



دانشگاه گوارن کوهستان

نشریه پژوهش‌های تولید گیاهی

جلد بیست و سوم، شماره اول، ۱۳۹۵

<http://jopp.gau.ac.ir>

## اثر کودهای آلی و اسید سالیسیلیک بر عملکرد و برخی متابولیت‌های ثانویه گیاه دارویی بادرنجبویه (*Melissa officinalis* L.)

\*کیانوش حسن‌زاده<sup>۱</sup>، خدایار همتی<sup>۲</sup> و مهدی علیزاده<sup>۲</sup>

<sup>۱</sup>دانش‌آموخته کارشناسی ارشد گیاهان دارویی، گروه علوم باغبانی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان،

<sup>۲</sup>دانشیار، گروه علوم باغبانی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۱/۲۶؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۵/۱۲

### چکیده

**سابقه و هدف:** بادرنبویه گیاهی دارویی است که اسانس آن کاربرد فراوانی در صنایع دارویی، غذایی و بهداشتی داشته و همچنین دارای ترکیب اسید رزمارینیک (RA) می‌باشد که امروزه بر علیه ویروس HIV1 و درمان بیماری ایدز مورد استفاده قرار می‌گیرد. این پژوهش به منظور بررسی اثر کودهای آلی (کود گاوی، گوسفندی، ورمی‌کمپوست و خاکبرگ) و محلول‌پاشی با اسیدسالیسیلیک (SA) در غلظت‌های مختلف بر عملکرد و برخی متابولیت‌های ثانویه گیاه دارویی بادرنبویه انجام شد.

**مواد و روش‌ها:** آزمایش به صورت گلخانه‌ای در قالب فاکتوریل بر پایه طرح بلوک‌های کامل تصادفی در سه تکرار اجرا شد. متغیرهای اندازه‌گیری شده شامل وزن تر و خشک اندام هوایی، درصد اسانس، اجزای اسانس، میزان اسید رزمارینیک (RA) و فعالیت آنتی‌اکسیدانی بود. شناسایی اجزای اسانس توسط کروماتوگرافی گازی متصل به طیف‌سنج جرمی (GC/MS)، میزان اسید رزمارینیک توسط کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC) و فعالیت آنتی‌اکسیدانی به وسیله اسپکتروفتومتر انجام گرفت.

\*مسئول مکاتبه: [Medicinalplants7@gmail.com](mailto:Medicinalplants7@gmail.com)

### نشریه پژوهش‌های تولید گیاهی (۲۳)، شماره (۱) ۱۳۹۵

---

**یافته‌ها:** نتایج نشان داد اثر کودهای آلی و اسیدسالیسیلیک بر درصد اسانس، میزان اسید رزمارینیک و فعالیت آن‌تی‌اکسیدانی معنی‌دار بود. بر اساس نتایج مقایسه میانگین‌ها، بیشترین درصد اسانس (۰/۵۳۶) در اثر متقابل کود گاوی و غلظت  $10^{-2}$  مولار SA و کمترین مقدار آن (۰/۲۰۳) مربوط به تیمار کودهای گاوی و گوسفندی بدون کاربرد SA اختصاص داشت. نتیجه تجزیه اسانس نشان داد که سیترال (E&Z) با ۶۱/۸۸ درصد بیشترین جزء اسانس را دارا بود. بیشترین میزان RA در بستر محتوی کود گوسفندی و کاربرد SA در غلظت  $10^{-4}$  مولار (۲۹/۴۷ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک) و کمترین میزان آن (۱۴/۳۳ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک) در تیمار شاهد بدون کاربرد اسیدسالیسیلیک تولید گردید.

**نتیجه‌گیری:** در مجموع نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد که استفاده از کودهای آلی و اسیدسالیسیلیک می‌تواند نقش مؤثری در افزایش عملکرد و تولید متابولیت‌های ثانویه در گیاه دارویی بادرنجبویه داشته باشد.

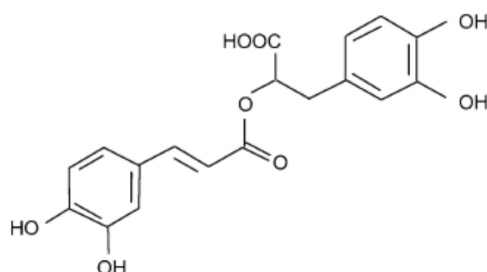
**واژه‌های کلیدی:** اسانس، اسید رزمارینیک، بادرنجبویه، GC/MS, HPLC

## مقدمه

گیاهان دارویی و ادویه‌ای از گیاهان اقتصادی مورد استفاده بشر می‌باشند که مواد بیوشیمیایی مخصوص و فعال مفیدی را با مقادیر بسیار کم در خود ذخیره می‌کنند (۳۷). از اواسط قرن بیستم به دنبال مشخص شدن عوارض سوء ناشی از مصرف داروهای شیمیایی، گیاهان دارویی و داروهای گیاهی در بسیاری موارد جایگزین داروهای شیمیایی شدند. مطابق برآورد سازمان بهداشت جهانی (WHO) ۸۰ درصد مردم دنیا برای مراقبت‌های بهداشتی اولیه به‌طور سنتی به گیاهان دارویی و تولیدات طبیعی وابستگی و تمایل دارند (۱۰). نیاز روزافزون کارخانه‌های داروسازی به ماده اولیه و لزوم حفظ منابع طبیعی گیاهی، اهمیت مطالعه روی کشت و فرآوری گیاهان دارویی و معطر را دو چندان کرده است (۳۸).

بادرنجبویه با نام علمی (*Melissa officinalis L.*) از خانواده نعنائیان، گیاهی علفی، چند ساله با ساقه چهار گوش به ارتفاع ۶۰-۴۰ cm می‌باشد. دامنه پراکنش این گونه شرق و جنوب اروپا، منطقه مدیترانه، آناتولی، عراق، ترکمنستان، پاکستان، قفقاز، پامیر و ایران است. در ایران پراکنش آن در جنوب دریای کاسپین (جنگل گلستان، گنبدکاووس، تالش)، آذربایجان (حسن بگلو)، غرب (بیشه لرستان، کرمانشاه و ریجاب) و تهران (ارتفاعات توچال، پس‌قله، بین کرج و قزوین) می‌باشد (۱۹). کل اندام هوایی بادرنجبویه دارای عطر ویژه (رایحه لیمو) است. از خواص درمانی آن می‌توان اثرات آرام بخشی، درمان ناراحتی‌های عصبی، درمان بیماری آلزایمر، بیماری‌های معده، قلبی، روده‌ای، طعم‌دهنده غذا، بهبود هضم، در تهیه داروهای نیروزا و ضد تبخال را نام برد. مقدار اسانس در گونه‌های مختلف متفاوت و بین ۰/۵-۰/۲ درصد است. مهمترین ترکیبات تشکیل دهنده اسانس شامل سیترال، سیترونال، ژرانیول، لینالول و استات اوگنول می‌باشد. همچنین دارای متابولیت‌های ثانویه دیگری شامل: اسید رزمارینیک، تانن و فلاونوئید می‌باشد (۳۷). اسید رزمارینیک (RA)، به فرمول شیمیایی ( $C_{18}H_{16}O_8$ )، وزن مولکولی ۳۶۰/۳ گرم بر مول و نقطه جوش ۱۷۵-۱۷۱ سانتی‌گراد، یک ترکیب فنلی است (شکل ۱). RA، استر کافئیک‌اسید و ۳،۴-دی هیدروکسی فنیل لاکتیک اسید می‌باشد (۴۱). RA دارای خواص زیستی متعددی مانند: خاصیت ضد ویروسی، ضدباکتریایی، ضدتب و آنتی‌اکسیدانی می‌باشد. RA حتی از ویتامین E نیز دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانی بیشتری است و باعث کاهش

آسیب‌های ناشی از فعالیت رادیکال‌های آزاد می‌شود. گزارش‌های از اثرات ضدویروس ایدز این ترکیب نیز منتشر شده است (۳۳، ۱۲). علاوه بر خواص دارویی RA، این ترکیب در گیاه از اجزایی است که با تجمع خود وظیفه دفاعی در برابر عوامل نامساعد محیطی را بر عهده دارد (۳۹). با توجه به این‌که ترکیب‌های موجود در گیاه دارویی بادرنجبویه دارای خواص متعدد درمانی، بهداشتی و غذایی بوده و بعضی از این ترکیبات (اسانس)، در گیاه به‌میزان کمی تولید می‌گردند، باید سعی شود ضمن افزایش زیست‌توده، موجب افزایش تولید آن‌ها در گیاه را فراهم نمود.



شکل ۱- ساختار شیمیایی اسید رزمارینیک (RA).

Figure 1. Chemical structure of rosmarinic acid (RA).

امروزه کاربرد نهاده‌های بهبود دهنده ساختمان خاک نظیر انواع کود دامی، زیستی و شیمیایی، در افزایش عملکرد محصولات زراعی و تولید محصولات از اهمیت خاصی برخوردار است. با توجه به این‌که برقراری رابطه صحیح آب، خاک و گیاه سبب بهبود تولید محصولات زراعی خواهد شد، بنابراین با تغییر روش مدیریت حاصلخیزی خاک، تولیدات کشاورزی و پایداری بوم‌نظام نیز تحت تأثیر قرار می‌گیرد (۱۱). از سویی کشت گیاهان در نظام کشاورزی مبتنی بر مصرف بی‌رویه سموم و کودهای شیمیایی و تأکید بیش از حد بر افزایش تولیدات ضمن بر هم زدن توازن و تعادل بوم‌نظام طبیعی و زراعی و کاهش حاصلخیزی خاک، موجب شده تا بر به‌کارگیری روش‌های کشاورزی پایدار بیشتر توجه شود (۴۳). کودهای دامی، کاه و کلش و تولیدات دیگری که اغلب در مزارع دیگر به‌عنوان ضایعات در نظر گرفته می‌شوند، در مزارع بر پایه کشت ارگانیک به‌عنوان منابع غذایی و مواد آلی ارزش پیدا می‌کنند و کشاورزان با بازیافت این مواد زائد مقدار ضایعات را کاهش می‌دهند (۲۹). اگر چه ترکیبات اسانس و معطر در برخی گیاهان دارویی در خاک‌های فقیر بیشتر است، ولی اغلب گیاهان

دارویی و ادویه‌ای برای رشد ایده‌آل به خاک‌های حاصلخیز با زهکشی خوب نیاز دارند، که برای حاصلخیزی خاک می‌توان از کودهای آلی بهره جست، که افزون بر افزایش باروری خاک، به نگهداری بیشتر رطوبت در خاک نیز کمک می‌نماید (۱۶). محققین گزارش نمودند که افزودن ترکیبات آلی مختلف به خاک باعث بهبود در عملکرد، رشد و ترکیبات شیمیایی گیاهان دارویی و معطر نعنای فلفلی (*Mentha piperita L.*)، رزماری (*Rosmarinus officinalis L.*) و سیدریتیس (*Sideritis montana*) گردیدند (۴۸، ۲۷، ۱۴). طبق گزارش عزیز و همکاران (۲۰۰۸)، کاربرد ورمی‌کمپوست به‌عنوان یک کود آلی بر صفات وزن خشک گل و ارتفاع بوته بابونه آلمانی رقم گورال (*Matricaria recutita C.V. Goral*) معنی‌دار بود، ولی بر اسانس گیاه تأثیری نداشت (۶). طی آزمایشی مشخص گردید که گوجه‌فرنگی‌های کشت شده به‌صورت ارگانیک حاوی سطح بالاتری از فلاونوئیدهای مفید (کوئرستین و کامفرول اگلیکون) بودند (۳۴). نتایج تحقیقی نشان داد که کاربرد کودهای آلی در گیاه رازیانه (*Foeniculum vulgare Mill*) سبب افزایش عملکرد اسانس تولیدی شد (۳۵). سانچزگووین و همکاران (۲۰۰۵)، در تحقیقی روی دو گیاه دارویی بابونه و همیشه بهار (*Calendula officinalis L.*)، اثر کودهای زیستی را مورد بررسی قرار دادند، نتایج نشان داد که کاربرد این کودها باعث افزایش عملکرد گل در آن‌ها گردید (۴۶). همچنین در مطالعه دیگری روی گیاه دارویی نعنای (*Mentha spicata L.*) مشخص شد که مصرف ۱۰ درصد ورمی‌کمپوست باعث افزایش ارتفاع بوته و میزان کلروفیل در مقایسه با گیاهان شاهد گردید (۲۸). ویلدووا و همکاران (۲۰۰۶)، در آزمایشی روی بابونه آلمانی، در مقایسه بین کشت ارگانیک با کشت رایج نشان دادند که مقدار اسانس و همچنین بیشترین کامازولن، آلفا بیسابولول، بیسابولول اکسید A و فلاونوئیدها از کشت ارگانیک حاصل شد (۵۰). احمدیان و همکاران (۲۰۰۷)، در گیاه زیره سبز نشان دادند که مصرف کود دامی باعث افزایش میزان کومین آلدئید، پاراسیمن، و میرسن موجود در اسانس آن شد (۱).

تنش‌های زنده و غیر زنده باعث ایجاد واکنش‌های دفاعی ویژه‌ای در اندام‌های گیاهی می‌گردند که در طی روند تکامل گیاه گسترش می‌یابد. علاوه بر مکانیسم‌های دفاعی ساختاری، مکانیسم‌های شیمیایی نیز در پاسخ به تنش‌ها صورت می‌گیرد، که پس از انجام یک سری واکنش‌ها، تولید متابولیت‌های ثانویه را موجب می‌گردد (۴۰). اسید سالیسیلیک یا اورتو هیدروکسی بنزوئیک اسید، از ترکیبات فنلی می‌باشد که در تعداد زیادی از گیاهان وجود دارد، این ترکیب به‌عنوان ماده‌ای هورمونی شناخته شده و نقش اساسی در تنظیم فعالیت‌های فیزیولوژیکی مختلف مانند رشد، تکامل گیاه، جذب

یون، فتوستنز و جوانه‌زنی بذور تحت تنش‌های شوری و خشکی نشان داده شده است (۲۲، ۱۵، ۲۵). نتایج حاصل از آزمایش‌ها نشان می‌دهد که غلظت‌های مختلف اسیدسالیسیلیک و مدت زمان تأثیرگذاری آن، واکنش‌های متعددی را در گیاهان ایجاد می‌نماید و در زمینه تأثیر آن بر متابولیت‌های ثانویه گیاهان دارویی می‌تواند تولید متابولیت‌های ثانویه را به‌عنوان یک الیستور<sup>۱</sup> (محرک تولید متابولیت ثانویه) در گیاه را موجب گردد. استفاده از الیستورها روش مناسبی برای افزایش سطح تولید متابولیت‌های ثانویه در گیاهان دارویی می‌باشند و نقش مهمی در چرخه تولید متابولیت‌های ثانویه ایفاء می‌کنند (۴۰، ۳).

با توجه به این‌که محصول زراعی یک گیاه دارویی زمانی از نظر اقتصادی مقرون به صرفه خواهد بود که در کنار افزایش زیست‌توده، میزان متابولیت‌های ثانویه آن نیز به حد مطلوب رسیده باشد، می‌توان با کنترل عوامل محیطی و کاربرد عوامل خارجی به این امر دست یافت (۳۶). غریب (۲۰۰۷)، اثر اسیدسالیسیلیک را بر دو گیاه ریحان (*Ocimum basilicum* L.) و مرزنجوش (*Origanum vulgare* L.) مورد مطالعه قرار داد و طبق نتایج افزایش ارتفاع گیاه، تعداد (شاخه، گره و برگ) در بوته، سطح برگ، وزن خشک و تر و کربوهیدرات کل در غلظت  $10^{-4}$  مولار اسیدسالیسیلیک حاصل گردید. همچنین کاربرد اسیدسالیسیلیک در غلظت  $10^{-4}$  مولار باعث افزایش کمیت و کیفیت اسانس ریحان و افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدانی شد (۱۸). در تحقیقی علی و همکاران (۲۰۰۷)، اثر اسیدسالیسیلیک (۲۰۰ میکرو مولار)، در گیاه جینسینگ (*Panax ginseng*) را بررسی کردند، طبق نتایج افزایش ترکیبات فنلی (۶۲ درصد)، فلاونوئیدها (۸۸ درصد)، اسید آسکوربیک (۵۵ درصد) و سیستئین (۶۲ درصد)، را در مقایسه با شاهد گزارش کردند (۳). در بررسی تأثیر اسیدسالیسیلیک بر صفات ریخت‌شناسی بنفشه آفریقایی (*Saintpaulia ionantha*)، گزارش شده است که غلظت  $10^{-5}$  مولار از اسیدسالیسیلیک باعث افزایش در تعداد برگ‌ها، قطر رزت، تعداد غنچه‌های گل و کاهش تعداد روز تا گلدهی شد (۲۴). در پژوهش دیگری رحیمی و همکاران (۲۰۰۹)، نتایج حاصل از کاربرد اسیدسالیسیلیک روی گیاه داوری گشنیز (*Coriandrum sativum*) نشان دادند که ارتفاع بوته، تعداد شاخه فرعی در بوته، وزن خشک شاخه و برگ و عملکرد بذر به‌طور معنی‌داری تحت تأثیر اسیدسالیسیلیک افزایش یافتند (۴۲). هاشمی و میردهقان (۲۰۱۴) در بررسی استفاده از اسیدسالیسیلیک

1- Elicitor

در کیفیت گل میخک رقم کانو (*Dianthus caryophyllus* C.V. Cano) نشان دادند که تیمار اسیدسالیسیلیک ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر بیشترین قطر گل را به خود اختصاص داد (۲۱). بیات و همکاران (۲۰۱۱) در آزمایشی نشان دادند که استفاده از اسیدسالیسیلیک با غلظت ۱ میلی‌مولار میزان هر یک از صفات ارتفاع بوته، وزن خشک ریشه و بیوماس دانه‌های خیار را به ترتیب ۶۵، ۱۸۰ و ۹۶ درصد نسبت به شاهد افزایش داد (۹). حیاتی و روشن (۲۰۱۳)، در آزمایشی اثر اسیدسالیسیلیک بر گیاه دارویی مرزه را نشان دادند، که کاربرد ۲۰۰ میلی‌گرم بر لیتر اسید سالیسیلیک باعث افزایش آلفا-ترپنین، بتا-میرسن و پارا-سیمن و کاهش کارواکرول در مقایسه با نمونه شاهد شد (۲۰).

در این مطالعه اثر کودهای آلی و محلول پاشی اسیدسالیسیلیک روی عملکرد پیکره رویشی، درصد اسانس و برخی متابولیت‌های ثانویه مورد بررسی قرار گرفت تا در گام اول با کاربرد کودهای آلی موجب افزایش زیست‌توده شده و در گام بعدی با محلول‌پاشی اسیدسالیسیلیک به‌عنوان یک محرک مسیره‌های بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه، میزان متابولیت‌های ثانویه این گیاه نیز افزایش یابد.

### مواد و روش‌ها

این تحقیق در سال ۹۲-۱۳۹۱ در دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان به‌صورت گلدانی در هوای آزاد انجام شد. آزمایش به‌صورت فاکتوریل بر پایه طرح بلوک‌های کامل تصادفی در سه تکرار انجام گردید. بسترهای کاشت مورد استفاده شامل: خاک مزرعه (به‌عنوان شاهد)، کود گاوی، کود گوسفندی، ورمی‌کمپوست و خاکبرگ (به نسبت وزنی ۱۰ درصد خاک گلدان)، به‌عنوان عامل اول و محلول‌پاشی با اسیدسالیسیلیک در چهار سطح: صفر،  $10^{-2}$ ،  $10^{-4}$ ،  $10^{-6}$  مولار به‌عنوان عامل دوم در نظر گرفته شد و هر گلدان به‌عنوان یک تکرار محسوب گردید.

ترکیبات فیزیکی-شیمیایی خاک مورد استفاده در گلدان‌ها قبل از استفاده مورد ارزیابی قرار گرفت (جدول ۱). همچنین میزان نیتروژن، فسفر و پتاسیم قابل جذب کودهای گاوی، گوسفندی، ورمی‌کمپوست و خاکبرگ مورد استفاده اندازه‌گیری شد (جدول ۲). بذر گیاه دارویی بادرنجبویه از دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران تهیه گردید. در تاریخ سوم اسفند ماه ۱۳۹۱ به‌منظور تهیه نشاء موردنیاز، بذر گیاه در سینی‌های کشت کاشته شدند. انتقال نشاءها به گلدان‌های با قطر دهانه ۳۰ و ارتفاع ۴۲ سانتی‌متر در اردیبهشت ماه ۱۳۹۲ مصادف با مرحله ۶-۴ برگی (ارتفاع بوته‌ها به ۱۰-۸ سانتی‌متر رسیده بود) و به تعداد ۵ عدد نشاء گیاه بادرنجبویه در هر گلدان کشت گردید. پس از

استقرار و رشد گیاهچه‌های بادرنجبویه و رسیدن به ارتفاع ۱۵ سانتی‌متری اقدام به محلول‌پاشی اسید سالیسیلیک (Sigma Alderich, 99%) گردید و این عمل با فاصله هر ۱۵ روز یکبار تا زمان ابتدای گلدهی ادامه داشت و نمونه‌های شاهد توسط آب مقطر اسپری شدند. برای اندازه‌گیری صفات ظاهری و شیمیایی در مرحله ابتدای گلدهی اقدام به نمونه‌گیری و اندازه‌گیری‌های لازم شد.

جدول ۱- برخی از ویژگی‌های فیزیکی- شیمیایی خاک مورد مطالعه.

Table 1. Selected physical and chemical characteristics of the studied soil.

عمق خاک (سانتی‌متر)	بافت خاک	EC (ds m <sup>-1</sup> )	pH	فسفر (ppm)	پتاسیم (ppm)	نیتروژن کل (درصد)	کربن آلی (درصد)
Soil Depth (Cm)	Soil texture			Phosphor (ppm)	Potassium (ppm)	Total nitrogen (%)	Organic carbon (%)
0-30	سیلتی رسی لومی (Silty clay loam)	0.298	7.52	85	460	0.14	1.01

جدول ۲- برخی از ویژگی‌های شیمیایی کودهای آلی مورد مطالعه.

Table 1. Selected chemical characteristics of the studied organic fertilizers.

کودهای آلی organic fertilizers	نیتروژن کل (درصد) Total nitrogen (%)	فسفر (درصد) Phosphor (%)	پتاسیم (درصد) Potassium (%)	pH (1:2)	EC (ds m <sup>-1</sup> )
کود گاوی (Cattle manure)	0.56	0.75	1.55	6.63	0.411
کود گوسفندی (Sheep manure)	0.65	0.37	1.22	7.70	0.830
خاکبرگ (Leaf mould)	0.38	0.3	1.1	6.60	1.27
ورمی‌کمپوست (Vermicompost)	0.26	0.53	1.2	7.10	0.77

اندازه‌گیری وزن تر و خشک پیکره رویشی: به‌منظور بررسی برخی فاکتورها، نمونه‌گیری از هر تیمار در شرایط یکسان و در زمان ابتدای گلدهی انجام گرفت. نمونه‌های انتخاب شده به‌منظور تعیین وزن تر توسط ترازوی دیجیتالی اندازه‌گیری شد. به‌منظور اندازه‌گیری ماده خشک، نمونه‌ها به‌مدت ۷۲ ساعت در آون ۸۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند.

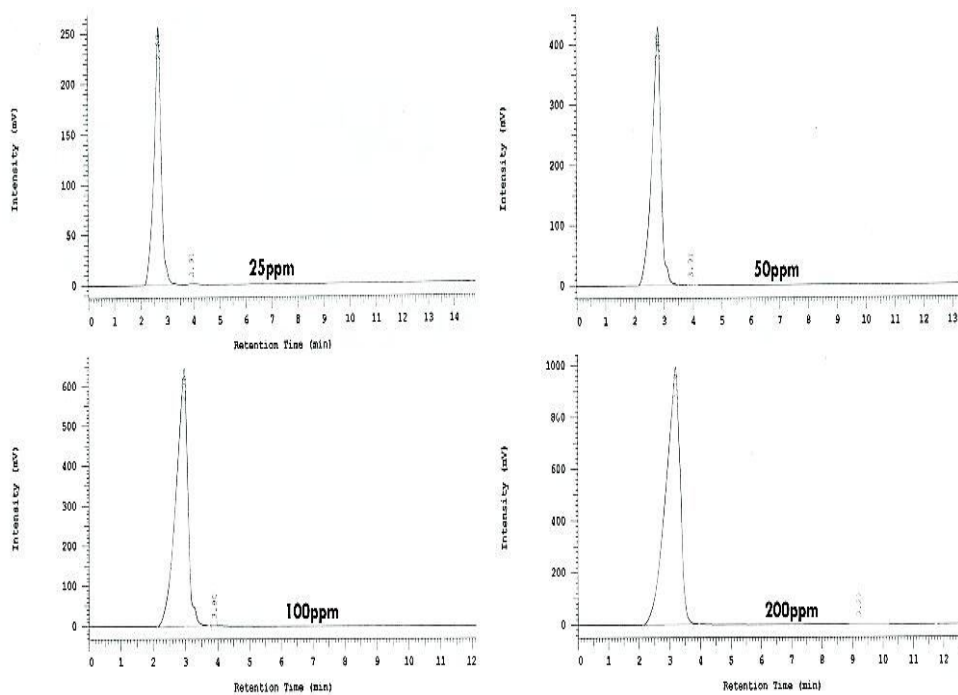


**استخراج و اندازه‌گیری اسانس:** پس از برداشت گیاه، برگ‌های هر تیمار جمع‌آوری و در شرایط اتاق (۲۸ درجه سانتی‌گراد) خشک گردیدند، اسانس‌گیری با استفاده از دستگاه کلونجر و به روش تقطیر با آب، در شرایط کاملاً یکسان و به مدت ۳ ساعت انجام شد. جهت اسانس‌گیری ۴۰ گرم از برگ‌های خشک مربوط به هر تیمار به همراه ۲۵۰ میلی‌لیتر آب به بالن ۵۰۰ میلی‌لیتر اضافه گردید (۵). درصد اسانس پس از رطوبت‌زدایی توسط سولفات سدیم بدون آب تعیین گردید (۳۶). در منابع مختلف اجزای اسانس متفاوتی از گیاه دارویی بادرنجبویه گزارش شده است، که در این پژوهش جهت تعیین اجزای تشکیل دهنده اسانس گیاه دارویی بادرنجبویه در ابتدای گلدهی از تمام تیمارها به یک نسبت ماده خشک جدا و با هم مخلوط نموده و جهت تجزیه اجزای اسانس استفاده گردید، تا تمام ترکیباتی که چه در شرایط مناسب و چه در شرایطی که به وسیله عوامل خارجی و داخلی امکان بروز در اسانس این گیاه دارویی را داشته مشخص گردد. بدین منظور ۲۰ گرم ماده خشک از هر تیمار جدا و با دیگر تیمارها مخلوط نموده و اسانس‌گیری به عمل آمد. ظروف حاوی اسانس تا زمان تجزیه دور از نور و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد در یخچال نگهداری شدند. جهت تعیین اجزای تشکیل دهنده اسانس حاصل، از دستگاه کروماتوگرافی گازی متصل به طیف‌سنج جرمی<sup>۱</sup> (GC/MS) استفاده گردید. مشخصات دستگاه GC/MS از نوع Agilent technologies، ستون HP-5MS به طول ۳۰ متر و قطر ۰/۲۵ میلی‌متر، ضخامت لایه فاز ساکن ۰/۲۵ میکرومتر، دمای محفظه تزریق ۲۶۰ درجه سانتی‌گراد، گاز حامل هلیوم با سرعت ۱/۱ میلی‌متر در دقیقه، انرژی یونیزاسیون ۷۰ الکترون ولت، حجم تزریق نمونه ۱ میکرولیتر استفاده شد.

**استخراج عصاره جهت اندازه‌گیری اسید رزمارینیک و فعالیت آنتی‌اکسیدانی:** به منظور تهیه عصاره ابتدا نمونه‌های برگ‌ها در دمای اتاق (۲۸ درجه سانتی‌گراد) خشک گردیدند، سپس با آسیاب برقی به خوبی پودر و مقدار یک گرم از هر نمونه با متانول ۸۰ درصد به حجم ۱۰ میلی‌لیتر رسانده شد. عصاره متانولی به مدت ۲۴ ساعت روی شیکر قرار گرفت، سپس توسط دستگاه سانتریفیوژ با ۳۵۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد و بخش بالایی محلول بعد از گذشتن از فیلتر سرنگی ۰/۴۵ میکرومتر، به ظروف مخصوص منتقل گردید.

1- Gas chromatography-mass spectrometry

اندازه‌گیری میزان اسید رزمارینیک: به منظور تعیین مقدار اسید رزمارینیک موجود در عصاره از دستگاه کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC) استفاده گردید. مدل دستگاه: مرک- هیتاچی ال- ۷۱۰۰ (Merk Hitachi L-7100)، دکتور: دیود آرای هیتاچی ال- ۲۴۵۰ (Diode array detector) (Hitachi L- 2450)، آون ستون: هیتاچی ال- ۲۳۰۰ (Column oven L-2300)، نوع ستون: آر پی- ۱۸ (Reverse Phase-18) با ابعاد  $۴/۶ \times ۲۵۰$  میلی‌متر و اندازه ذرات ۵ میکرومتر بود. فاز متحرک شامل متانول ۸۰ درصد با سرعت جریان  $۰/۴$  میلی‌لیتر در دقیقه، دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و حجم تزریق نمونه ۱۰۰ میکرولیتر استفاده گردید. برای تجزیه نمونه‌های اسید رزمارینیک از طول موج ۲۸۰ نانومتر استفاده شد. با مقایسه زمان بازداری و سطح زیر منحنی نمونه با نمونه استاندارد های اسید رزمارینیک (RA, 97%, Sigma Alderich)، (۲۰۰، ۱۰۰، ۵۰، ۲۵ میلی‌گرم بر لیتر)، (شکل ۲)، میزان اسید رزمارینیک تعیین و در نهایت بر اساس میلی‌گرم بر گرم ماده خشک برگ بیان شد (۴).



شکل ۲- کروماتوگرام استاندارد های اسید رزمارینیک تزریق شده به دستگاه HPLC.  
Figure 2. Chromatogram from rosmarinic acid standards injected into HPLC.

#### 1- High performance liquid chromatography

اندازه‌گیری فعالیت آنتی‌اکسیدانی به روش DPPH: برای اندازه‌گیری میزان مهار رادیکال‌های آزاد از روش دی فنیل پیکریل هیدرازیل<sup>۱</sup> (DPPH) استفاده گردید، ابتدا یک میلی‌لیتر از عصاره متانولی با یک میلی‌لیتر DPPH با غلظت ۰/۱ میلی‌مولار مخلوط گردید. برای شاهد یک میلی‌لیتر متانول خالص به جای یک میلی‌لیتر عصاره متانولی قرار داده شد و برای بلانک از متانول خالص استفاده شد، بعد از ۳۰ دقیقه قراردیمی نمونه‌ها در تاریکی، نمونه‌ها در طول موج ۵۱۷ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر (UNICO 2800) قرائت شدند. اعداد به دست آمده از جذب نمونه توسط رابطه زیر به درصد مهار رادیکال آزاد (RSA)<sup>۲</sup> تبدیل شد (۱۳).

$$\text{درصد مهار رادیکال آزاد} = \frac{(AC - AS)}{AC} \times 100$$

در این رابطه AC<sup>۳</sup> و AS<sup>۴</sup> به ترتیب برابر با عدد جذب کنترل و نمونه می‌باشد. برای تجزیه و تحلیل داده‌ها از نرم‌افزار SAS (نسخه ۹/۱) و برای مقایسه میانگین‌ها از آزمون حداقل تفاوت معنی‌داری (LSD) در سطح احتمال ۵ درصد استفاده گردید.

### نتایج و بحث

وزن تر و خشک پیکره رویشی: نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده‌ها (جدول ۳) نشان داد که تیمار کودهای آلی اختلاف معنی‌داری ( $p \leq 0/01$ ) بر وزن تر پیکره رویشی داشت، بر اساس آزمون مقایسه میانگین‌ها (جدول ۴)، بیشترین وزن تر پیکره رویشی (۲۲۲/۵۳ گرم در بوته)، در تیمار کود گوسفندی و کمترین مقدار آن (۶۴/۸۸ گرم در بوته)، در تیمار کود ورمی‌کمپوست مشاهده گردید. در بین تیمارهای اسید سالیسیلیک روی وزن تر پیکره رویشی عدم اختلاف معنی‌داری مشاهده گردید. در بین اثرات متقابل تیمارها (کودهای آلی و اسید سالیسیلیک)، اختلاف معنی‌داری ( $p \leq 0/05$ ) وجود داشت، به طوری که تیمار کود گاوی و اسید سالیسیلیک  $10^{-2}$  مولار دارای بیشترین مقدار وزن تر (۲۷۱/۶۶ گرم در بوته) نسبت به دیگر تیمارها و کمترین مقدار آن (۵۹/۳۰ گرم در بوته) مربوط به تیمار کود ورمی‌کمپوست و اسید سالیسیلیک  $10^{-2}$  مولار بود.

1- 2,2- Diphenyl-1-picrylhydrazyl

2- Radical scavenging activity

3- Absorbance control

4- Absorbance sample

در رابطه با وزن خشک پیکره رویشی اختلاف معنی‌داری ( $p \leq 0/01$ ) بین کودهای آلی وجود داشت. تیمار کود گوسفندی دارای بیشترین وزن خشک پیکر رویشی ( $174/02$  گرم در بوته) و تیمار کود ورمی‌کمپوست دارای کمترین مقدار وزن خشک پیکر رویشی ( $50/41$  گرم در بوته)، در بین تیمارها بودند. همچنین عدم اختلاف معنی‌داری بین تیمارهای اسیدسالیسیلیک روی وزن خشک پیکره رویشی مشاهده گردید. در بین اثرات متقابل تیمارها، تأثیر معنی‌داری ( $p \leq 0/05$ ) مشاهده شد. تیمار کود گاوی و اسید سالیسیلیک  $10^{-2}$  مولار دارای بیشترین ( $217/31$  گرم در بوته)، وزن خشک نسبت به دیگر تیمارها و کمترین مقدار آن ( $45/38$  گرم در بوته)، مربوط به تیمار کود ورمی‌کمپوست و اسید سالیسیلیک  $10^{-2}$  مولار اختصاص داشت (جدول ۴). نتایج این پژوهش نشان داد که وزن تر و خشک پیکره رویشی در تیمارهای کود گاوی و گوسفندی و اسیدسالیسیلیک  $10^{-2}$  مولار افزایش یافت. خلیل (۲۰۰۲) و اسماعیل و همکاران (۲۰۰۹) به ترتیب در بررسی تأثیر کودهای زیستی و کمپوست بر دو گیاه رزماری و مرزنگوش (*Marjoram hortensis* L.) حداکثر رشد و اجزای عملکرد را در تیمارهای حاوی کود آلی به دست آوردند (۲۷، ۲۳). می‌توان نتیجه گرفت که خواص شیمیایی و فیزیکی و اسید هیومیک موجود در کودهای گاوی و گوسفندی، از طریق افزایش ظرفیت نگهداری عناصر غذایی و افزایش فعالیت ریزجاندارها و همچنین با اصلاح ساختار فیزیکی خاک باعث نگهداری بیشتر آب خاک شده که با افزایش رشد و در نتیجه افزایش وزن تر و خشک پیکره رویشی همراه می‌باشد (۴۶). همچنین بالا بودن میزان عناصر مهم در رشد گیاهان (نیترژن، پتاسیم و فسفر) موجود در کودهای گاوی و گوسفندی در مقایسه با سایر کودهای مورد استفاده در این پژوهش می‌تواند دلیلی بر رشد بهتر گیاه در این تیمارها نسبت به سایر تیمارها باشد.

خلیل (۲۰۰۶)، در بررسی تأثیر کود دامی، مرغی، زیستی و کمپوست بر گیاه دارویی بارهنگ (*plantago afra* L.)، عدم تأثیرپذیری صفات وزن تر و خشک گیاه را تحت تأثیر تیمارها عنوان کرد (۲۶). ماهشواری و همکاران (۲۰۰۰)، در یک بررسی بر گیاه دارویی اسفرزه گزارش کردند که کود آلی بر صفات رشدی گیاه اثر معنی‌داری نداشت (۳۱). بنابراین می‌توان استنباط کرد که واکنش گیاهان مختلف تحت تأثیر کودها متفاوت می‌باشد. با توجه به نتایج به دست آمده می‌توان اظهار داشت که نیترژن موجود در کودهای آلی باعث تقویت رشد رویشی، افزایش فعالیت فتوسنتزی و زیست‌توده شده و پتاسیم بالای این کودها علاوه بر تسریع تقسیم سلولی و تأثیر مستقیم در رشد رویشی به دلیل نقشی که در ساخت هیدرات‌های کربن و پروتئین‌ها و تغلیظ شیره سلولی داشته و همچنین فسفر

به‌علت تسریع در رشد ریشه‌ها و نقشی که در واکنش‌های اکسیداسیون و احیاء، فتوسنتز و تنفس دارد، باعث افزایش وزن خشک بوته می‌گردد (۴۹).

کوواسیک و همکاران (۲۰۰۹)، افزایش رشد ریشه و برگ‌های گیاه بابونه آلمانی را تحت تأثیر اسید سالیسیلیک در غلظت ۵۰ میکرومول را مشاهده کردند، از سویی نشان دادند که کاربرد آن در غلظت ۲۵۰ میکرومول با تأثیر بر کاهش کلروفیل، میزان آب و پروتئین محلول، باعث کاهش در رشد گیاه گردید (۳۰). در پژوهش حاضر مشخص گردید که تیمار کود گاوی و اسیدسالیسیلیک  $10^{-2}$  مولار به‌دلیل داشتن شاخص سطح برگ بالاتر با ۲۸/۶۵ سانتی‌متر مربع در مقابل ۱۳/۵۲ سانتی‌متر مربع تیمار شاهد بدون کاربرد اسید سالیسیلیک و نیز میزان کلروفیل بالاتر (۳۶ میلی‌گرم بر سانتی‌متر مربع در مقابل ۲۵/۰۵ میلی‌گرم بر سانتی‌متر مربع تیمار شاهد بدون کاربرد اسید سالیسیلیک)، مدت زمان بیشتری فتوسنتز نموده و باعث تولید ماده خشک بالاتر و عملکرد بالاتر شده است. اسید سالیسیلیک از طریق افزایش فعالیت آنزیم روویسکو و افزایش کلروفیل، میزان فتوسنتز کل را افزایش می‌دهد و در نتیجه موجب افزایش وزن خشک گیاه می‌گردد (۴۷).

**درصد اسانس:** نتایج به‌دست آمده از تجزیه واریانس داده‌ها (جدول ۳) نشان داد که اثر کودهای آلی، سطوح مختلف اسید سالیسیلیک و اثرات متقابل آن‌ها بر میزان اسانس حاصل، معنی‌دار ( $p \leq 0.01$ ) بوده است. مقایسه میانگین داده‌ها نشان داد که بین کودهای آلی تفاوت معنی‌داری وجود داشت، به طوری که تیمار کود گاوی بیشترین درصد اسانس (۰/۳۶ درصد)، و تیمار خاک مزرعه کمترین درصد اسانس (۰/۲۸ درصد)، را به خود اختصاص دادند (جدول ۴). در بین غلظت‌های مختلف اسید سالیسیلیک، عدم کاربرد اسید سالیسیلیک کمترین درصد اسانس (۰/۲۴ درصد)، و غلظت  $10^{-2}$  مولار اسید سالیسیلیک دارای بیشترین درصد اسانس (۰/۴۲۹ درصد)، در بین تیمارها بود. بین اثرات متقابل کودهای آلی و اسید سالیسیلیک، تیمار کود گاوی و اسید سالیسیلیک  $10^{-2}$  مولار بیشترین مقدار اسانس (۰/۵۳۶ درصد)، و کمترین مقدار آن (۰/۲۰۳ درصد)، مربوط به تیمارهای کودهای گاوی و گوسفندی بدون اعمال تیمار اسید سالیسیلیک بود (جدول ۴). نتایج نشان می‌دهد تیمارهای اسید سالیسیلیک  $10^{-2}$  مولار و اثر متقابل اسید سالیسیلیک  $10^{-2}$  مولار و کود گاوی دارای بیشترین مقدار درصد اسانس در بین تیمارها بودند. اسید سالیسیلیک از سویی باعث تحریک برخی چرخه‌های فیزیولوژیکی می‌گردد و از طرف دیگر از چرخه‌های دیگر جلوگیری می‌کند، این تأثیر به غلظت کاربردی، گونه گیاهی و شرایط محیطی مرتبط است (۳۲). تأثیر مثبت کودهای آلی بر افزایش درصد اسانس در گیاهان دارویی زنیان، علف لیمو و بابونه نیز گزارش شده است (۲، ۴۹، ۱۷). این نتایج با

یافته‌های مربوط به پژوهش دیگری (غریب، ۲۰۰۷)، که در آن با کاربرد اسید سالیسیلیک بر ریحان، درصد وزنی اسانس افزایش یافت، همسو بود (۱۸)

افزایش میزان اسانس در اثر محلول پاشی گیاهان با اسید سالیسیلیک ممکن است در اثر افزایش رشد رویشی، جذب مواد غذایی بیشتر توسط ریشه‌ها به دلیل افزایش فعالیت‌های فتوسنتزی گیاه و همچنین تغییر در جمعیت غده‌های تولید کننده اسانس در برگ و گل‌ها باشد (۱۸). با توجه به نتایج به‌دست آمده می‌توان اظهار نمود غلظت اسید سالیسیلیک  $10^{-2}$  مولار با تحریک چرخه‌های فیزیولوژیکی گیاه و نیز تغییر در جمعیت غده‌های تولید کننده اسانس شده و به‌همراه تیمار کود گاوی با داشتن میزان فتوسنتز بالاتر نسبت به دیگر تیمارها، مواد اولیه تولید متابولیت‌های ثانویه را بیشتر تولید نموده و باعث افزایش تولید اسانس در گیاه دارویی بادرنجبویه گردیده است.

**اجزای اسانس:** دستگاه GC/MS مورد استفاده ۹۹/۱۱ درصد اجزای اسانس را که شامل ۲۵ ترکیب بود تشخیص داد (جدول ۵). اسانس حاصل شامل سیترال E&Z (۶۱/۸۸ درصد)، کاریوفیلن اکساید (۷/۷۱ درصد)، ترنس کاریوفیلن (۴/۹۵ درصد)، و بورنتول (۳/۰۳ درصد)، به‌عنوان ترکیبات عمده می‌باشد. باستا و همکاران (۲۰۰۵)، با بررسی اجزای اسانس بادرنجبویه رشد یافته در یونان، نشان دادند که کاریوفیلن اکساید (۲۴/۴-۱۲/۶ درصد)، سابینین (۱۷/۴-۶/۹ درصد)، کاریوفیلن E (۱۵/۳-۷/۲ درصد)، بتا پاینن (۱۸/۲-۶/۴ درصد)، از اجزای اصلی تشکیل دهنده اسانس بادرنجبویه می‌باشد (۸). صائب و غلامرضایی (۲۰۱۲)، در بررسی اجزای اسانس گیاه دارویی بادرنجبویه در مراحل مختلف رشدی، نشان دادند که اجزای اصلی اسانس قبل از گلدهی شامل دکادینال (۲۵/۳ درصد)، کاریوفیلن اکساید (۸/۷۵ درصد)، ژرانیول استات (۵/۴۱ درصد) بود. در مرحله گلدهی ۳۶ ترکیب شناسایی شد که اصلی‌ترین ترکیبات آن شامل دکادینال (۲۸/۰۴ درصد)، ژرانیول (۲۴/۹۷ درصد)، کاریوفیلن اکساید (۷/۵۵ درصد)، کاریوفیلن E (۴/۶۵ درصد) و در مرحله بعد از گلدهی ۱۶ ترکیب شناسایی شد که مهم‌ترین آن‌ها شامل کارواکرونول (۳۷/۶۲ درصد)، متیل سیترونالات (۳۲/۳۴ درصد)، ژرانیول استات (۵/۸۲ درصد)، کاریوفیلن (۵/۵ درصد)، بود (۴۴). نتایج این پژوهش و سایر محققان نشان می‌دهد اجزای اسانس گیاه دارویی بادرنجبویه تحت تأثیر عوامل محیطی (بوم‌شناختی) و مراحل رشدی گیاه متفاوت می‌باشد. می‌توان نتیجه گرفت جهت افزایش تولید جزء موردنظر اسانس گیاهان دارویی حاوی اسانس باید شرایط محیطی که گیاه در آن رشد می‌نماید و نیز مرحله رشدی گیاه و عوامل خارجی دخیل بر اجزای اسانس گیاهان دارویی را قبل از کشت گیاهان دارویی اسانس‌دار مدنظر قرار داده و با توجه به‌جزء موردنظر اقدام به کاشت و برداشت گیاهان دارویی نمود.

**فعالیت آنتی‌اکسیدانی:** بر اساس نتایج حاصل از تجزیه واریانس (جدول ۳)، فعالیت آنتی‌اکسیدانی در تیمار کودهای آلی، اسید سالیسیلیک و اثر متقابل کودهای آلی و اسید سالیسیلیک در سطح یک درصد معنی‌دار گردید. با توجه به نتایج مقایسه میانگین‌ها، در بین تیمار کودهای آلی، تیمار خاکبرگ دارای بیشترین فعالیت آنتی‌اکسیدانی (۷۳/۷۵ درصد)، و تیمار خاک زراعی کمترین (۶۶/۷۰ درصد) فعالیت آنتی‌اکسیدانی را داشتند. در بین غلظت‌های مختلف تیمار اسید سالیسیلیک، تیمار شاهد (بدون کاربرد اسید سالیسیلیک)، دارای بیشترین فعالیت آنتی‌اکسیدانی (۷۱/۸۶ درصد)، و تیمار اسید سالیسیلیک  $10^{-2}$  مولار کمترین (۶۴/۰۷ درصد) فعالیت آنتی‌اکسیدانی را دارا بودند. تیمار کود ورمی‌کمپوست بدون کاربرد اسید سالیسیلیک دارای بیشترین فعالیت آنتی‌اکسیدانی (۷۶/۱۶ درصد) که با شاهد بدون کاربرد اسید سالیسیلیک اختلاف معنی‌داری نداشت و تیمار کود گاوی و اسید سالیسیلیک  $10^{-2}$  مولار کمترین فعالیت آنتی‌اکسیدانی (۶۴/۰۷ درصد)، را در بین اثرات متقابل کودهای آلی و اسید سالیسیلیک را به خود اختصاص دادند (جدول ۴). افزایش میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی در تیمار خاکبرگ، در مقایسه با دیگر تیمارها می‌تواند به علت شوری بالاتر این کود استفاده شده نسبت به دیگر کودها بوده که باعث یک تنش ضعیف شوری گردیده و گیاه جهت مقابله با اثرات مخرب این تنش میزان تولید موادی که باعث کاهش اثر این تنش می‌گردد را افزایش داده است. به‌نظر می‌رسد افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدانی در تیمار کود ورمی‌کمپوست بدون محلول پاشی با اسید سالیسیلیک مربوط به نوع بافت کود (ریز و چسبناک) باشد که باعث کاهش زهکشی آن شده است، که در این حالت خاک میزان آب بیشتری در خود ذخیره نموده و چون آزمایش در شرایط گلدانی صورت گرفت، آب اضافی در زیر گلدان جمع شده و گیاه در شرایط تنش غرقابی ضعیفی قرار می‌گیرد. گیاه جهت مقابله با این شرایط، فعالیت آنتی‌اکسیدانی خود را جهت تعدیل شرایط تنشی، افزایش می‌دهد. کیانی و همکاران (۲۰۱۴) نیز در بررسی کودهای آلی بر شاخص‌های رشدی گیاه دارویی نعنای گزارش کردند که با افزایش سطوح کود ورمی‌کمپوست موجب کاهش رشد در گیاه گردید که علت آن را کاهش شدت زهکشی به علت استفاده از کود ورمی‌کمپوست و ایجاد شرایط تنشی عنوان کردند (۲۸).

**میزان اسید رزمارینیک:** نتایج به‌دست آمده از تجزیه واریانس بیانگر آن است که تأثیر کودهای آلی، اثر متقابل کودهای آلی و اسید سالیسیلیک در سطح احتمال یک درصد و غلظت‌های مختلف اسید سالیسیلیک در سطح احتمال پنج درصد بر مقدار اسید رزمارینیک معنی‌دار بود. نتایج مقایسه میانگین‌ها (جدول ۴) نشان داد که بین کودهای آلی تفاوت معنی‌داری وجود ندارد، ولی نسبت به تیمار شاهد (عدم کاربرد کودهای آلی)، تفاوت معنی‌داری وجود داشت، به‌طوری که بیشترین مقدار اسید

رزمارینیک (۲۳/۱۱ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک)، به تیمار خاکبرگ و کمترین مقدار آن (۱۷/۷۲ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک)، مربوط به خاک زراعی بود. در بین غلظت‌های مختلف اسید سالیسیلیک، عدم کاربرد اسید سالیسیلیک کمترین میزان اسید رزمارینیک (۱۹/۲۴ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک)، مشاهده شد، ولی بین غلظت‌های مختلف اسید سالیسیلیک تفاوت معنی‌داری وجود نداشت، با این حال بیشترین میزان اسید رزمارینیک (۲۱/۸۸ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک) در تیمار  $10^{-4}$  مولار اسید سالیسیلیک مشاهده گردید. بین اثرات متقابل کودهای آلی و اسید سالیسیلیک، تیمار کود گوسفندی و اسید سالیسیلیک  $10^{-4}$  مولار بیشترین مقدار اسید رزمارینیک (۲۹/۴۷ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک)، و کمترین مقدار آن (۱۴/۳۳ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک)، مربوط به تیمار خاک زراعی بدون اعمال تیمار اسید سالیسیلیک بود. افزایش میزان اسید رزمارینیک موجود در خاکبرگ، در مقایسه با دیگر تیمارها می‌تواند به علت شوری بالاتر این کود استفاده شده نسبت به دیگر کودها باشد که باعث یک تنش ضعیف شوری گردیده و گیاه جهت مقابله با اثرات این تنش ایجاد شده میزان تولید اسید رزمارینیک را افزایش داده است. ویلدووا و همکاران (۲۰۰۶)، در آزمایشی روی بابونه آلمانی، در مقایسه بین کشت ارگانیک با کشت رایج نشان دادند که مقدار اسانس و همچنین بیشترین کامازولن، آلفا بیسابلول، بیسابلول اکسید A و فلاونوئیدها از کشت ارگانیک حاصل شد (۵۰). احمدیان و همکاران (۲۰۰۷)، در گیاه زیره سبز نشان دادند که مصرف کود دامی باعث افزایش میزان کومین آلدئید، پاراسیمن، و میرسن موجود در آن شد (۱). حیاتی و روشن (۲۰۱۳)، در آزمایشی اثر اسید سالیسیلیک بر گیاه دارویی مرزه را نشان دادند، که کاربرد ۲۰۰ میلی‌گرم بر لیتر اسید سالیسیلیک باعث افزایش آلفا-ترینین، بتا-میرسن و پارا-سیمن و کاهش کارواکول در مقایسه با نمونه شاهد شد (۲۰). صمدی و همکاران (۲۰۱۴) نیز گزارش نمودند که با افزایش سطح اسید سالیسیلیک مورد استفاده، ترکیبات فنیل پروپانوییدی و فنلی در گیاه دارویی کنگر فرنگی افزایش یافت، که علت آن را تأثیر اسید سالیسیلیک بر آنزیم کلیدی (فنیل آلانین آمونیلایز) مسیر بیوستز ترکیبات فنلی و افزایش فعالیت این آنزیم ذکر نمودند (۴۵). تغییرات بیوشیمیایی در رابطه با متابولیسم القاء شده، سیستم‌های مختلفی را در گیاه درگیر کرده و باعث القاء فعالیت آنزیم‌های ویژه و بروز تغییرات بیوشیمیایی وسیعی در سلول‌های تحریک شده می‌گردد. آنچه مشخص است محرک‌ها از طریق گیرنده‌های موجود در غشای پلاسمایی دریافت می‌شوند و از طریق سیستم پیام‌رسانی<sup>۱</sup> نسخه‌برداری و بیان ژن‌های دخیل در بیوستز متابولیت‌ها را تحت تأثیر قرار می‌دهند. در واقع اسید سالیسیلیک با افزایش فعالیت آنزیم فنیل



آلانین آمونیا لایاز<sup>۱</sup> (PAL) و نیز چالکون سینتاز<sup>۲</sup> (CHS) دو آنزیم کلیدی در مسیر بیوسنتز ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی باعث افزایش این ترکیبات می‌شود. که به دنبال آن سنتز و تجمع ترکیبات فنولی از جمله اسید رزمارینیک که جزو ترکیبات مهم فنلی بوده را افزایش می‌دهد. آنزیم PAL یک آنزیم کلیدی در سوخت و ساز فنیل پروپانوئید بوده و تشکیل ترانس اسید سینامیک را از طریق دی‌آمینه کردن فنیل آلانین کاتالیز می‌کند. این آنزیم با تنش‌های مختلف زنده و غیر زنده تحریک می‌شود که نتیجه آن تجمع فنیل پروپانوئیدهای از جمله ترکیبات فنلی و فلاونوئیدها می‌باشد. اسید سالیسیلیک با افزایش فعالیت آنزیم PAL که تجمع مواد فنلی را به همراه دارد سبب از بین بردن رادیکال‌های آزاد و جلوگیری از اثر سوء آنها در تخریب غشاء سلولی می‌گردد (۷).

جدول ۳- تجزیه واریانس تأثیر کودهای آلی و اسید سالیسیلیک بر صفات اندازه‌گیری شده بادرنجبویه.

Table 1. Analysis of variance for effect of organic fertilizers and salicylic acid on measured traits of lemon balm.

میزان اسید رزمارینیک Rosmarinic acid content	فعالیت آنتی‌اکسیدانی Antioxidant activity	اسانس Essential oil content	وزن خشک پیکره رویشی Shoot dry weight	وزن تر پیکره رویشی Shoot fresh weight	درجه آزادی (DF)	منابع تغییرات (S.O.V)
55.27 **	95.79 **	0.012 **	75.54 **	93.82 **	4	کودهای آلی (Organic fertilizers)
33.25 *	221.19 **	0.1383 **	1.37 <sup>ns</sup>	1.81 <sup>ns</sup>	3	اسید سالیسیلیک (Salicylic acid) × کودهای آلی
40.36 **	35.19 **	0.01 **	3.81 *	4.88 *	12	اسید سالیسیلیک (Organic fertilizers × Salicylic acid)
8.96	9.83	0.00006	2.31	2.72	38	خطا (Error)
14.04	4.49	2.40	13.98	13.18		ضریب تغییرات CV (%)

<sup>ns</sup>, \* و \*\* به ترتیب عدم معنی‌داری، معنی‌دار شدن در سطح ۵ و ۱ درصد می‌باشد.

<sup>ns</sup>, \* and \*\*: not significant, significant at the 5% and 1% probability levels, respectively.

2- Phenyl alanine ammonia-lyase

3- Chalcone synthase

جدول ۴- مقایسه میانگین صفات اندازه‌گیری شده در گیاه بادرنجبویه تحت تأثیر کودهای آلی و اسید سالیسیلیک.

Table 4. Mean comparison for measured traits of lemon balm under effect of organic fertilizers and salicylic acid.

میزان اسید رزمارینیک (میلی‌گرم بر گرم وزن خشک) Rosmarinic acid content (mg/g DW)	فعالیت آنی اکسیدانی (%) Antioxidant activity (%)	اسانس (%) Essential oil (%)	وزن خشک پیکره رویشی (گرم در بوته) Shoot dry weight (g/ Shrub)	وزن تر پیکره رویشی (گرم در بوته) Shoot fresh weight (g/ Shrub)	تیمارها Treatments	
					اسید سالیسیلیک (مولار) Salicylic acid (Molar)	کود آلی (organic fertilizer)
24.672 <sup>ab</sup>	71.725 <sup>b</sup>	0.2033 <sup>o</sup>	166.057 <sup>ab</sup>	214.853 <sup>ab</sup>	0	
24.414 <sup>b</sup>	59.528 <sup>d</sup>	0.536 <sup>a</sup>	217.312 <sup>a</sup>	271.666 <sup>a</sup>	10 <sup>-2</sup>	کود گاوی
20.724 <sup>bc</sup>	72.349 <sup>ab</sup>	0.486 <sup>b</sup>	171.92 <sup>ab</sup>	204.933 <sup>ab</sup>	10 <sup>-4</sup>	Cattle manure
20.134 <sup>bc</sup>	72.002 <sup>ab</sup>	0.216 <sup>n</sup>	138.076 <sup>bc</sup>	174.333 <sup>bc</sup>	10 <sup>-6</sup>	
16.875 <sup>c</sup>	67.221 <sup>bc</sup>	0.203 <sup>o</sup>	177.876 <sup>ab</sup>	229.6 <sup>ab</sup>	0	
18.833 <sup>c</sup>	64.518 <sup>cb</sup>	0.42 <sup>d</sup>	208.674 <sup>ab</sup>	266.933 <sup>a</sup>	10 <sup>-2</sup>	کود گوسفندی
29.478 <sup>a</sup>	72.002 <sup>ab</sup>	0.453 <sup>c</sup>	156.404 <sup>ab</sup>	198.6 <sup>ab</sup>	10 <sup>-4</sup>	Sheep manure
23.877 <sup>b</sup>	69.022 <sup>bc</sup>	0.286 <sup>k</sup>	153.113 <sup>b</sup>	195 <sup>b</sup>	10 <sup>-6</sup>	
21.159 <sup>bc</sup>	75.051 <sup>ab</sup>	0.303 <sup>j</sup>	110.311 <sup>bc</sup>	144.9 <sup>bc</sup>	0	
23.435 <sup>bc</sup>	73.804 <sup>ab</sup>	0.413 <sup>e</sup>	153.724 <sup>b</sup>	204.04 <sup>ab</sup>	10 <sup>-2</sup>	خاکبرگ
24.237 <sup>b</sup>	75.259 <sup>ab</sup>	0.32 <sup>i</sup>	128.188 <sup>bc</sup>	172.28 <sup>bc</sup>	10 <sup>-4</sup>	Leaf mould
23.608 <sup>bc</sup>	70.893 <sup>b</sup>	0.206 <sup>no</sup>	126.96 <sup>bc</sup>	163.58 <sup>bc</sup>	10 <sup>-6</sup>	
19.16 <sup>c</sup>	76.16 <sup>a</sup>	0.263 <sup>l</sup>	55.187 <sup>c</sup>	71.216 <sup>c</sup>	0	
23.55 <sup>bc</sup>	61.261 <sup>cd</sup>	0.406 <sup>e</sup>	45.388 <sup>c</sup>	59.306 <sup>c</sup>	10 <sup>-2</sup>	ورمی کمپوست
20.021 <sup>bc</sup>	73.25 <sup>ab</sup>	0.386 <sup>f</sup>	51.653 <sup>c</sup>	65.416 <sup>c</sup>	10 <sup>-4</sup>	Vermicompost
21.593 <sup>bc</sup>	75.814 <sup>ab</sup>	0.343 <sup>h</sup>	49.43 <sup>c</sup>	63.583 <sup>c</sup>	10 <sup>-6</sup>	
14.333 <sup>c</sup>	69.161 <sup>bc</sup>	0.23 <sup>m</sup>	89.744 <sup>c</sup>	119.92 <sup>c</sup>	0	شاهد
17.061 <sup>c</sup>	61.261 <sup>cd</sup>	0.37 <sup>g</sup>	71.806 <sup>c</sup>	93.5 <sup>c</sup>	10 <sup>-2</sup>	
14.967 <sup>c</sup>	65.488 <sup>c</sup>	0.31 <sup>ij</sup>	102.403 <sup>bc</sup>	132.373 <sup>bc</sup>	10 <sup>-4</sup>	(خاک زراعی)
24.522 <sup>b</sup>	70.893 <sup>b</sup>	0.21 <sup>no</sup>	146.126 <sup>bc</sup>	189 <sup>c</sup>	10 <sup>-6</sup>	Control

حروف مشترک در هر ستون نمایان‌گر عدم تفاوت معنی‌داری در سطح احتمال ۵ درصد بر اساس آزمون حداقل تفاوت معنی‌داری (LSD) می‌باشد.

Means with at least one similar letter in each column have no signification difference LSD test at %5 of probability level.

جدول ۵- اجزای تشکیل دهنده اسانس بادرنجبویه (*Melissa officinalis* L.).

ردیف	زمان بازداری (دقیقه)	ترکیبات	درصد
No	Retention time (Minute)	Components	Percentage
1	6.48	$\alpha$ -Pinene	0.75
2	8.51	6-Methyl-5-Hepten-2-One	1.54
3	10.17	1,8-Cineole	1.74
4	13.18	$\gamma$ -Clausenan	0.54
5	13.40	Linalool	1.68
6	15.17	Camphor	0.59
7	15.50	Trans-chrysanthemal	0.32
8	15.74	Citronellal	0.45
9	16.30	Borneol	3.03
10	16.76	Rose furan epoxide	0.70
11	17.12	Cyclohexylethylene	1.73
12	17.58	$\alpha$ -Terpineol	0.65
13	18.25	L-VerbenonE	1.52
14	20.15	Z-Citral	27.82
15	21.03	Geraniol	1.23
16	21.74	E-Citral	34.06
17	22.27	Bornyl acetate	2.61
18	23.78	Carvacrol	1.13
19	24.13	Methyl geranoate	0.86
20	26.56	Geranyl acetate	2.26
21	27.77	Trans-Caryophyllene	4.95
22	29.07	$\alpha$ -Humulene	0.50
23	33.33	Caryophyllene oxide	7.71
24	34.16	Isoaromadendrene epoxide	0.33
25	35.09	Caryophyllenol II	0.41
		کل ترکیبات (درصد)	99.11
		Components total (%)	

### نتیجه‌گیری

متابولیت‌های ثانویه گیاهان دارویی امروزه جهت استفاده در صنایع دارویی، بهداشتی و غذایی از جایگاه ویژه‌ای برخوردارند. مطالعه پژوهش‌های انجام شده در کشور حاکی از آن است که تحقیقات ارزشمندی در زمینه تأثیر کودهای آلی در بهبود کمیت و کیفیت و همچنین کاربرد اسید سالیسیلیک جهت کاهش اثرات سوء ناشی از شرایط تنش محصولات زراعی انجام شده است. اما در خصوص تأثیر این کودها و اسید سالیسیلیک بر رشد و عملکرد گیاهان دارویی به‌خصوص در گیاه دارویی بادرنجبویه تحقیقات زیادی انجام نگرفته است. با توجه به ارزش دارویی و غذایی این گیاه و همچنین اثرات سوء مصرف کودهای شیمیایی در بخش کشاورزی، انجام تحقیقات وسیع و گسترده به‌منظور

ارزیابی قابلیت کودهای آلی مختلف در افزایش عملکرد و بهبود کیفیت گیاهان دارویی و کاربرد اسید سالیسیلیک به‌عنوان یک الیستور جهت افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه در کشور امری ضروری و اجتناب‌ناپذیر می‌باشد. به همین دلیل این پژوهش با هدف بررسی تأثیر کودهای آلی و محلول‌پاشی اسید سالیسیلیک روی عملکرد پیکره رویشی، میزان اسانس، فعالیت آنتی‌اکسیدانی و میزان اسید رزمارینیک به‌عنوان یک ترکیب ضدبیماری ایدز و یک آنتی‌اکسیدان در گیاه دارویی بادرنجبویه انجام گردید. با توجه به نتایج این پژوهش، می‌توان بیان نمود که با استفاده از کودهای گاوی و گوسفندی با کاهش آلودگی ناشی از مصرف کودهای شیمیایی و همچنین با بهبود خصوصیات خاک موجب پایداری در کشاورزی گردید و ضمن افزایش عملکرد در وهله اول توسط این کودها با استفاده از محلول پاشی اسید سالیسیلیک  $10^{-2}$ ،  $10^{-4}$  مولار، باعث افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه توسط اسید سالیسیلیک به‌عنوان یک محرک مسیرهای بیوستز متابولیت‌های ثانویه موردنظر در گیاه دارویی بادرنجبویه شد.

#### منابع

1. Ahmadiyan, A., Ghanbari, A., and Gelavi, M. 2007. Effect of animal manure on quantitative and qualitative yield and chemical composition of essential oil in cumin (*Cuminum cyminum*). J. of Iran. Fiel. Cro. Res. 4: 2.207-216. (In Persian)
2. Akbarinia, A., Ghalavand, A., Sefidcon, F., Rezaee, M.B., and Sharifi, A. 2004. Study on the effect of different rates of chemical fertilizer, manure and mixture of them on seed yield and main, compositions of essential oil of Ajowan (*Trachyspermum copticum*). J. Pajohesh Sazandegi 61: 32-41. (In Persian)
3. Ali, M.B., Hahn, E.J., and Paek, K.Y. 2007. Methyl jasmonat and salicylic acid induced oxidative stress and accumulation of phenolic in *Panax ginseng* Bioreactor root suspension culture. J. Mole. 12: 607-621.
4. Angelov, P., and Condoret., J.S. 2007. Optimization of operational conditions of ethanol extraction of Rosmarinic acid from lemon balm (*Melissa officinalis* L.). chemistry book 5. University of Plovdiv, Bulgaria, Pp: 71-76.
5. Argyropoulos, D., and Müller, J. 2011. Effect of convective drying on quality of lemon balm (*Melissa officinalis* L.). Proc. Food Sci. 1: 1932-1939.
6. Azizi, M., Rezwaneh, F., Hassanzadeh Khayat, M., Lackzian, A., and Neamati, H. 2008. The effect of different levels of vermicompost and irrigation on morphological properties and essential oil content of German chamomile (*Matricaria recutita*) C.V. Goral. Iranian J. Medi. Arom. Plants. 24: 1.82-93. (In Persian)

7. Bagal, U.R., Leebens mack, J.H., Walter Lorenz, W., and Dean, J.F.D. 2012. The phenylalanine ammonia lyase (PAL) gene family shows a gymnosperm specific line age. *BMC Genoms.* 13: 3. 1471-2164.
8. Basta, A., Tzakou, O., and Couladis, M. 2005. Composition of the leaves essential oil of *Melissa officinalis* L. from Greece. *Flav. Frag. J.* 20: 642-644.
9. Bayat, H., Mardani, H., Arouie, H., and Salahvarzi, Y. 2011. Effects of salicylic acid on morphological and physiological characteristics of cucumber seedling (*Cucumis sativus* cv. Super Dominus) under drought stress. *J. Plant Prod.* 18: 3. 63-76. (In Persian)
10. Chatterjee, S.K. 2002. Cultivation of medicinal and aromatic plants in India, a commercial approach. *Acta Horti.* 576: 191-202.
11. Chavez, M.M., Maroco, J.P., and Periera, S. 2003. Understanding plant responses to drought from genes to the whole plant. *Fun. Plant Bio.* 30: 239-264.
12. Chen, H., Chen, F., Zhang, Y-L., and Song, J-Y. 1999. Production of lithospermic acid B., and rosmarinic acid in hairy root cultures of *Salvia miltiorrhiza*. *J. Indu. Mic. Biot.* 22: 133-138.
13. Ebrahimzadeh, M.A., Navai, S.F., and Dehpour, A.A. 2011. Antioxidant activity of hydroalcoholic extract of *Ferula gummosa* Boiss roots. *US Nati. Lib. of Med. Nati. Inst. Heal.* 15: 6. 658-664.
14. El sherbeny, S.E., Khalil, M.Y., and Naguib, N.Y. 2005. Influence of compost level and suitable spacing on produce of *Sideritis montana* plants, recently cultivated under Egyptation conditional. *Bull. Fac. Agric. Caio. Univ.* 56: 373-392.
15. El Tayeb, M.A. 2005. Response of barley grains to the interactive effect of salinity and salicylic acid. *Plant Grow. Reg.* 45: 215-224.
16. Emami, S., and Hosseini, M. 2007. Cultivation and Production of Certain Herbs and Spices. Tehran Univ. Press, 300p. (In Persian)
17. Fallahi, J., Koocheki, A., and Rezvani Moghaddam, P. 2008. Investigating the Effects of Organic Fertilizers on Quantity Index and the Amount of Essential oil and Chamazulene in Chamomile (*Matricaria recutita*). *Res. Agri.* 8: 157-168. (In Persian)
18. Gharib, F.A.E. 2007. Effect of salicylic acid on the growth, metabolic activities and oil content of basil and marjoram. *Inter. J. Agri. Biol.* 9: 2. 294-301.
19. Ghassemi Dehkordi, N. 2002. Iranian Herbal Pharmacopoeia. Vice-Chancellor in Food and Drugs Affairs Press, 795p. (In Persian)
20. Haiati, P., and Rowshan, V. 2013. Effects of exogenous salicylic acid on growth factors and quality and quantity of essential oil in *Satureja hortensis* L. *Iran. J. Medi. Aro. Plants.* 29: 4. 808-817. (In Persian)
21. Hashemi, M., and Mirdehghan, S.H. 2014. Effect of salicylic acid, methyl jasmonate and some essential oils on quality and vase-life carnation cut flower

- 'Cano cultivar' in different temperatures. J. Plant Prod. 21: 3. 75-95. (In Persian)
22. Hassanzadeh, K., Ahmadi, M., and Shaban, M. 2014. Effect of pre-treatment of lemon balm (*Melissa officinalis* L.) seeds on seed germination and seedlings growth under salt stress. Inter. J. Plant, Ani. Environ. Sci. 4: 3. 260-265.
23. Ismail, A.E.L., Chandour Enayat, M., Desouky, Yehia, G.M., Galal, Rawahia, A., Arafa, Abeer, and Abouseer, M.H. 2009. Effect of bio fertilizers and organic phosphorus amendments on growth and essential oil of marjoram (*Marjoram hortensis* L.). J. Biol. Sci. 1: 1. 29-36.
24. Jabbarzadeh, Z., Khosh-Kkhu, M., and Salehi, H. 2009. The effect of foliar applied salicylic acid on flowering of African violet. Aust. J. Bas. and Appl. Sci. 3: 4. 4693-4696.
25. Kang, G. 2003. Salicylic acid changes activities of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> metabolizing and increase the chilling tolerance of banana seedling. Envi. Exper. Botany. 50: 9-15.
26. Khalil, M.Y. 2006. How far would *plantago afra* L. Respond to bio and manure amendment. Agri. Biol. Sci. 2: 11. 12-21.
27. Khalil, M.Y. 2002. Influence of compost and foliar fertilization on growth and chemical composition of *Rosmarinus officinalis*. Egypt. J. Appl. Sci. 17: 884-699.
28. Kiani, Z., Esmaeilpour, B., Hadian, J., Soltani Toolarood, A.A., and Fathololumi, S. 2014. Effect of organic fertilizers on growth properties nutrient absorption and essential oil yield of medicinal plant of spearmint (*Mentha spicata* L.). J. Plan. Prod. 21: 4. 63-80. (In Persian)
29. Koocheki, A. 2005. Principles of Agricultural Organic. Ferdowsi Univ. Mashhad Press, 385p. (In Persian)
30. Kovacik, J., Gruz, J., Backor, M., Strand, M., and Repcak, M. 2009. Salicylic acid induced changes to growth and phenolic metabolism in *Matricaria chamomilla* plant. Plant cell Rep. 28: 135-143.
31. Mahshwari, S.K., Sharma, R.L., and Gangrade, R.K. 2000. Performance of isobgol or blond psyllium (*Plantago ovata*) under different level of nitrogen, phosphorous and bio fertilizers in shallow black soil. Ind. J. Agron. 45: 2. 443-446.
32. Mateo, A.F.D., Mahlenbock, P., Kular, B., Mullineaux, P.M., and Karpinski, S. 2006. Controlled levels of salicylic acid are required for optimal photosynthesis and redox homeostasis. J. Exp. Bota. 57: 8. 1795-1807.
33. Mc Cue, P., and Shetty, K. 2004. Inhibitory effects of rosmarinic acid extracts on porcine pancreatic amylase *in vitro*. Asi. Paci. J. Cli. Nut. 13: 1. 101-106.
34. Mitchell, A.A., Hang, Y.J., Koh, E., Barret, D.M., Baryant, D.E., Dension, R.F., and Kaffka, S. 2007. Ten- year's comparison of the influence and conventional

- crop management practices on the content of flavonoid in Tomato. Agric. Food Chem. 55: 6154-6159.
35. Mona, Y., Kandil, M.A.M., and Swaefy Hend, M.F. 2008. Effect of three different compost levels on fennel and salvia growth character and their essential oils. Rese. J. Agri. Biol. Sci. 4: 34-39.
36. Omidbaigi, R. 2010. Approaches to Production and Processing of Medicinal plants. Beh Nashr Press, 347p. (In Persian)
37. Omidbaigi, R. 2011. Approaches to Production and Processing of Medicinal plants. Beh Nashr Press, 400p. (In Persian)
38. Omidbaigi, R., Sefidkon, F., and Kazemi, F. 2003. Roamn chamomile oil Comparison between hydro distillation and supercritical fluid extraction. J. Essen. Oil Bear. Plant. 6: 3. 191-194.
39. Park, S., Uddin, M., Xu, H., Yong Kyoung, K., and Lee, S. 2008. Biotechnological applications for rosmarinic acid production in plant. Afri. J. Biot. 7: 25. 4959-4965.
40. Pastirova, A., Repack, M., and Eliasora, A. 2004. Salicylic acid induces change coumarin metabolites in *Matricaria chamomilla* L. Plan. Sci. 167: 4. 824-830.
41. Petersen, M., Abdullah, Y., Benner, J., Eberle, D., Gehlen, K., Hucherig, S., Janiak, V., Kim, K.H., Sander, M., Weitzel, C., and Wolters, S. 2009. Review: Evolution of Rosmarinic acid biosynthesis. Phytoche. 70: 1663-1679.
42. Rahimi, A.R., Mashayekhi, K., Hemmati, Kh., and Dordipour, E. 2009. Effect of salicylic acid and mineral nutrition on fruit yield and yield components of Coriander (*Coriandrum sativum* L.). J. Plan. Prod. 16: 4. 149-156. (In Persian)
43. Sadighi, H., and Roustaa, K. 2003. Factors Affecting Sustainable Agricultural Knowledge of Exemplary Corn Growers in the Province of Fars, Iran. Iran. J. Agri. Sci. 34: 4. 924-913. (In Persian)
44. Saeb, K., and Gholamrezaee, S. 2012. Variation of essential oil composition of *Melissa officinalis* L. leaves during different stages of plant growth. Asi. Paci. J. Trop. Biom.: 547-549.
45. Samadi, S., Ghasemnezhad, A., and Alizadeh, M. 2014. Investigation on phenylalanine ammonia-lyase activity of artichoke (*Cynara scolymus* L.) affected by methyl jasmonate and salicylic acid in in-vitro conditions. J. Plan. Prod. 21: 4. 135-148. (In Persian)
46. Sanches Govin, E., Rodrigues Gonzales, H., Carballo Guerra, C., and Milanés Figueredo, M. 2005. Influencia de los abonos organicosy biofertilizantes en la calidad de las especies medicinales *Calendula officinalis* L.y *Matricaria recutita* L. Rev. Cub. de Plant. Medic. 10: 1. 1-8. (In Spanish)
47. Singh, B., and Usha, K. 2003. Salicylic acid induced physiological and biochemical changes in wheat seedlings under water stress. Plan. Grow. Reg. 39: 137-141.

48. Tam, A., Brien, O., and Allen, V.B. 1996. Growth of peppermint in compost. *Herb, Spic. Medi. Plants*. 4: 19-27.
49. Tanu, A., Prakash, A., and Adholeya, A. 2004. Effect of different organic manures composts on the herbage and essential oil yield of *Cymbopogon winterianus* and their influence on the native AM population in a marginal population in a marginal alfisol. *Biores. Tech*. 92: 311-319.
50. Vildova, A., Stolcova, M., Kloucek, and Orsak, P.M. 2006. Quality characterization of chamomile (*Matricaria recutita L.*) in Organic and Traditional Agricultures. *Inter. Symp. on Chamomile Rese., Develop. Prod. Presov*, Pp: 81-82.