomicrobiology Journal* 26(7):484-490.
- Eyheraguibel B, Silvestre J and Morard P, 2008. Effects of humic substances derived from organic waste enhancement on the growth and mineral nutrition of maize. *Bioresource Technology* 99(10):4206-4212.
- Fan MX and Mackenzie AF, 1995. The toxicity of banded urea to corn growth and yield as influenced by triple superphosphate. *Candian Journal of Soil Science* 75:117-122.
- Fatima N, Jamal A, Huang Z, Liaquat R, Ahmad B, Haider R and Sillanpää M, 2021. Extraction and chemical characterization of humic acid from nitric acid treated lignite and bituminous coal samples. *Sustainability* 13: 8969.
- Ferrara G and 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.
- Gavlak RG, Horneck DA and Miller RO, 2005. *Plant, Soil and Water Reference Methods for the Western Region*. Western Regional Extension Publication 125, University of Alaska, Fairbanks.
- Gee GW and Or D, 2002. Particle size analysis. Pp. 255-293. In: Dane JH and Topp GC (eds). *Methods of Soil Analysis: Part 4. Physical Methods*. Soil Science Society of America, Madison.
- Ghaibi MN, Asadi F and Tehrani MM, 2013. Guidelines for integrated management of soil fertility and corn nutrition. Soil and Water Research Institute. 48 Page. (In Persian with English abstract)
- Haghighi M and Kafi M, 2010. Effect of humic acid on the accumulation of cadmium, nitrate and nitrate reductase activity in lettuce. *Journal of Horticultural Science* 24(1):53-58. (In Persian with English abstract)
- Haghighi M, Kafi M and Fang P, 2012. Photosynthetic activity and N metabolism of lettuce as affected by humic acid. *International Journal of Vegetable Science* 18(2):182-189.
- Hättenschwiler S and Vitousek PM, 2000. The role of polyphenols in terrestrial ecosystem nutrient cycling. *Trends in Ecology & Evolution* 15(6):238-243.

- Helmek PA and Sparks D, 1996. Lithium, sodium, potassium, rubidium and cesium. Pp. 551-575. In: Sparks DL (ed.). Methods of Soil Analysis: Part 3. Chemical Methods. Soil Science Society of America, Madison.
- Hernandez OL, Calderín A, Huelva R, Martínez-Balmori D, Guridi F, Aguiar NO, Olivares FL and Canellas LP, 2015. Humic substances from vermicompost enhance urban lettuce production. *Agronomy for Sustainable Development* 35(1):225-232.
- Jones JB, 2001. Laboratory Guide for Conducting Soil Tests and Plant Analysis. CRC press, New York.
- Ju KS and Parales RE, 2010. Nitroaromatic compounds, from synthesis to biodegradation. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 74:250-272
- Kalaichelvi K, Chinnusamy C and Swaminathan AA, 2006. Exploiting the natural resource-lignite humic acid in agriculture-a review. *Agricultural Reviews* 27(4):276-283.
- Keeney DR and Nelson DW, 1982. Nitrogen: inorganic forms. Pp. 643-698. In: Page AL, Miller RH and Keeney DR (eds). Methods of Soil Analysis: Part 2. Chemical and Microbiological Properties. Soil Science Society of America, Madison.
- Khan HZ, Iqbal S, Akbar N, Saleem MF and Iqbal A, 2013. Integrated management of different nitrogen sources for maize production. *Pakistan Journal of Agricultural Sciences* 50:55-61.
- Khan SA, Khan SU, Qayyum A, Gurmani AR, Khan A, Khan S, Ahmed W, Mehmood A and Amin BAZ, 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.
- Klute A and Dirksen C, 1986. Hydraulic conductivity and diffusivity: laboratory methods. Pp. 687-734. In: Klute A (ed.). Method of Soil Analysis: Part 1. Physical and Mineralogical Methods. Soil Science Society of America, Madison.
- Kuo S, 1996. Phosphorus. Pp. 869-919. In: Sparks DL, Page AL, Helmke PA, Loeppert RH, Soltanpour PN, Tabatabai MA, Johnston CT and Sumner ME (eds). Methods of Soil Analysis: Part 3 Chemical Methods. Soil Science society of America, Madison.
- Liang XQ, Xu L, Li H, He MM, Qian YC, Liu J, Nie ZY, Ye YS and 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.
- Liang ZC, Cheng SX and Wu L, 1999. Study on mechanism of interaction between coal humic acid and urea. *Journal of Fuel Chemistry and Technology* 27(2):176-181.
- Lu J, Hu T, Zhang B, Wang L, Yang S, Fan J, Yan S and Zhang F, 2021. Nitrogen fertilizer management effects on soil nitrate leaching, grain yield and economic benefit of summer maize in Northwest China. *Agricultural Water Management* 247, 106739.
- Luo Y, Liang J, Zeng G, Chen M, Mo D, Li G and Zhang D, 2018. Seed germination test for toxicity evaluation of compost: Its roles, problems and prospects. *Waste Management* 71:109-114.
- Maheswari M, Murthy ANG and Shanker AK, 2017. Nitrogen nutrition in crops and its importance in crop quality. Pp. 175-186. In: Abrol YP, Adhya TK, Aneja VP, Raghuram N, Pathak H, Kulshrestha U, Sharma CH and Singh B (eds). The Indian Nitrogen Assessment. Elsevier.
- Malcolm RE and Vaughan D, 1979. Effects of humic acid fractions on invertase activities in plant tissues. *Soil Biology and Biochemistry* 11(1):65-72.
- Mariano E, de Sant Ana Filho CR, Bortoletto-Santos R, Bendassolli JA and Trivelin PC, 2019. Ammonia losses following surface application of enhanced-efficiency nitrogen fertilizers and urea. *Atmospheric Environment* 203:242-251.
- Mazumdar BK., Basu SK and Kumar S, 1988. Urea-coal acids combination fertiliser: some recent developments. *Urja (India)* 23(5):383-385.
- Muscolo A and Sidari M, 2009. Carboxyl and phenolic humic fractions affect *Pinus nigra* callus growth and metabolism. *Soil Science Society of America Journal* 73(4):1119-1129.
- Nasir S, Sarfaraz TB, Verheyen TV and Chaffee AL, 2011. Structural elucidation of humic acids extracted from Pakistani lignite using spectroscopic and thermal degradative techniques. *Fuel Processing Technology* 92:983-991.
- Naz MY and Sulaiman SA, 2016. Slow release coating remedy for nitrogen loss from conventional urea: a review. *Journal of Controlled Release* 225:109-120.

- Nelson DW and Sommers LE, 1996. Total Carbon, Organic Carbon, and Organic Matter. Pp. 961-1010. In: Sparks DL, Page AL, Helmke PA, Loeppert RH, Soltanpour PN, Tabatabai MA, Johnston CT and Sumner ME (eds). Methods of Soil Analysis: Part 3 Chemical Methods. Soil Science Society of America, Madison.
- Ozkan S and Ozkan SG, 2017. Investigation of humate extraction from lignites. International Journal of Coal Preparation and Utilization 37:285-292.
- Patti AF, Verheyen TV, Douglas L and Wang X, 1992. Nitrohumic acids from Victorian brown coal. Science of the Total Environment 113(1-2):49-65.
- Piccolo A, Nardi S and 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.
- Quaggiotti S, Ruperti B, Pizzeghello D, Francioso O, Tugnoli V and 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.
- Raina JN and Goswami KP, 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.
- Rietra RP, Heinen M, Dimkpa CO and Bindraban PS, 2017. Effects of nutrient antagonism and synergism on yield and fertilizer use efficiency. Communications in Soil Science and Plant Analysis 48(16):1895-1920.
- Riley JP and 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 36:161-168.
- Sharif M, Khattak RA and Sarir MS, 2002. Effect of different levels of lignitic coal derived humic acid on growth of maize plants. Communications in Soil Science and Plant Analysis 33(19-20):3567-3580.
- Shi W, Ju Y, Bian R, Li L, Joseph S, Mitchell DR, Munroe P, Taherymoosavi S and Pan G, 2020. Biochar bound urea boosts plant growth and reduces nitrogen leaching. Science of the Total Environment 701:134424.
- Stewart GR, Lee JA, Orebanjo TO, 1973. Nitrogen metabolism of halophytes II. Nitrate availability and utilization. New Phytologist 72(3):539-546.
- Swift RS, 1996. Organic matter characterization. Pp. 1011-1069. In: Sparks DL, Page AL, Helmke PA, Loeppert RH, Soltanpour PN, Tabatabai MA, Johnston CT and Sumner ME (eds). Methods of Soil Analysis: Part 3. Chemical Methods. Soil Science Society of America, Madison.
- Syahren AM and Wong NC, 2008. Extraction and chemical characteristics of nitro-humic acids from coals and composts. Journal of Tropical Agriculture and Food Science 36:269-279.
- Taghavi TS and 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.
- Thorn KA and Cox LG, 2016. Nitrosation and nitration of fulvic acid, peat and coal with nitric acid. Plos One 11(5): p.e0154981.
- Tomasi N, Monte R, Rizzardo C, Venuti S, Zamboni A, Cesco S, Pinton R and 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.
- Trenkel ME, 2010. Slow- and Controlled Release and Stabilized Fertilizers: An Option for Enhancing Nutrient Use Efficiency in Agriculture. International Fertilizer Industry Association. Paris.
- Uzoma KC, Inoue M, Andry H, Fujimaki H, Zahoor A and Nishihara E, 2011. Effect of cow manure biochar on maize productivity under sandy soil condition. Soil Use and Management 27(2):205-212.
- Van Vuuren JJ and Claassens AS, 2009. Greenhouse pot trials to determine the efficacy of black urea compared to other nitrogen sources. Communications in Soil Science and Plant Analysis 40(1-6):576-586.
- Vendrell PF and Zupancic J, 1990. Determination of soil nitrate by transnitration of salicylic acid. Communications in Soil Science and Plant Analysis 21:1705-1713.
- Waling I, Van Vark W, Houba VJG and Van der Lee JJ, 1989. Soil and plant analysis, a series of syllabi: Part 7. Plant Analysis Procedures. Wageningen Agriculture University.
- Wang C, Luo D, Zhang X, Huang R, Cao Y, Liu G, Zhang Y and Wang H, 2022a. Biochar-based slow-release of fertilizers for sustainable agriculture: A mini review. Environmental Science and Ecotechnology 10,100167.
- Wang D, Chen X, Tang Z, Liu M, Jin R, Zhang A and Zhao P, 2022b. Application of humic acid compound fertilizer for increasing sweet potato yield and improving the soil fertility. Journal of Plant Nutrition 45(13):1933-1941.
- Westerman RL, 1990. Soil Testing and Plant Analysis. Soil Science Society of America. Madison.

- Zhang SQ, Yuan L, Li W, Lin ZA, LI YT, Hu SW and Zhao BQ, 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.
- Zhang X, 2017. A plan for efficient use of nitrogen fertilizers. *Nature* 543(7645):322-323.
- Zheng J, Mmari WN, Nishigaki T and Funakawa S, 2018. Nitrogen availability to maize as affected by fertilizer application and soil type in the Tanzanian highlands. *Nutrient Cycling in Agroecosystems* 112(2):197-213.