https://ijpb.ui.ac.ir/?lang=en
Journal of Plant Biological Sciences
E-ISSN: 3041-9603
Vol. 16, Issue 3, No. 61, 2024
Document Type: Research Paper
Received: 01/07/2025 Accepted: 20/09/2025

Effect of culture filtrate and *Serendipita indica* cell homogenate on content and chemical composition of essential oil and some physiological traits of lemon balm (*Melissa officinalis* L.)

Maryam Kiani[1], Mohammad Abdoli[1] *, Mehdi Ghabooli[1]
[1] Department of Plant Production and Genetics, Faculty of Agriculture, Malayer University, Malayer, Iran

Abstract
Lemon balm (*Melissa officinalis* L.) is a perennial herb that has antioxidant, anti-bacterial, anti-inflammatory, antifungal, and antitumor activities. The present study aimed to investigate the effect of foliar application of culture filtrate (0 and ½ v/v), *Serendipita indica* cell homogenate (20, 40, 80, and 160 mg/L), and their combined effect on the content and chemical composition of essential oil and some physiological traits of lemon balm in a completely randomized design with three replications. A total of 38 compounds were identified in *M. officinalis* essential oils, with the major constituents being citronellal, γ-3-carene, trans-carveol, citral, and linalool (total 25.77 to 40.20%), respectively. The results showed that the effect of treatments on the content of major components of lemon balm essential oil was highly significant at the 1% probability level. The highest essential oil content (0.28%) and major compounds, including citronellal, trans-carveol, citral, and linalool (32, 56, 58, 74, and 63% higher than those in the control plants, respectively) were obtained by ½ culture filtrate plus 160 mg/l cell homogenate treatment. The lowest amount was received in the control treatment (without elicitor). The results showed that the type and amount of these elicitors significantly affected the amount of chlorophyll a, chlorophyll b, total chlorophyll, carotenoids, soluble sugar, malondialdehyde content, proline, and flavonoids compared to the control. Citral showed a positive and significant correlation with citronellal, trans-carveol, and linalool ($p \leq 0.01$). The heatmap for the studied traits showed a distinct clustering between the control and the treatments of these elicitors. Overall, foliar application of *S. indica* culture filtrate and cell homogenate is suggested as a biotic elicitor to improve the production of *M. officinalis* essential oil and its major compounds.

Keywords: Citronellal, Elicitor, Endophytic fungus, Essential oil, *Melissa officinalis*

*Corresponding author: Abdoli_m@malayeru.ac.ir

3041-9603 © University of Isfahan
This is an open access article under the CC BY-NC-ND/4.0/ License (https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).
doi: 10.22108/IJPB.2025.145810.1413

Introduction

Lemon balm (*Melissa officinalis* L.) is a perennial herb that has antioxidant, anti-bacterial, anti-inflammatory, antifungal, and antitumor activities. Unlike other plants of the Lamiaceae family, the essential oil content of lemon balm is relatively low; therefore, it has become one of the most valuable types of essential oils. The use of elicitors can be a suitable approach to increase the production of valuable secondary metabolites in medicinal and aromatic plants. The endophytic fungus, *Serendipita indica* stimulates the growth of many plant species and also increases the production of secondary metabolites. The present study aimed to investigate the effect of foliar application of culture filtrate and *S. indica* cell homogenate and their combined impact on the content and chemical composition of essential oil and some physiological traits of *M. officinalis*.

Materials and Methods

The present study was conducted in a completely randomized design with 10 treatments and three replications in the research greenhouse of Malayer University. The experimental treatments included foliar application with culture filtrate (0 and ½ v/v), *S. indica* cell homogenate (20, 40, 80, and 160 mg/L), and the combined effect of ½ culture filtrate with 20, 40, 80, and 160 mg/L of *S. indica* cell homogenate. Autoclaved *S. indica* culture medium was used as culture filtrate, and powdered mycelium sediment dissolved in distilled water was used as cell homogenate. The control treatment (0 v/v culture filtrate) was sprayed with distilled water. Foliar application of the biotic elicitors on *M. officinalis* aerial parts was performed at the 40% flowering stage. Five days after elicitation with culture filtrate and *S. indica* cell homogenate, aerial parts of treated and control plants were sampled to determine biochemical and physiological traits. The content and chemical composition of essential oil, as well as some physiological traits including chlorophyll a, chlorophyll b, total chlorophyll, carotenoids, proline, malondialdehyde content, soluble sugars, total phenols, and flavonoids were measured. The composition of the essential oils was determined by gas chromatography-mass spectroscopy (GC/MS). The correlation coefficient (r) between measured traits was estimated using the Pearson method.

Results and Discussion

A total of 38 compounds were identified in *M. officinalis* essential oils, with citronellal, γ-3-carene, trans-carveol, citral, and linalool being the major constituents (total 25.77 to 40.20%). The results of analysis of variance (ANOVA) showed that the effects of treatments consisting of different concentrations of culture filtrate, *S. indica* cell homogenate, and their combined effects on the content of major components of lemon balm essential oil were highly significant at the 1% probability level. The highest essential oil content (0.28%) and major compounds, including citronellal, trans-carveol, citral, and linalool (32, 56, 58, 74, and 63% higher than those in the control plants, respectively) were obtained by ½ culture filtrate plus 160 mg/l cell homogenate treatment. The lowest amount was obtained in the control treatment (without elicitor). The results showed that the type and amount of these elicitors significantly affected the amount of chlorophyll a, chlorophyll b, total chlorophyll, carotenoids, soluble sugar, malondialdehyde content, proline, and flavonoids compared to the control. The results of correlation between different traits showed that the amount of essential oil had a positive and significant correlation at the 1% probability level with the major essential oil compounds including citronellal ($r=0.986^{**}$), trans-carveol ($r=0.976^{**}$), linalool ($r=0.971^{**}$), and citral ($r=0.962^{**}$) and a negative and significant correlation with γ-3-carene ($r=-0.976^{**}$). Also, citral showed a positive and significant correlation with citronellal, trans-carveol, and linalool ($P\leq 0.01$). The heatmap results show that for the essential oil content and the major compounds, including citronellal, trans-carveol, citral, and linalool, the best result was obtained by the treatment of ½ culture filtrate+160 mg/L cell homogenate.

Conclusion

The current study provided evidence that *M. officinalis* is a medicinal plant that is well responsive to foliar application of culture filtrate and *S. indica* cell homogenate applied either alone or together. The results of the heatmap for the studied traits showed that the treated plants could be grouped into three distinct clusters and showed a clear separation between the control and the treatments of these elicitors. Overall, the results indicated that foliar application of *S. indica* culture filtrate and cell homogenate is suggested as a biotic elicitor to improve the production of *M. officinalis* essential oil and its major compounds, including linalool, trans-carveol, citronellal, and citral.

علوم زیستی گیاهی، سال شانزدهم، شمارهٔ پیاپی شصت و یکم، ۱۴۰۳، صفحهٔ ۹۵- ۱۲۰
تاریخ دریافت مقاله: ۱۴۰۴/۰۴/۱۰
تاریخ بررسی مجدد: ۱۴۰۴/۰۶/۲۲
تاریخ پذیرش نهایی: ۱۴۰۴/۰۶/۲۹
مقاله پژوهشی

تأثیر عصاره کشت و هموژنایت سلولی قارچ *Serendipita indica* بر میزان و ترکیب شیمیایی اسانس و برخی صفات فیزیولوژیکی بادرنجبویه (*Melissa officinalis* L.)

مریم کیانی[۱]، محمد عبدلی[۱]*، مهدی قبولی[۱]
[۱]گروه تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ملایر، ملایر، ایران

چکیده

بادرنجبویه (*Melissa officinalis* L.) گیاهی چند ساله است که دارای فعالیت‌های آنتی اکسیدانی، ضد باکتریایی، ضد التهابی، ضد قارچی و ضد سرطانی است. پژوهش حاضر، با هدف بررسی تأثیر محلول‌پاشی عصاره کشت (۰ و ½ حجمی/حجمی)، هموژنایت سلولی قارچ *Serendipita indica* (۲۰، ۴۰، ۸۰ و ۱۶۰ میلی‌گرم در لیتر) و اثر توام آنها بر ترکیب شیمیایی، میزان اسانس و برخی صفات فیزیولوژیکی بادرنجبویه در قالب طرح کاملاً تصادفی در سه تکرار انجام شد. در اسانس بادرنجبویه، ۳۸ ترکیب شناسایی شد که عمده‌ترین آنها به‌ترتیب سیترونلال، گاما-۳-کارن، ترانس-کاروئول، سیترال و لینالول (در مجموع ۲۵/۷۷ تا ۴۰/۲۰ درصد) بودند. نتایج نشان دادند اثر تیمارها بر میزان ترکیبات عمده بادرنجبویه در سطح احتمال ۱ درصد بسیار معنی‌دار بود. بیشترین محتوای اسانس (۰/۲۸ درصد) و ترکیبات عمده اسانس بادرنجبویه شامل سیترونلال، ترانس-کاروئول، سیترال و لینالول (به‌ترتیب ۳۲، ۵۶، ۵۸، ۷۴ و ۶۳ درصد بیشتر از گیاهان شاهد) توسط تیمار ½ عصاره کشت+۱۶۰ میلی‌گرم در لیتر هموژنایت سلولی و کمترین آنها در تیمار شاهد (بدون محرک) بدست آمد. نتایج نشان دادند نوع و مقدار این محرک‌ها، به‌طور معنی‌داری بر میزان کلروفیل a، کلروفیل b، کلروفیل کل، کاروتنوئیدها، قندهای محلول، محتوای مالون‌دی‌آلدهید، پرولین و فلاونوئیدها نسبت به شاهد تأثیر گذاشت. سیترال با سیترونلال، ترانس-کاروئول و لینالول همبستگی مثبت و معنی‌دار نشان داد ($P\leq0.01$). نقشه حرارتی برای صفات مورد بررسی، بین شاهد و تیمارهای این محرک‌ها خوشه‌بندی متمایزی نشان داد. در مجموع، کاربرد برگی عصاره کشت و هموژنایت سلولی قارچ *S. indica* به‌عنوان یک محرک زیستی برای بهبود تولید اسانس بادرنجبویه و ترکیبات عمده آن پیشنهاد می‌شود.

واژه‌های کلیدی: اسانس، بادرنجبویه، سیترونلال، قارچ اندوفیت، محرک

*Corresponding author: Abdoli_m@malayeru.ac.ir

3041-9603 © University of Isfahan
This is an open access article under the CC BY-NC-ND/4.0/ License (https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).
doi: 10.22108/IJPB.2025.145810.1413

مقدمه

بادرنجبویه (*Melissa officinalis* L.) گیاهی چند ساله و معطر با عطری شبیه لیمو، متعلق به خانواده نعناعیان (Lamiaceae) است (Son et al., 2021). این گیاه حاوی اسیدهای فنولیک، فلاونوئیدها، تری‌ترپن‌ها و ترکیبات فرار هستند که ارزش اقتصادی بالایی دارند و به همین علّت به‌طور گسترده در سراسر جهان از آن استفاده می‌شود (Petrisor et al., 2022; Shakeri et al., 2016). در طب سنتی، اسانس و عصاره بادرنجبویه برای درمان افسردگی، بی‌خوابی، نارسایی قلبی، حساسیت‌های مفرط، سوءهاضمه و قولنج استفاده می‌شود (Ulgen et al., 2021; Miraj et al., 2017). همچنین، این گیاه دارای خواص آنتی‌اکسیدانی، آرام بخشی، ضد باکتری، ضد قارچی، ضد ویروسی، ضد اسپاسم، ضد نفخ، ضد التهابی و ضد سرطانی است (Behbahani & Shahidi, 2019; Ghasemi Pirbalouti et al., 2019; Petrisor et al., 2022). از بین انواع مختلفی از متابولیت‌های ثانویه که در شاخساره‌های بادرنجبویه شناسایی شده است، اسانس و رزمارینیک اسید دو گروه اصلی ترکیبات آن گیاه دارویی هستند (Schilcher, 2016). اسانس‌ها، متابولیت‌های ثانویه فرار با ساختارهای پیچیده‌ای هستند که اغلب از گیاهان معطر مختلف توسط روش تقطیر با آب به دست می‌آیند (Edris, 2007). برخلاف سایر گیاهان خانواده نعناعیان، محتوای اسانس بادرنجبویه نسبتاً کم است (Mrlianová et al., 2002)؛ به همین علّت تبدیل به یکی از ارزشمندترین انواع اسانس‌ها شده است. محتوای اسانس در برگ‌های خشک بادرنجبویه از ۰/۰۲ تا ۰/۴۰ درصد متغیر است (Silva et al., 2021). مهمترین ترکیبات تشکیل دهنده‌ی اسانس این گیاه، سیترال، سیترونلال و لینالول هستند (Yadegari, 2016). بوی این گیاه به علّت وجود سیترال در اسانس آن، شبیه بوی لیمو است (Silva et al., 2021).

گیاهان دارویی و معطر به‌عنوان منابع ارزشمندی برای استفاده در صنایع دارویی، غذایی و آرایشی عمل کرده‌اند. به‌عبارت دیگر، آنها به‌عنوان مواد اولیه در صنایع، به‌ویژه در صنعت داروسازی هستند (Albayrak et al., 2024). کیفیت این گیاهان که برای تولید داروهای ارزشمند استفاده می‌شوند، معمولاً با میزان متابولیت‌های ثانویه آنها ارزیابی می‌شود (Kuzel et al., 2009). متابولیت‌های ثانویه تولید شده در واحد زیست توده گیاهان معطر از اهمیت اقتصادی زیادی برخوردار هستند. این ترکیبات طبیعی به مقدار کمی تولید می‌شوند و تولید آنها به‌طور معنی‌داری به مرحله رشد و توسعه و وضعیت فیزیولوژیکی گیاه بستگی دارد (Twaij & Hasan, 2022).

روش‌های مختلفی برای بهبود کمی و کیفی گیاهان دارویی و معطر وجود دارد که یکی از رویکردهای مناسب و مؤثر برای افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه ارزشمند، استفاده از محرک‌های زیستی و غیر زیستی هستند که منجر به فعال‌سازی ژن‌ها و آنزیم‌های دخیل در مسیرهای بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه می‌شوند (Albayrak et al., 2024; Kumari et al., 2020). محرک‌ها، مواد شیمیایی یا عوامل زیستی مختلفی هستند که با افزودن مقادیر کم آنها به یک سیستم سلولی زنده، می‌توانند سبب عکس‌العمل‌های فیزیولوژیکی، ریخت شناسی، تجمع و افزایش فیتوالکسین‌ها شوند و بیوسنتز ترکیبات خاصی آغاز یا افزایش یابند (Namdeo, 2007). محرک‌ها سیگنال‌هایی تولید می‌کنند که سبب تحریک تشکیل متابولیت‌های ثانویه می‌شوند و می‌توان جهت تولید اقتصادی متابولیت‌ها از آنها استفاده نمود. در همین راستا، در چندین پژوهش، اثر محرک‌های مختلف از قبیل متیل جاسمونات، سالیسیلیک اسید، عصاره مخمر، فنیل آلانین، منابع نوری و غیره بر تحریک بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه در بادرنجبویه بررسی شده است (Ghasemi Pirbalouti et al., 2019; Baharlou et al., 2019; Hedayati & Abdoli, 2021; Yadegari, 2016;

(Ahmadi et al., 2021). در پژوهشی، اثر محلول‌پاشی عصاره مخمر و اسید سالیسیلیک بر افزایش محتوای و اجزای اصلی اسانس بادرنجبویه بررسی شد و ۳۹ ترکیب در اسانس آن شناسایی شد که به ترتیب سیترونلول، ترانس-کاروئول، گاما-۳-کارن، لینالول، سیترال و کارواکرول استات اجزای اصلی بودند. همچنین نتایج نشان داده اند نوع و غلظت محرک بر صفات مذکور تأثیر معنی-داری داشت (Hedayati & Abdoli, 2021). محتوای اسانس و ترکیب آن تحت تأثیر عوامل متعددی از جمله ژنوتیپ، شرایط جغرافیایی، زمان برداشت، شرایط نگهداری، روش خشک کردن و استخراج است (Ghasemi Pirbalouti et al., 2019; Ahmadi et al., 2021; Mehrpooya et al., 2021).

قارچ *Serendipita indica* (نام قبلی *Piriformospora indica*) که به‌راحتی بر روی محیط کشت مصنوعی قابل کشت است، با برقراری رابطه همزیستی با طیف وسیعی از گیاهان میزبان، قادر است ضمن تحریک رشد گیاه، جذب مواد غذایی را بهبود داده و مقاومت به تنش‌های زیستی و غیر زیستی را افزایش دهد (Ghabooli et al., 2013). این قارچ اندوفیت، علاوه بر افزایش جذب عناصر غذایی بویژه فسفر، سبب تولید هورمون‌های اکسین و سیتوکنین، افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدانی و افزایش تجمع اسمولیت‌ها می‌شود (Teimory et al., 2021). با وجود این‌که پتانسیل و نقش مفید همزیستی قارچ *S. indica* در بهبود عملکرد و سایر صفات در گیاهان مختلف مورد بررسی قرار گرفته است، امّا با توجه به بررسی منابع و بر اساس دانش ما، تاکنون پژوهشی درباره اثر قارچ *S. indica* به‌عنوان محرک بر میزان و ترکیبات اسانس اندام‌های هوایی، همچنین برخی صفات فیزیولوژیکی گیاه دارویی بادرنجبویه انجام نشده است. بنابراین هدف این پژوهش، بررسی اثر محلول‌پاشی غلظت‌های مختلف عصاره کشت و هموژنایت سلولی قارچ *S. indica* (به تنهایی یا ترکیبی) برای نخستین بار به‌عنوان محرک بر محتوای و درصد ترکیبات اسانس اندام‌های هوایی بادرنجبویه در شرایط گلخانه است. علاوه بر این، برخی شاخص‌های فیزیولوژیکی از جمله میزان رنگیزه‌های فتوسنتزی، قندهای محلول، محتوای مالون‌دی‌آلدهید، اسید آمینه پرولین، فنل و فلاونوئید کل تحت تاثیر این محرک‌ها مورد سنجش قرار گرفتند.

مواد و روش‌ها

کشت گیاهان

این پژوهش در گلخانه تحقیقاتی دانشکده کشاورزی دانشگاه ملایر واقع در کیلومتر ۴ جاده اراک با موقعیت عرض جغرافیایی ۳۴ درجه و ۱۷ دقیقه شمالی و طول جغرافیایی ۴۸ درجه و ۴۹ دقیقه شرقی با ارتفاع متوسط ۱۷۲۵ متر از سطح دریا انجام شد. بذرهای گیاه دارویی بادرنجبویه (*Melissa officinalis* L.) با شماره کد ۱۱۴۳۰ از شرکت پاکان بذر اصفهان تهیه شدند (http://www.pakanbazr.com). برای انجام آزمایش، بذرها در گلدان‌های پلاستیکی (قطر دهانه ۲۰ سانتی‌متر و ارتفاع ۲۵ سانتی‌متر) حاوی مخلوط یکنواخت خاک (خاک رس، خاک برگ و ماسه هر کدام یک قسمت) کاشته شدند. در هر گلدان (واحد آزمایشی) ۱۰-۱۵ عدد بذر به صورت سطحی و در عمق ۱- ۰/۵ سانتی‌متری کاشته شدند و لایه‌ای نازک از کود دامی پوسیده روی آنها ریخته شد و بلافاصله آبیاری صورت گرفت. پنج بوته در هر گلدان در مرحله ۴ برگی نگهداری شدند. گیاهان در طول مدت آزمایش در گلخانه با نور طبیعی، دمای بین ۲۲ تا ۲۸ درجه سانتی‌گراد و رطوبت نسبی حدود ۶۰ درصد رشد کردند.

کشت قارچ اندوفیت و آماده سازی محرک‌ها

در این پژوهش، از عصاره کشت و هموژنایت سلولی اتوکلاو شده به‌عنوان دو محرک بر روی گیاهان بادرنجبویه استفاده شد. قارچ *S. indica* (شناسه DSM11827) از آزمایشگاه ژنتیک و تولید گیاهی دانشکده کشاورزی دانشگاه ملایر تهیه شد. جهت آماده-سازی محرک‌ها، کشت اولیه قارچ اندوفیت *S. indica* انجام شد و به مدت ۴ هفته در دمای ۲±۲۸ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت (Ghabooli et al., 2013). برای تهیه میسلیوم، دیسک‌های فعال قارچ که بر روی محیط کشت پیچیده جامد (Complex medium) حاوی گلوکز ۲۰ گرم، محلول نمک $NaNO_3$, KCl, $MgSO_4.7H_2O$, (KH_2PO_4) ۵۰ میلی لیتر، محلول ریزمغذی‌ها $MnCl_2.4H_2O$, H_3BO_3, $ZnSO_4.7H_2O$, $(Na_2MoO_4.2H_2O$, KI, $CuSO_4.5H_2O)$ ۱ میلی لیتر، عصاره مخمر ۱ گرم، پپتون ۲ گرم، کازئین هیدرولیزات ۱ گرم و آگار ۱۵ گرم در لیتر کشت شده بود (Hill & Käfer, 2001) به ارلن‌های ۲۵۰ میلی‌لیتری حاوی ۱۰۰ میلی‌لیتر محیط کشت Hill & Käfer (2001) مایع انتقال یافت و روی دستگاه تکان دهنده با سرعت ۱۵۰ دور در دقیقه در دمای ۲± ۲۸ درجه سانتی‌گراد، به مدت ۱۰-۷ روز قرار گرفت. پس از رشد قارچ، ارلن‌های حاوی محیط کشت، اتوکلاو شدند (دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه). جهت جداسازی توده سلولی از محیط کشت مایع، از کاغذ صافی واتمن شماره ۱ استفاده شد. برای حذف باقیمانده محیط کشت، توده سلولی با آب مقطر شستشو و در تاریکی و دمای اتاق خشک شدند؛ سپس به‌خوبی با هاون پودر شدند و توسط ترازوی دیجیتالی وزن آنها اندازه‌گیری شد. محیط کشت اتوکلاو شده قارچ، به‌عنوان عصاره کشت و رسوب پودر شده‌ی میسلیوم جهت استفاده در سوسپانسیون میسلیوم به عنوان هموژنایت سلولی مورد استفاده قرار گرفت. از عصاره کشت قارچ در ترکیب با آب مقطر به صورت محلول پاشی برگی استفاده شد.

طرح آزمایشی و اعمال تیمارها

این پژوهش، به صورت طرح کامل تصادفی در ۳ تکرار (سه گلدان) انجام شد. در مجموع ۱۰ تیمار شامل محلول-پاشی با عصاره کشت (۰ و ½ حجمی/حجمی)، هموژنایت سلولی (۲۰، ۴۰، ۸۰ و ۱۶۰ میلی‌گرم در لیتر) و اثر توام ½ عصاره کشت با ۲۰، ۴۰، ۸۰ و ۱۶۰ میلی‌گرم در لیتر هموژنایت سلولی قارچ *S. indica* اعمال شد. محلول‌پاشی تیمار شاهد (۰ حجمی/حجمی عصاره کشت) با آب مقطر انجام شد. در مرحله نموی حدود ۴۰ درصد گلدهی گیاهان (Hedayati & Abdoli, 2021)، اقدام به محلول‌پاشی عصاره کشت و هموژنایت سلولی قارچ *S. indica* اتوکلاو شده روی اندام‌های هوایی بادرنجبویه شد (شکل ۱). محلول‌پاشی توسط محلول‌پاش دستی و در اوایل صبح تا خیس شدن کامل سطح برگها اعمال شد.

شکل ۱-گیاهان بادرنجبویه آماده برای تیمار با عصاره کشت و هموژنایت سلولی قارچ *S. indica*

Figure 1- Lemon balm plants ready for treatment with culture filtrate and *S. indica* cell homogenate

پنج روز پس از افشانه برگی عصاره کشت و هموژنایت سلولی، از اندام‌های هوایی گیاهان تیمارشده و همچنین گیاهان شاهد جهت تعیین شاخص‌های فیزیولوژیک و بیوشیمیایی نمونه‌برداری صورت گرفت. شاخص‌های

فیزیولوژیکی زیر شامل میزان رنگیزه‌های فتوسنتزی (کلروفیل a، کلروفیل b، کلروفیل کل و کاروتنوئیدها) مطابق با روش Lichtenthaler (1987)، قندهای محلول با روش Irigoyen et al. (1992)، محتوای مالون‌دی‌آلدهید (MDA) Heath & Paker (1968)، اسید آمینه پرولین Bates et al. (1973)، فنل کل Ronald & Laima (1999) و فلاونوئید کل Chang et al. (2002) مورد سنجش قرار گرفتند. همچنین بخشی از اندام‌های هوایی بادرنجبویه در دمای اتاق در مجاورت جریان هوا و سایه، به‌طور کامل خشک شدند و جهت تعیین میزان تغییرات در محتوای و اجزای اسانس، استفاده شدند.

جداسازی و شناسایی ترکیب‌های شیمیایی اسانس

پس از خرد کردن شاخساره‌های گیاه هر نمونه‌توسط روش تقطیر با آب و به‌وسیله دستگاه کلونجر، اقدام به استخراج اسانس گیاه شد. مدت زمان استخراج اسانس برای همه نمونه‌ها به‌طور یکسان سه ساعت بود و در دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد صورت گرفت. اسانس بدست آمده از هر نمونه، توسط ماده رطوبت‌گیر سولفات سدیم آبگیری شد و قبل از تعیین اجزای آنها، در شیشه تیره در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. محتوای اسانس بر اساس رابطه زیر محاسبه شد:

رابطه (۱):

محتوای اسانس (درصد) = [وزن اندام‌های هوایی خشک (گرم) / مقدار اسانس (میلی گرم)] × ۱۰۰

جهت شناسایی ترکیبات موجود در اسانس این گیاه، از دستگاه کروماتوگرافی گازی مجهز به طیف‌سنج جرمی (GC/MS) مدل Hewlett-Packard-5890 دارای سیستم تله یونی استفاده شد که در آن انرژی ذاتی که به نمونه برخورد می‌کند یا به عبارت دیگر، ولتاژ یونیزاسیون معادل ۷۰ الکترون ولت و دمای منبع یونیزاسیون ۲۵۰ درجه سانتی‌گراد بود. دستگاه مذکور دارای ستونی موئین به طول ۵۰ متر، قطر داخلی ۰/۲۰ میلی‌متر و ضخامت لایه داخلی ۲۵ میکرومتر و آشکارساز از نوع انتخابی جرمی (HP-5970 Mass-Selective Detector-USA) بود. بر اساس برنامه‌ریزی انجام‌شده، دمای ستون از ۱۰۰ تا ۲۵۰ درجه سانتی‌گراد با سرعت ۴ درجه سانتی‌گراد در دقیقه افزایش داده شد. نوع گاز حامل، هلیوم فوق خالص بود که با سرعت جریان ۱ میلی‌لیتر در دقیقه استفاده شد. شناسایی ترکیبات به کمک زمان بازداری آنها و توسط پیشنهاد کتابخانه کامپیوتری دستگاه کروماتوگرافی گازی متصل به طیف سنج جرمی، مقایسه ترکیبات با مقادیر منتشر شده در کتب مرجع و مقالات انجام گرفت. همچنین فراوانی (درصد) هر ترکیب اسانس با توجه به سطح زیر منحنی هر یک از پیک‌های کروماتوگرام و مقایسه آن با سطح کل زیر منحنی تعیین شد (Adams, 2007).

آنالیز آماری

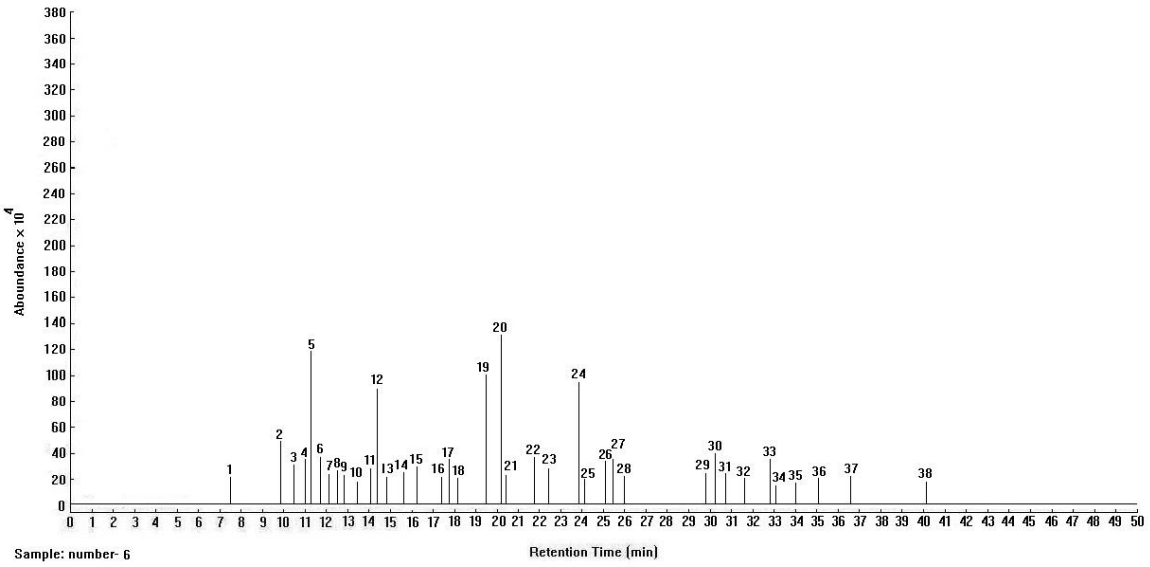
آزمایش در شرایط گلخانه و در قالب طرح کاملاً تصادفی در سه تکرار انجام شد. تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها توسط نرم افزار SPSS نسخه ۲۶ و مقایسه میانگین‌ها توسط آزمون چند دامنه دانکن در سطح احتمال ۱ درصد صورت گرفت. نتایج به صورت میانگین ± خطای استاندارد (SE) ارائه شد.جهت رسم نقشه حرارتی ارتباط بین شاخص‌های مورد بررسی، از نرم افزار ClustVis (https:llbiit.cs.ut.ee/clustvisl) استفاده شد. همچنین برای تجزیه و تحلیل بیشتر داده‌ها و نشان دادن الگوی ارتباطی میان تیمارهای اعمال شده با برخی صفات فیزیولوژیکی، میزان و ترکیبات اصلی اسانس اندام‌های هوایی بادرنجبویه، ماتریس ضرایب همبستگی پیرسون با نرم افزار PAST ver. 4.17 (Hammer & Harper, 2024) رسم شد.

نتایج

تاثیر محلول‌پاشی عصاره کشت و هموژنایت سلولی قارچ *S. indica* بر محتوای و ترکیب اسانس بادرنجبویه

شکل (۲) کروماتوگرام گازی نمونه اسانس استخراج شده از گیاه بادرنجبویه را نشان می‌دهد؛ همچنین در جدول (۱) اطلاعات حاصل درباره ترکیب‌های شیمیایی موجود در اسانس این گیاه دارویی و تغییرات آنها تحت تیمارها نشان داده شده است. در این پژوهش، در مجموع ۳۸ ترکیب شیمیایی مختلف توسط دستگاه کروماتوگرافی گازی متصل به طیف سنج جرمی (GC/MS) در اسانس اندام‌های هوایی بادرنجبویه شناسایی شد (جدول ۱). بر اساس نتایج این پژوهش، از بین ترکیب‌های شناسایی‌شده در اسانس تحت تأثیر تمام تیمارهای محلول‌پاشی، به‌ترتیب سیترونلال، گاما-۳-کارن، ترانس-کاروئول، سیترال و لینالول بیشترین درصد فراوانی را داشتند (در مجموع ۲۵/۷۷ تا ۴۰/۲۰ درصد). سیترونلال و گاما-۳-کارن به‌ترتیب با ۹/۵۰ و ۹/۲۰ درصد، فراوان‌ترین ترکیبات تشکیل دهنده اسانس بودند. از ۳۸ ترکیب شناسایی شده در اسانس بادرنجبویه که در جدول (۱) ارائه شده است، تنها روند تغییرات میزان پنج ترکیب عمده آن توضیح داده شد. نتایج جدول تجزیه واریانس نشان دادند تأثیر تیمارهای عصاره کشت و هموژنایت سلولی قارچ *S. indica* به‌طور جداگانه و ترکیبی بر تغییرات پنج ترکیب اصلی و سایر اجزای اسانس اندام‌های هوایی بادرنجبویه، در سطح احتمال ۱ درصد بسیار معنی‌دار بود (داده‌ها نشان داده نشده است). به‌عبارت دیگر، در بادرنجبویه تغییرات میزان سیترونلال، گاما-۳-کارن، ترانس-کاروئول، سیترال و لینالول به‌طور بسیار معنی‌داری تحت تأثیر نوع و مقدار این محرک‌ها قرار گرفتند. نتایج نشان داد که در تیمار ½ عصاره کشت، مقدار سیترونلال، ترانس-کاروئول، سیترال و لینالول در مقایسه با شاهد افزایش یافتند. محتوای سیترونلال، ترانس-کاروئول، سیترال و لینالول به‌ترتیب ۸/۰۰، ۶/۶۰، ۵/۵۰ و ۵/۶۰ (درصد) بودند که در مقایسه با شاهد به‌ترتیب ۳۱، ۳۲، ۴۱ و ۳۴ درصد افزایش یافتند (جدول ۱). با وجود این، مقدار گاما-۳-کارن در مقایسه با شاهد، ۱۶ درصد کاهش پیدا کرد. نتایج نشان داد مشابه با تأثیر عصاره کشت، هموژنایت سلولی نیز سبب افزایش مقدار سیترونلال، ترانس-کاروئول، سیترال و لینالول در مقایسه با شاهد شد؛ به‌طوری‌که به‌ترتیب حداکثر تا ۱۶، ۱۸، ۲۳ و ۲۲ درصد نسبت به شاهد افزایش یافتند. مشاهده شد با افزایش غلظت هموژنایت سلولی از ۲۰ به ۱۶۰ میلی‌گرم در لیتر، مقدار این چهار ترکیب افزایش پیدا کرد. نتایج مقایسه میانگین‌ها (جدول ۱) نشان دادند تیمار ترکیبی ½ عصاره کشت با سطوح مختلف هموژنایت سلولی نیز منجر به افزایش ترکیبات اصلی اسانس به استثناء گاما-۳-کارن شد. نتایج نشان داد در تیمارهای ترکیبی نیز با افزایش مقدار هموژنایت سلولی از ۲۰ به ۱۶۰ میلی‌گرم در لیتر، مقادیر ترکیبات عمده اسانس بادرنجبویه افزایش یافت. در تیمار ترکیبی ½ عصاره کشت+۱۶۰ میلی‌گرم در لیتر هموژنایت سلولی، مقدار سیترونلال، ترانس-کاروئول، سیترال و لینالول در مقایسه با شاهد افزایش یافت. محتوای سیترونلال، ترانس-کاروئول، سیترال و لینالول به‌ترتیب ۹/۵۰، ۷/۹۰، ۶/۸۰ و ۶/۸۰ (درصد) بود که در مقایسه با شاهد به‌ترتیب ۵۶، ۵۸، ۷۴ و ۶۳ درصد افزایش یافتند (جدول ۱) و کمترین آنها در تیمار شاهد (بدون محرک) بدست آمد. برعکس، تیمار ترکیبی ½ عصاره کشت+۱۶۰ میلی‌گرم در لیتر هموژنایت سلولی بر محتوای گاما-۳-کارن گیاهان اثر منفی داشت و در مقایسه با شاهد ۸۴ درصد کاهش یافت. عصاره کشت و هموژنایت سلولی قارچ *S. indica* به‌طور مجزا و همچنین تیمار ترکیبی عصاره کشت با سطوح مختلف هموژنایت سلولی قارچ *S. indica* سبب افزایش محتوای سیترونلال، ترانس-کاروئول، سیترال و لینالول در مقایسه با شاهد شدند. به‌طور کلی تحت تیمار سطوح مختلف عصاره کشت و هموژنایت سلولی قارچ *S. indica*، میزان سیترونلال از ۶/۱ تا ۹/۵

درصد، ترانس-کاروئول از ۵/۰ تا ۷/۹ درصد، سیترال از ۳/۹ تا ۶/۸ درصد، لینالول از ۴/۲ تا ۶/۸ درصد اسانس بوده است. کمترین میزان این ترکیبات مربوط به تیمار شاهد به‌ترتیب با ۶/۱، ۵، ۳/۹ و ۴/۲ درصد بود. همچنین نتایج این پژوهش، تغییرات محتوای اسانس (درصد) در اندام‌های هوایی بادرنجبویه تحت تأثیر عصاره کشت، هموژنایت سلولی و ترکیب هر دو (½ عصاره کشت+سطوح مختلف هموژنایت سلولی) را نشان داد ($P\leq0.01$). بیشترین مقدار اسانس (۰/۲۸ درصد) توسط تیمار ترکیبی ½ عصاره کشت+۱۶۰ میلی‌گرم در لیتر هموژنایت سلولی به دست آمد که ۳۲ درصد بیشتر از محتوای اسانس گیاهان شاهد در این شرایط آزمایشی بود (جدول ۱). نتایج نشان دادند به‌طور کلی تیمارهای ترکیبی ½ عصاره کشت به‌همراه سطوح مختلف هموژنایت سلولی نسبت به تیمارهای مجزای هموژنایت سلولی سبب بهبود میزان اسانس شده است. تأثیر مجزای مقادیر مختلف هموژنایت سلولی بر محتوای اسانس حداقل بود.



شکل ۲-کروماتوگرام GC/MS آنالیز اسانس بادرنجبویه تحت تأثیر تیمار ۸۰ میلی‌گرم در لیتر هموژنایت سلولی به‌همراه ½ عصاره کشت (محور افقی نمودار زمان و محور عمودی فراوانی است). شماره پیک ترکیبات اصلی بدین شرح است: γ-3-کارن (۵)، لینالول (۱۲)، ترانس کاروئول (۱۹)، سیترونلال (۲۰) و سیترال (۲۴).

Figure 2- GC/MS chromatogram of *M. officinalis* essential oil treated with 80 mg/l cell homogenate plus ½culture filtrate (horizontal axis of the graph is time and vertical axis is frequency). The peak number of major compounds are as follows: γ-3-carene (5), linalool (12), trans-carveol (19), citronellal (20), and citral (24).

جدول ۱- مقایسه میانگین تأثیر محلول‌پاشی عصاره کشت و هموژنایت سلولی قارچ *S. indica* بر ترکیب شیمیایی اسانس بادرنجبویه

Table 1- Mean comparison for effects of culture filtrate and *S. indica* cell homogenate on chemical composition of *M. officinalis* essential oil

Compounds (%)	Peak number	Retention time (min)	Treatments									
			Control	½CF (v/v)	CH_{20}-20 (mg/l)	CH_{40}-40 (mg/l)	CH_{80}-80 (mg/l)	CH_{160}-160 (mg/l)	½CF+CH_{20}	½CF+CH_{40}	½CF+CH_{80}	½CF+CH_{160}
1,3- octadiene	1	7.6	1.60^{bcd}	1.40^{d}	1.40^{d}	1.60^{bcd}	1.80^{b}	1.50^{cd}	1.70^{bc}	2.10^{a}	1.50^{cd}	2.10^{a}
Alpha-pinene	2	9.8	3.10^{bc}	2.80^{cd}	3.40^{ab}	2.80^{cd}	3.50^{a}	2.80^{cd}	2.60^{d}	3.10^{bc}	3.30^{ab}	2.93^{c}
1,Octen-3-ol	3	10.5	1.80^{e}	2.10^{bc}	2.20^{b}	2.00^{cd}	2.47^{a}	1.90^{de}	1.73^{e}	2.00^{cd}	2.20^{b}	1.80^{e}
Myrcene	4	11.0	2.50^{bc}	3.00^{a}	2.00^{ef}	2.30^{cd}	1.90^{f}	2.40^{bcd}	2.40^{bcd}	2.20^{de}	2.40^{bcd}	2.60^{b}
γ-3-Carene	5	11.3	**9.20^{a}**	**7.70^{de}**	**8.70^{bc}**	**8.80^{b}**	**8.40^{c}**	**8.40^{c}**	**7.80^{d}**	**7.40^{ef}**	**7.30^{f}**	**6.60^{g}**
Alpha phellandrene	6	11.8	2.70^{bc}	2.50^{c}	2.60^{c}	3.00^{ab}	2.80^{abc}	3.00^{ab}	3.10^{a}	2.70^{bc}	2.50^{c}	2.70^{bc}
Para cymene	7	12.2	2.10^{ab}	1.60^{d}	1.60^{d}	2.20^{a}	1.80^{cd}	1.90^{bc}	2.20^{a}	1.90^{bc}	1.70^{cd}	1.90^{bc}
Limonene	8	12.6	3.60^{a}	2.70^{cd}	2.10^{e}	1.90^{ef}	2.10^{e}	3.10^{b}	2.50^{d}	3.00^{bc}	2.10^{e}	1.71^{f}
Eucalyptol	9	12.9	1.70^{bc}	2.40^{a}	2.50^{a}	2.00^{b}	2.60^{a}	1.53^{c}	1.80^{bc}	1.50^{c}	1.60^{c}	1.80^{bc}
1,3,6,-Octatriene	10	13.5	2.00^{ab}	1.90^{abc}	1.70^{bcd}	2.10^{a}	1.80^{abc}	1.90^{abc}	1.60^{cd}	1.80^{abc}	1.40^{d}	2.00^{ab}
γ-Terpinene	11	14.1	2.60^{a}	2.40^{ab}	1.90^{d}	2.30^{b}	2.63^{a}	2.40^{ab}	2.20^{bc}	1.80^{d}	2.00^{cd}	2.40^{ab}
Linalool	12	14.4	**4.17^{f}**	**5.60^{c}**	**4.60^{e}**	**4.70^{e}**	**5.00^{d}**	**5.10^{d}**	**5.70^{c}**	**6.00^{b}**	**6.10^{b}**	**6.80^{a}**
Cis-Sabinene	13	14.8	1.90^{b}	1.60^{cde}	1.70^{bcd}	1.57^{cde}	2.20^{a}	1.80^{bc}	1.80^{bc}	1.40^{e}	1.50^{de}	1.90^{b}
3-methyl-2(methyl-2-2butenyl)	14	15.7	1.70^{e}	2.20^{bc}	2.50^{a}	1.80^{de}	2.00^{cd}	1.80^{de}	2.40^{ab}	1.90^{de}	1.70^{e}	1.20^{f}
β-Thujone	15	16.3	2.80^{a}	2.50^{bc}	1.90^{ef}	2.30^{cd}	2.10^{de}	2.70^{ab}	2.70^{ab}	2.40^{c}	2.10^{de}	1.70^{f}
5-Hepten-1-ol	16	17.4	1.90^{c}	2.40^{a}	1.50^{d}	2.00^{bc}	2.43^{a}	1.80^{c}	1.80^{c}	2.20^{ab}	1.90^{c}	1.80^{c}
Bicyclo[2.2.1] heptan-2-one	17	17.8	2.50^{a}	1.60^{d}	2.40^{a}	1.70^{cd}	2.30^{a}	2.50^{a}	1.90^{bc}	1.50^{d}	2.30^{a}	2.00^{b}
Isopulegol	18	18.2	3.10^{a}	2.20^{cd}	2.50^{b}	2.40^{bc}	2.00^{de}	2.20^{cd}	2.50^{b}	2.20^{cd}	1.80^{e}	2.20^{cd}
Trans-carveol	19	19.5	**5.00^{g}**	**6.60^{d}**	**5.40^{f}**	**5.50^{f}**	**5.80^{e}**	**5.90^{e}**	**6.70^{cd}**	**7.00^{b}**	**6.90^{bc}**	**7.90^{a}**
Citronellal	20	20.1	**6.10^{f}**	**8.00^{c}**	**6.60^{e}**	**6.50^{e}**	**7.10^{d}**	**7.10^{d}**	**8.10^{c}**	**8.50^{b}**	**8.40^{b}**	**9.50^{a}**
Isoborneol	21	20.4	2.60^{a}	2.20^{bc}	2.60^{a}	2.20^{bc}	2.40^{ab}	2.50^{a}	2.10^{c}	1.80^{d}	1.60^{d}	2.10^{c}
Citronellol	22	21.8	2.10^{bc}	2.50^{a}	2.40^{a}	1.90^{cd}	2.10^{bc}	1.83^{d}	2.30^{ab}	1.60^{e}	2.50^{a}	2.00^{cd}
1,3,8,-P-menthatriene	23	22.4	1.70^{c}	2.50^{a}	1.80^{c}	2.20^{b}	1.60^{c}	2.50^{a}	2.10^{b}	1.80^{c}	2.10^{b}	1.60^{c}
Citral	24	23.9	**3.90^{f}**	**5.50^{c}**	**4.10^{ef}**	**4.30^{e}**	**4.70^{d}**	**4.80^{d}**	**5.63^{c}**	**6.00^{b}**	**6.20^{b}**	**6.80^{a}**
3,6,-Octadienoic acid	25	24.2	1.40^{e}	1.70^{cd}	2.20^{a}	1.80^{bc}	2.00^{ab}	1.80^{bc}	1.40^{e}	1.80^{bc}	1.53^{de}	1.70^{cd}
Thymol	26	25.1	3.50^{a}	2.90^{c}	2.30^{fg}	2.60^{de}	2.20^{g}	3.20^{b}	2.40^{efg}	2.70^{cd}	2.30^{fg}	2.50^{def}
Carvacrol	27	25.5	2.10^{b}	1.40^{e}	1.90^{bc}	1.70^{cd}	1.90^{bc}	1.80^{cd}	1.80^{cd}	1.60^{de}	2.40^{a}	2.10^{b}
Carvacrol acetate	28	26.0	1.50^{def}	1.30^{ef}	2.40^{ab}	2.60^{a}	2.30^{abc}	1.63^{def}	1.20^{f}	1.80^{cde}	1.50^{def}	1.90^{bcd}
ß-Caryophyllene	29	29.8	1.90^{bc}	1.80^{bcd}	1.70^{cde}	2.20^{a}	1.80^{bcd}	1.80^{bcd}	1.57^{de}	1.50^{e}	1.90^{bc}	2.00^{ab}
Caryophyllen epoxide	30	30.3	1.80^{cd}	1.30^{f}	2.60^{a}	1.70^{de}	1.50^{ef}	2.00^{bc}	2.10^{b}	1.90^{bcd}	2.60^{a}	1.40^{f}
Calamenene	31	30.7	2.10^{a}	1.70^{c}	2.10^{a}	1.90^{abc}	1.70^{c}	1.80^{bc}	1.80^{bc}	2.00^{ab}	1.90^{abc}	1.70^{c}
α-Humulene	32	21.7	1.00^{e}	1.40^{cd}	1.70^{b}	2.30^{a}	1.80^{b}	1.40^{cd}	1.60^{bc}	1.30^{d}	1.80^{b}	2.10^{a}
Germacrene-D	33	32.9	3.20^{a}	2.40^{cd}	2.30^{d}	2.00^{e}	2.40^{cd}	2.40^{cd}	2.60^{bc}	2.80^{b}	2.30^{d}	1.50^{f}
ß-Ionone	34	33.1	1.50^{cd}	1.70^{bc}	1.90^{b}	1.70^{bc}	2.20^{a}	1.70^{bc}	1.50^{cd}	1.30^{de}	1.20^{ef}	1.00^{f}
ß-bisabolene	35	34.0	2.20^{b}	1.50^{ef}	2.20^{b}	2.50^{a}	2.00^{bc}	2.10^{b}	1.80^{cd}	1.60^{def}	1.40^{f}	1.70^{de}
Eugenol	36	35.1	1.40^{e}	1.70^{cd}	2.03^{b}	2.30^{a}	1.70^{cd}	1.80^{bc}	1.40^{e}	1.90^{bc}	1.70^{cd}	1.50^{de}
α-Muurolene	37	36.6	1.30^{cd}	1.20^{d}	1.90^{b}	2.30^{a}	1.40^{cd}	1.40^{cd}	1.30^{cd}	1.50^{c}	1.80^{b}	1.30^{cd}
ß-Cubebene	38	40.2	1.60^{a}	1.00^{d}	1.60^{a}	1.40^{ab}	1.20^{bcd}	1.30^{bc}	1.20^{bcd}	1.30^{bc}	1.40^{ab}	1.10^{cd}
Total identified			98.87	98.90	98.93	99.07	99.63	99.49	99.03	98.80	98.83	99.54
Essential oil content (%, v/w)			0.21^{f}	0.25^{c}	0.22^{e}	0.22^{e}	0.23^{d}	0.22^{de}	0.25^{bc}	0.26^{b}	0.25^{bc}	0.28^{a}

در هر ردیف، مقادیر میانگین با حروف غیرمشابه بیانگر اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد توسط آزمون چند دامنه دانکن هستند. مقادیر، میانگین سه تکرار است. CF: عصاره کشت (حجمی/حجمی). CH: هموژنایت سلولی قارچ (میلی‌گرم در لیتر).

In each row, mean values followed by dissimilar letters are significantly different at $P \leq 0.01$ as determined by the Duncan's multiple range test. Values are mean of three replicates. CF: Culture filtrate (v/v). CH: Fungal cell homogenate (mg/l).

تأثیر محلول‌پاشی عصاره کشت و هموژنایت سلولی قارچ *S. indica* بر برخی صفات فیزیولوژیکی بادرنجبویه

نتایج جدول تجزیه واریانس نشان دادند تأثیر محلول‌پاشی عصاره کشت و هموژنایت سلولی قارچ *S. indica* به‌طور جداگانه و ترکیبی بر تغییرات شاخص‌های فیزیولوژیکی مانند میزان کلروفیل a، کلروفیل b، کلروفیل کل و کاروتنوئیدها در سطح احتمال ۵ درصد و قندهای محلول، محتوای مالون‌دی‌آلدهید، پرولین و فلاونوئید کل در سطح احتمال ۱ درصد معنی‌دار بود (جدول ۲). به‌عبارت دیگر، فاکتورهای فیزیولوژیکی مورد بررسی در این پژوهش به استثناء فنل کل، به‌طور معنی‌داری تحت تأثیر نوع و مقدار این محرک‌ها قرار گرفتند. جدول (۲) تأثیر محلول‌پاشی عصاره کشت و هموژنایت سلولی قارچ *S. indica* به‌صورت مجزا و ترکیبی بر میانگین مربعات برخی صفات فیزیولوژیکی بادرنجبویه را نشان می‌دهد.

طبق نتایج تجزیه آماری، تیمارهای عصاره کشت و هموژنایت سلولی به‌صورت مجزا، در سطح احتمال ۵ درصد تأثیر معنی‌داری بر میزان کلروفیل a، کلروفیل b، کلروفیل کل نداشتند و تأثیر اثر توام این دو محرک در مقایسه با شاهد در سطح احتمال ۵ درصد معنی‌دار و کاهشی بود (جدول ۲). کمترین میزان کلروفیل a، کلروفیل b و کلروفیل کل در تیمار ترکیبی ½ عصاره کشت+۱۶۰ میلی‌گرم در لیتر هموژنایت سلولی (به‌ترتیب ۰/۹۴، ۰/۳۵ و ۱/۶۵ میلی‌گرم بر گرم وزن تر) به دست آمد که به‌ترتیب ۱۱، ۴۲ و ۲۷ درصد کمتر از محتوای آن در گیاهان شاهد بودند. به نظر می‌رسد غلظت بالای هموژنایت سلولی (۱۶۰ میلی‌گرم در لیتر) تأثیر منفی بیشتری بر میزان کلروفیل a، کلروفیل b و کلروفیل کل داشته است. مقایسه میانگین داده‌های به دست آمده نشان داد که بیشترین میزان کلروفیل کل (۲/۵۹ میلی‌گرم بر گرم وزن تر) در تیمار ۸۰ میلی‌گرم در لیتر هموژنایت سلولی و کمترین مقدار آن (۱/۶۵ میلی‌گرم بر گرم وزن تر) در تیمار ترکیبی ½ عصاره کشت+۱۶۰ میلی‌گرم در لیتر هموژنایت سلولی بدست آمد (جدول ۲). نتایج نشان دادند از نظر تأثیر بر مقدار کاروتنوئیدها، اختلاف اندکی و در سطح احتمال ۵ درصد بین تیمارها وجود داشت و تقریباً روندی شبیه به کلروفیل کل داشتند. کاربرد تیمار ترکیبی ½ عصاره کشت+۱۶۰ میلی‌گرم در لیتر هموژنایت سلولی در مقایسه با شاهد تأثیر معنی‌داری بر محتوای کاروتنوئیدها نداشت. میزان کاروتنوئیدها در تیمار شاهد، ۰/۶۸ میلی‌گرم بر گرم وزن تر بود و حداکثر تا ۱۸ درصد تحت تأثیر این محرک‌ها، افزایش یافت. اثر تیمارهای عصاره کشت و هموژنایت سلولی قارچ *S. indica* به‌طور جداگانه و ترکیبی بر صفت میزان قندهای محلول گیاه دارویی بادرنجبویه، بسیار معنی‌دار ($P\leq0.01$) بود و حداکثر مقدار این شاخص، در تیمارهای ۲۰ تا ۱۶۰ میلی‌گرم در لیتر هموژنایت سلولی بدست آمد؛ ولی سایر تیمارها شامل عصاره کشت به تنهایی یا توام با مقادیر ۲۰، ۴۰ و ۱۶۰ میلی‌گرم در لیتر هموژنایت سلولی اثر مثبتی بر افزایش مقدار این صفت نداشتند. کاربرد جداگانه هموژنایت سلولی، میزان قندهای محلول را حداکثر (۴۷/۷ میلی‌گرم بر گرم وزن تر) به‌میزان ۴۷ درصد نسبت به شاهد افزایش داد. غلظت مالون‌دی‌آلدهید به عنوان شاخص تنش اکسیداتیو وارد به لیپیدهای غشاء، تحت تأثیر تیمارهای عصاره کشت و هموژنایت سلولی اندازه‌گیری شد. اختلاف معنی‌داری ($P \leq 0.01$) بین محتوای مالون‌دی‌آلدهید تولیدشده در گیاهان بادرنجبویه مورد بررسی تحت تأثیر تیمارهای جداگانه و ترکیبی عصاره کشت و هموژنایت سلولی قارچ *S. indica* مشاهده شد. نتایج نشان داد که پراکسیداسیون غشاء توسط محلول‌پاشی با عصاره کشت و هموژنایت سلولی این قارچ اندوفیت، افزایش یافت و در دو تیمار ۲۰ و ۸۰ میلی‌گرم در لیتر هموژنایت سلولی، به‌ترتیب با ۱/۱۶ و ۱/۱۲ میکرومول در گرم وزن تر به حداکثر خود رسید. در این دو تیمار، محتوای مالون‌دی‌آلدهید به‌ترتیب تا ۱۴۲ و ۱۳۳ درصد

نسبت به شاهد افزایش یافتند. نتایج نشان دادند تیمارهای مجزای هموژنایت سلولی نسبت به تیمارهای مجزا و ترکیبی عصاره کشت باعث افزایش بیشتر غلظت مالوندی-آلدهید شد. نتایج جدول تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که تفاوت بسیار معنی‌داری در سطح احتمال یک درصد بین تأثیر تیمارهای جداگانه و ترکیبی عصاره کشت و هموژنایت سلولی قارچ *S. indica* بر محتوای پرولین وجود دارد ($P \leq 0.01$). نتایج مقایسه میانگین‌ها نشان می‌دهد (جدول ۲) در برگ‌های محلول‌پاشی شده با عصاره کشت، محتوای پرولین در مقایسه با شاهد ۳۰ درصد افزایش یافت. بیشترین محتوای پرولین در تیمار هموژنایت سلولی به-صورت مجزا با غلظت‌های ۸۰ و ۱۶۰ میلی‌گرم در لیتر بدست آمد که به‌ترتیب نسبت به شاهد ۵۷ و ۴۴ درصد افزایش نشان دادند. نتایج نشان داد اثر توام غلظت‌های بالای هموژنایت سلولی با ½ عصاره کشت در مقایسه با شاهد، تاثیر مثبت و افزایشی بر محتوای پرولین نداشته است. نتایج آزمایش حاضر نشان داد تأثیر مجزا و توام عصاره کشت و هموژنایت سلولی اتوکلاو شده این قارچ اندوفیت بر میزان فنل کل بادرنجبویه در شرایط انجام این پژوهش، در سطح احتمال ۵ درصد معنی‌دار نبود. به‌عبارت دیگر، تفاوت معنی‌داری بین مقدار فنل کل در گیاهان محلول‌پاشی شده با عصاره کشت و هموژنایت سلولی *S. indica* و گیاهان شاهد وجود نداشت و مقادیر فنل بین ۹/۲۸ تا ۹/۶۸ میلی‌گرم در گرم وزن تر متغیر بودند. نتایج مقایسه میانگین‌ها (جدول ۲) نشان دادند عصاره کشت و هموژنایت سلولی قارچ *S. indica* به‌طور مجزا و همچنین تیمار ترکیبی عصاره کشت با سطوح مختلف هموژنایت سلولی قارچ *S. indica* سبب کاهش محتوای فلاونوئیدها در مقایسه با شاهد شدند ($P \leq 0.01$). بیشترین محتوای فلاونوئیدها (۳/۲۴ میلی‌گرم در گرم وزن تر) در گیاهان شاهد بدست آمد. با مقایسه تأثیر عصاره کشت و هموژنایت سلولی بر میزان فلاونوئیدها مشاهده می‌شود که هموژنایت سلولی کاهش بیشتری را نسبت به عصاره کشت برای این صفت نشان دادند. لازم به ذکر است تفاوت معنی‌داری بین غلظت‌های مختلف هموژنایت سلولی این قارچ اندوفیت برای صفت محتوای فلاونوئید کل وجود نداشت.

آنالیز همبستگی

بر اساس تجزیه و تحلیل همبستگی به روش پیرسون (شکل ۳) (داده‌های عددی جدول همبستگی نشان داده نشده است)، روابط همبستگی بین صفات مختلف شامل محتوای اسانس، ۱۰ ترکیب عمده اسانس و ۹ شاخص فیزیولوژیکی در گیاه دارویی بادرنجبویه تحت تأثیر محلول‌پاشی با عصاره کشت و هموژنایت سلولی قارچ *S. indica* ارزیابی شدند. همبستگی بین صفات مذکور بر اساس میانگین ۳ تکرار در شکل ۳ ارائه شده است. دایره‌های آبی و قرمز رنگ به‌ترتیب رابطه مثبت و منفی بین صفات را نشان می-دهند. همچنین قطر هر دایره، بزرگی همبستگی بین صفات را نشان می‌دهد. همبستگی مثبت یا منفی قابل توجهی بین تغییرات صفات مورد بررسی به‌ویژه بین ترکیبات اصلی و محتوای اسانس این گیاه مشاهده شد. نتایج همبستگی نشان داد که میزان اسانس در سطح احتمال ۱ درصد با ترکیبات سیترونلال (**r=۰/۹۸۶)، ترانس-کاروئول (**r=۰/۹۷۶)، لینالول (**r=۰/۹۷۱) و سیترال (**r=۰/۹۶۲) همبستگی معنی‌دار و مثبت و با ترکیب گاما-۳-کارن (**r=-۰/۹۷۶)، همبستگی معنی‌دار و منفی داشت. بیشترین مقدار همبستگی مثبت معنی‌دار بین ترکیب سیترونلال با ترانس-کاروئول (**r=۰/۹۹۲) مشاهده شد. سیترال با لینالول (**r=۰/۹۸۵)، سیترونلال (**r=۰/۹۸۱) و ترانس-کاروئول

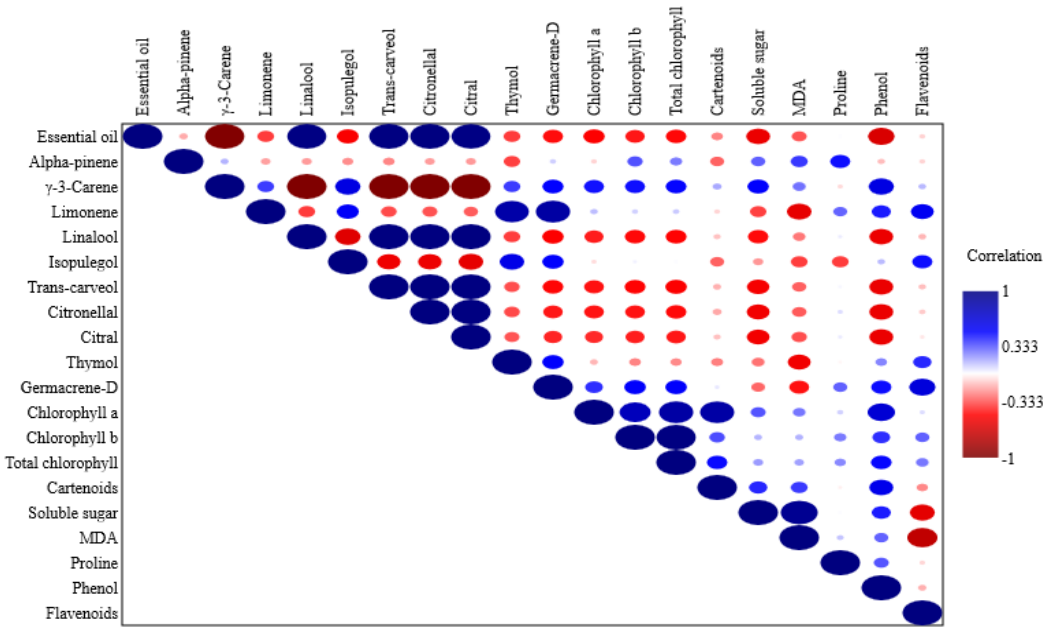
جدول ۲- مقایسه میانگین تأثیر محلول‌پاشی عصاره کشت و هموژنایت سلولی قارچ *S. indica* بر برخی صفات فیزیولوژیکی بادرنجبویه

Table 2- Mean comparison for effects of culture filtrate and *S. indica* cell homogenate on some physiological traits of *M. officinalis*

Treatments	Content								
	Chlorophyll *a* (mg/g FW)	Chlorophyll *b* (mg/g FW)	Total Chlorophyll (mg/g FW)	Carotenoids (mg/g FW)	Soluble sugars (mg/g FW)	Malondialdehyde (µmol/g FW)	Proline (µmol/g FW)	Total phenol (mg/g FW)	Total flavonoid (mg/g FW)
Control	1.06^{a}	0.60^{ab}	2.27^{ab}	0.68^{b}	32.40^{c}	0.48^{g}	0.86^{cd}	9.49^{a}	3.24^{a}
½CF (v/v)	1.12^{a}	0.61^{ab}	2.34^{ab}	0.75^{ab}	31.56^{c}	0.67^{f}	1.12^{ab}	9.48^{a}	1.80^{c}
CH_{20}-20 (mg/l)	1.10^{a}	0.59^{ab}	2.27^{ab}	0.75^{ab}	45.36^{a}	1.16^{a}	1.06^{bc}	9.50^{a}	1.15^{d}
CH_{40}-40 (mg/l)	1.14^{a}	0.57^{ab}	2.27^{ab}	0.80^{a}	47.70^{a}	1.07^{b}	0.41^{e}	9.55^{a}	1.11^{d}
CH_{80}-80 (mg/l)	1.12^{a}	0.73^{a}	2.59^{a}	0.74^{ab}	44.81^{a}	1.12^{ab}	1.35^{a}	9.60^{a}	1.47^{cd}
CH_{160}-160 (mg/l)	1.11^{a}	0.47^{bc}	2.05^{bc}	0.79^{a}	45.02^{a}	0.97^{c}	1.24^{ab}	9.68^{a}	1.39^{cd}
½CF+CH_{20}	1.16^{a}	0.65^{ab}	2.45^{ab}	0.80^{a}	32.75^{c}	0.69^{f}	0.81^{d}	9.56^{a}	2.43^{b}
½CF+CH_{40}	1.08^{a}	0.52^{abc}	2.13^{ab}	0.75^{ab}	33.00^{c}	0.67^{f}	1.15^{ab}	9.55^{a}	1.45^{cd}
½CF+CH_{80}	1.12^{a}	0.61^{ab}	2.33^{ab}	0.78^{a}	37.90^{b}	0.82^{d}	1.00^{bcd}	9.37^{a}	2.34^{b}
½CF+CH_{160}	0.94^{b}	0.35^{c}	1.65^{c}	0.67^{b}	33.37^{c}	0.76^{e}	0.77^{d}	9.28^{a}	1.41^{cd}
Significant levels	*	*	*	**	**	**	**	ns	**

در هر ستون، مقادیر میانگین با حروف غیرمشابه بیانگر اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد توسط آزمون چند دامنه دانکن هستند. مقادیر، میانگین سه تکرار است. CF: عصاره کشت (حجمی/حجمی). CH: هموژنایت سلولی قارچ (میلی گرم در لیتر). ^{ns}، * و ** به ترتیب عدم تفاوت معنی‌دار و معنی‌داری در سطح احتمال ۱ و ۵ درصد است.

In each column, mean values followed by dissimilar letters are significantly different at $P \leq 0.05$ as determined by the Duncan's multiple range test. Values are mean of three replicates. CF: Culture filtrate (v/v). CH: Fungal cell homogenate (mg/l). ^{ns}, *, **: Non significant and significant at 5% and 1% probability levels, respectively



شکل ۳- ماتریس ضرایب همبستگی پیرسون، رابطه بین صفات را نشان می‌دهد. دایره‌های آبی و قرمز رنگ به‌ترتیب رابطه مثبت و منفی بین صفات و قطر هر دایره، بزرگی همبستگی بین صفات را نشان می‌دهد.

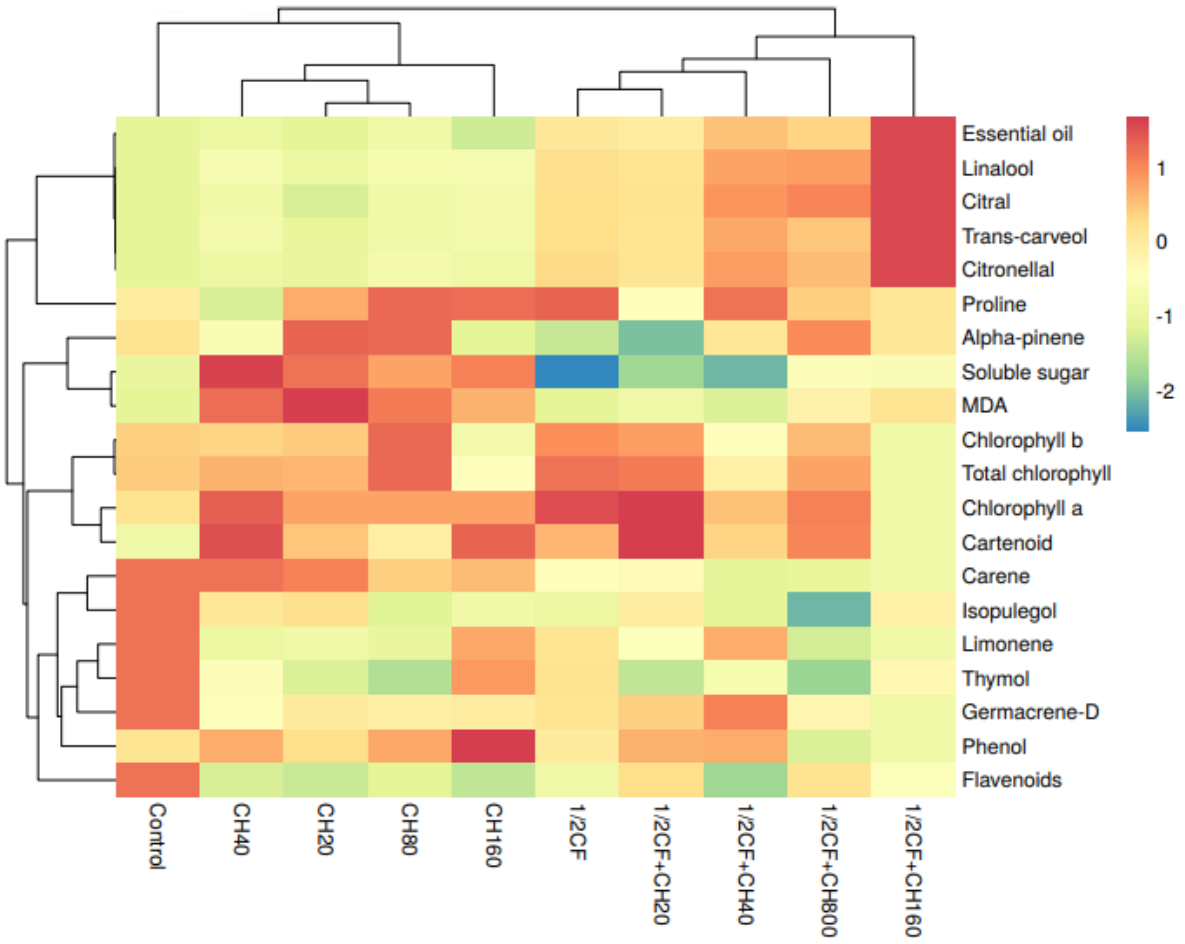
Figure 3- The matrix of Pearson correlation coefficients shows the relationship between the traits. Blue and red circles indicate positive and negative relationships between traits, respectively. The diameter of each circle shows the magnitude of correlation between traits.

(r=۰/۹۷۹**) همبستگی مثبت و معنی‌دار و با محتوای گاما-۳-کارن (r=-۰/۹۶۴**) همبستگی منفی و معنی‌دار نشان داد ($P \leq ۰/۰۱$). نتایج همبستگی بین صفات حاکی از آن است که بین لینالول با سیترونلال، ترانس-کاروئول و سیترال همبستگی مثبت و معنی‌داری وجود داشت. نتایج نشان داد که گاما-۳-کارن با لیمونن، سیترونلال، ترانس-کاروئول و سیترال همبستگی منفی و معنی‌داری داشت (شکل ۳)؛ به‌عبارتی هم‌زمان با زیاد شدن مقدار اجزای عمده اسانس، مقدار این ترکیب روند معکوس و کاهشی داشت. سایر ترکیبات اسانس، همبستگی مثبت یا منفی زیادی با هم نداشتند. بین رنگیزه‌های فتوسنتزی، قندهای محلول، مالون‌دی‌آلدهید، فنل و فلاونوئیدها با مقدار اسانس همبستگی منفی و کم بود. با توجه به شکل ۳، مشاهده می‌شود که مقدار همبستگی مثبت یا منفی بین ترکیبات اسانس بیشتر از همبستگی بین صفات فیزیولوژیکی مورد بررسی در این پژوهش است.

نمودار نقشه حرارتی

جهت بررسی بیشتر ارتباط و همبستگی بین شاخص‌های مورد ارزیابی، نمودار نقشه حرارتی بر اساس محتوای و ترکیبات اصلی اسانس و برخی صفات فیزیولوژیکی گیاه بادرنجبویه تیمارشده با عصاره کشت و هموژنایت سلولی قارچ *S. indica* به‌صورت مجزا و توأم ترسیم شد (شکل ۴). نتایج نقشه حرارتی، همبستگی بین صفات و تیمارها را به خوبی ننشان داد. هر ستون و هر ردیف به‌ترتیب نشان‌دهنده تیمارها و صفات مورد بررسی است. تیمارهای طبقه‌بندی شده در یک گروه، پاسخ‌های مشابهی را در پژوهش نشان داده‌اند. رنگ‌ها نشان دهنده مقادیر میانگین متغیر از کم (آبی) به زیاد (قرمز) هستند. نتایج نشان دادند گیاهان تیمار شده را می‌توان در ۳ گروه اصلی گروه‌بندی کرد. از بین ۱۰ تیمار شامل عصاره کشت (۰ و ½ حجمی/حجمی)، هموژنایت سلولی (۲۰، ۴۰، ۸۰ و ۱۶۰ میلی‌گرم در لیتر) و اثر توام ½ عصاره کشت با ۲۰، ۴۰، ۸۰ و ۱۶۰ میلی‌گرم در لیتر هموژنایت سلولی قارچ *S. indica*، گیاهان تیمار شده با ۲۰، ۴۰، ۸۰ و ۱۶۰ میلی‌گرم در لیتر هموژنایت سلولی در یک خوشه و شاهد در یک خوشه جدا گروه‌بندی شدند. همچنین گیاهان تیمارشده با عصاره کشت به‌صورت مجزا و اثر توام ½ عصاره کشت با ۲۰، ۴۰، ۸۰ و ۱۶۰ میلی‌گرم در لیتر هموژنایت سلولی قارچ *S. indica* در یک خوشه جداگانه دیگری قرار گرفتند. نتایج نقشه حرارتی (شکل ۴) نشان می‌دهد برای محتوای اسانس و عمده‌ترین ترکیبات شامل سیترونلال، ترانس-کاروئول، سیترال و لینالول بهترین نتیجه توسط تیمار ½ عصاره کشت+۱۶۰ میلی‌گرم در لیتر هموژنایت سلولی بدست آمدکه با قرمز پررنگ نشان داده شده است. در شرایط پژوهش ما، بیشترین مقدار گاما-۳-کارن، ایزوپولگول، لیمونن، تیمول، جرماکارن-دی و فلاونوئیدها در تیمار شاهد به‌دست آمد. سایر صفات به‌ویژه صفات فیزیولوژیکی، بیشترین مقادیر را در تیمارهای مجزای هموژنایت سلولی و عصاره کشت داشتند. تجزیه خوشه‌بندی در نمودار نقشه حرارتی، به وضوح اثرات مثبت و معنی‌دار هموژنایت سلولی و عصاره کشت را نشان می‌دهد. به‌عبارت دیگر، نتایج نشان دادند تیمار شاهد در نمودار نقشه حرارتی از تیمارهای محلول‌پاشی شده توسط هموژنایت سلولی، به‌ویژه هموژنایت سلولی همراه با ½ عصاره کشت، جدا شده است. صفات طبقه‌بندی شده در یک گروه، پاسخ‌های مشابهی را در آزمایش نشان داده‌اند. نتایج نشان داد که ترکیب هر دو محرک (هموژنایت

سلولی و عصاره کشت) موثرترین تیمار برای افزایش تولید ترکیبات اصلی اسانس بادرنجبویه است.



شکل ۴- نمودار نقشه حرارتی، اثر محلول پاشی عصاره کشت و هموژنایت سلولی قارچ *S. indica* به‌صورت مجزا و توأم بر میزان و ترکیبات اصلی اسانس و برخی صفات فیزیولوژیکی گیاه بادرنجبویه را نشان می‌دهد. هر ستون و هر ردیف به‌ترتیب نشان دهنده تیمارها و صفات مورد بررسی است. تیمارهای طبقه‌بندی شده در یک گروه، پاسخ‌های مشابهی را در آزمایش نشان داده‌اند. رنگ‌ها، نشان دهنده مقادیر میانگین متغیر از کم (آبی) به زیاد (قرمز) هستند.

Figure 4- The heatmap diagram shows the effect of foliar application of culture filtrate and *S. indica* cell homogenate separately and together on content and major constituents of essential oil and some physiological traits of *M. officinalis* plant. Each column and each row represent the treatments and traits studied, respectively. Treatments classified in the same group showed similar responses in the experiment. Colors represent the mean values ranging from low (blue) to high (red).

بحث

در میان راهبردهای مختلف برای افزایش بیوسنتز و تجمع متابولیت‌های ارزشمند گیاهی، استفاده از محرک‌ها یکی از روش‌ها و رویکردهای نوظهور و مؤثر برای تولید با صرفه اقتصادی در سطح وسیع است (Kumari et al., 2020; Jeyasri et al., 2023). یافته‌های این پژوهش نشان دادند استفاده از عصاره کشت و هموژنایت سلولی قارچ *S. indica* به تنهایی یا توام با هم می‌توانند بر محتوای اسانس، ترکیبات عمده اسانس و برخی شاخص‌های فیزیولوژیکی گیاه دارویی بادرنجبویه تأثیر بگذارند. همچنین نتایج نشان داد در مقایسه با شاهد، محتوای اسانس اندام‌های هوایی بادرنجبویه به‌طور معنی‌داری تحت تأثیر این محرک‌ها قرار گرفت و بین ۰/۲۱ و ۰/۲۸ درصد متغیر بود. نتایج پژوهش حاضر، با نتایج یافته های Hedayati & Abdoli (2021)، مبنی بر اینکه گزارش دادند محتوای اسانس در برگ‌های خشک بادرنجبویه بین ۰/۲۲ تا ۰/۳۴ درصد است، مطابقت

زیادی دارد. همچنین گزارش‌ها حاکی از آن است که محتوای اسانس در برگ‌های خشک بادرنجبویه بین ۰/۰۲ تا ۰/۴۰ درصد (Silva et al., 2021)، ۰/۱۱ تا ۰/۱۹ درصد (Baharlou et al., 2019)، ۰/۲۷ تا ۰/۳۲ درصد (Ahmadi et al., 2021)، ۰/۵۳ تا ۰/۶۱ درصد (Ghasemi Pirbalouti et al., 2019) و ۰/۱۶ تا ۰/۳۲ درصد (Hatami et al., 2021) متغیر بوده است که بر خلاف گیاهان خانواده نعناعیان، این مقادیر نسبتاً کم است (Mrlianova et al., 2002). در پژوهش حاضر، اثر تحریکی عصاره کشت و هموژنایت سلولی به‌عنوان محرک‌های زیستی بر میزان اسانس اندام‌های هوایی بادرنجبویه نشان داده شد و بیشترین مقدار آن در تیمار ترکیبی ½ عصاره کشت+۱۶۰ میلی‌گرم در لیتر هموژنایت سلولی با ۳۲ درصد افزایش نسبت به گیاهان شاهد به دست آمد. جهت مقایسه نتایج این پژوهش با نتایج پژوهش‌های سایر پژوهشگران نشان دادندبر اساس دانش ما تا به حال در مورد تأثیر محلول‌پاشی برگی عصاره کشت و هموژنایت سلولی اتوکلاو شده این قارچ اندوفیت بر تولید متابولیت‌های ثانویه بادرنجبویه پژوهشی انجام نشده است. بر اساس نتایج پژوهش حاضر، به نظر می‌رسد تیمار ترکیبی سبب افزایش بیشتر میزان اسانس می‌شود. در پژوهشی که اثر محلول‌پاشی با عصاره مخمر و سالیسیلیک اسید بر مقدار اسانس بادرنجبویه بررسی شد، گزارش شد که تأثیر این دو محرک بر مقدار اسانس معنی‌دار بود و در مطابقت با نتایج پژوهش ما، بیشترین میانگین این صفت در کاربرد ترکیبی آنها (۱/۵ گرم در لیتر عصاره مخمر+۱۶۰ میلی‌گرم در لیتر سالیسیلیک اسید) مشاهده شد (Hedayati & Abdoli, 2021). در پژوهش حاضر، پس از تجزیه فیتوشیمیایی اسانس بادرنجبویه توسط دستگاه کروماتوگرافی گازی متصل به طیف‌سنج جرمی، در مجموع ۳۸ ترکیب شیمیایی مختلف شناسایی شد (جدول ۱). مطابق با نتایج این پژوهش، Ahmadi et al. (2021) گزارش دادند که ۳۸ ترکیب در اسانس بادرنجبویه شناسایی شده است. همان‌طوری که در جدول (۱) مشاهده می‌شود از ترکیبات شناسایی‌شده در اسانس بادرنجبویه، به‌ترتیب سیترونلال، گاما-۳-کارن، ترانس-کاروئول، سیترال و لینالول بیشترین درصد فراوانی را داشتند. این یافته‌ها با نتایج پژوهش Hedayati & Abdoli (2021) مطابقت زیادی دارد که اجزای اصلی اسانس بادرنجبویه را به‌ترتیب سیترونلول، ترانس-کاروئول، گاما-۳-کارن، لینالول و سیترال گزارش کردند. نتایج پژوهش‌های قبلی نشان دادند نرال، زد-سیترال، ای-سیترال، ژرانیال، سیترونلال و بتاکاریوفیلن (Baharlou et al., 2019)، ژرانیال، نرال، کارواکرول، بتاکاریوفیلن، سیترونلال، تیمول، ژرانیل استات و اکسیدکاریوفیلن (Ghasemi Pirbalouti et al., 2019)، نرال، ژرانیال، ژرانیل استات، سیترونلال، اکسید کاریوفیلن و بتاکاریوفیلن (Taherpour et al., 2012) ترکیبات اصلی اسانس بادرنجبویه بودند. در این پژوهش، تفاوت‌هایی بین ترکیبات عمده اسانس بادرنجبویه در مقایسه با برخی پژوهش‌های قبلی مشاهده شد. تفاوت در محتوای و ترکیبات اسانس، ممکن است به عوامل متعددی از جمله نوع و غلظت محرک‌ها، مدت زمان تیمار با محرک، ژنوتیپ، شرایط جغرافیایی رشد گیاه، سال‌های برداشت مختلف، شرایط نگهداری، روش خشک‌کردن نمونه، روش استخراج اسانس و همچنین عملیات زراعی مرتبط باشد (Kittler et al., 2017; Ghasemi Pirbalouti et al., 2019; Hedayati & Abdoli, 2021; Ahmadi et al., 2021; Mehrpooya et al., 2021). سیترونلال، به عنوان یکی از اجزای اصلی اسانس بادرنجبویه، یک مونوترپن آلدهید است (Chung et al., 2010). در پژوهش حاضر، آنالیز اسانس توسط GC/MS نشان داد که سیترونلال با ۹/۵۰ درصد عمده‌ترین ترکیب شناسایی شده در اسانس بود که با نتایج پژوهش Ahmadi et al. (2021)، که سیترونلال با دامنه تغییر ۱۰/۲ تا ۱۷/۲ درصد بیشترین مقدار را داشت، مطابقت دارد. نتایج پژوهش حاضر نشان داد

می‌توان به‌طور قابل‌توجهی تولید ترکیبات عمده اسانس اندام‌های هوایی بادرنجبویه را توسط این دو محرک زیستی تحریک کرد. گزارش‌ها نقش *S. indica* به‌عنوان ابزار پایدار و چندمنظوره برای کاربردهای کشاورزی را برجسته و مورد تاکید قرار می‌دهند (Jangir et al., 2021). در این پژوهش، استفاده از عصاره کشت و هموژنایت سلولی قارچ *S. indica* به‌صورت مجزا یا ترکیبی، اثرات تحریک‌کنندگی متفاوتی بر اجزای اصلی اسانس بادرنجبویه نشان دادند. کمترین میزان تولید اجزای اصلی در گیاهان شاهد مشاهده شد که از آب مقطر برای محلول‌پاشی استفاده شد. یافته‌های پژوهش حاضر نقش هموژنایت سلولی قارچ *S. indica* را به‌عنوان یک محرک ثابت کرد؛ به‌طوری‌که مقدار سیترونلال، ترانس-کاروئول، سیترال و لینالول به‌عنوان اجزای اصلی اسانس بادرنجبویه را به‌ترتیب حداکثر تا ۱۶، ۱۸، ۲۳ و ۲۲ درصد نسبت به شاهد افزایش دادند. نتایج نشان داد با افزایش غلظت هموژنایت سلولی از ۲۰ به ۱۶۰ میلی‌گرم در لیتر، مقدار این چهار ترکیب افزایش پیدا کرد. همچنین در تیمار ترکیبی ½ عصاره کشت+۱۶۰ میلی‌گرم در لیتر هموژنایت سلولی، مقدار سیترونلال، ترانس-کاروئول، سیترال و لینالول در مقایسه با شاهد به‌ترتیب ۵۶، ۵۸، ۷۴ و ۶۳ درصد افزایش یافتند. بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که ۱۶۰ میلی‌گرم در لیتر هموژنایت سلولی اتوکلاو شده، مقدار مناسبی برای تحریک تولید ترکیبات اصلی اسانس بادرنجبویه می‌باشد. گزارش شده است که مقدار بیش از حد و بالای محرک، تأثیر مخربی بر ظرفیت بیوسنتزی سلول‌های گیاه دارد و با ایجاد پاسخ فوق حساسیت، در نهایت منجر به مرگ سلولی می‌شود؛ درحالی‌که یک سطح بهینه از آن برای تحریک مورد نیاز است. وقتی مقدار محرک از حد مطلوب کمتر باشد، برای فعال‌سازی بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه، مکان‌های اتصال محرک در سلول‌ها به‌طور کامل اشغال نشده است (Kumar et al., 2012). محرک‌های زیستی و غیرزیستی وقتی روی گیاهان اعمال می‌شوند، توسط گیرنده‌های خاص متصل به غشای سلولی، شناسایی شده و سپس توسط یک سیستم انتقال سیگنال به سلول منتقل می‌شوند. در ادامه، بیان ژن‌های کدکننده آنزیم مرتبط با پاسخ دفاعی گیاه و تجمع متابولیت‌های ثانویه را القاء می‌کنند که در نهایت منجر به تشکیل فیتوالکسین‌ها می‌شود (Baenas et al., 2014). همچنین ژن‌های دخیل در بیوسنتز آلکالوئیدها، آنتوسیانین‌ها و اتیلن بیان شده و منجر به فعال شدن آنزیم‌های کلیدی دخیل در بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه می‌شوند (Hao et al., 2020) و در آن‌ها درصد اسانس و میزان تولید متابولیت‌های ثانویه افزایش یافته و این ترکیبات نقش آنتی‌اکسیدانی داشته و از عمل اکسیداسیون در سلول‌ها جلوگیری می‌نمایند (Roy et al., 2022). در پژوهش حاضر، تیمار ½ عصاره کشت سبب شد میزان سیترونلال، ترانس-کاروئول، سیترال و لینالول به‌ترتیب ۳۱، ۳۲، ۴۱ و ۳۴ درصد در مقایسه با شاهد افزایش یابد. یافته‌های پژوهش حاضر، نقش عصاره کشت را به‌عنوان یک محرک ثابت کرد که با افزایش مقدار آن از صفر به ½ حجمی/حجمی، محتوای ترکیبات اصلی اسانس در اندام هوایی *M. officinalis* به جز گاما-۳-کارن افزایش یافت. چندین گزارش نشان داده است که استفاده از قارچ *S. indica* اثرات مثبتی بر تولید بسیاری از متابولیت‌های ثانویه در کشت درون شیشه‌ای برخی گیاهان دارویی دارد. در تحقیقی بر روی کشت ریشه موئین کتان Kumar et al. (2012) افزایش به‌ترتیب ۳/۸ و ۴/۴ برابری غلظت متابولیت‌های ثانویه‌ی پودوفیلوتوکسین و ۶-متوکسی پودوفیلوتوکسین را گزارش کردند که در تیمار ۳ درصد (حجمی/حجمی) با عصاره کشت استریل‌شده با فیلتر قارچ *S. indica* بدست آمد. همچنین Ahlawat et al. (2014) افزایش ۱/۹۷ برابری در میزان آرتمیزین در کشت ریشه موئین درمنه گزارش کردند. مشخص شده نه‌تنها میسلیوم و کلامیدوسپور قارچ *S. indica*، بلکه عصاره کشت آن نیز

قادر است به همان اندازه اثرات تحریک‌کنندگی مثبت روی گیاهان میزبان داشته باشد (Mensah et al., 2020). عصاره کشت شامل تراوشات، هورمون‌ها، مواد معدنی، پروتئین‌ها و آنزیم‌ها هستند که اثرات سودمندی را نمایش می‌دهد (Jangir et al., 2021). اثر تحریک قارچی را می‌توان به اثرات مجزا یا توام ترکیبات خارج سلولی قارچ از جمله آنزیم‌ها، کیتین و دی‌ساکاریدها نسبت داد (Varma et al., 2013). برای تکثیر این قارچ، از محیط کشت پیچیده (محیط کشت آسپرژیلوس تغییریافته حاوی عناصر پرمصرف، کم مصرف، عصاره مخمر، پپتون و کازئین هیدرولیزات) استفاده شد. همانگونه که ملاحظه می‌شود یکی از اجزای محیط کشت، عصاره مخمر است. در پژوهشی نقش عصاره مخمر به‌عنوان یک محرک در افزایش میزان اسانس و ترکیبات اصلی اسانس بادرنجبویه گزارش شده است (Hedayati & Abdoli, 2021). عصاره کشت قارچ *S. indica* به‌طور گسترده در کشت‌های سوسپانسیون سلولی و ریشه موئین برای افزایش بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه استفاده شده است (Kumar et al., 2012). با وجود این، تا به حال استفاده از عصاره کشت و هموژنایت سلولی اتوکلاو شده این قارچ در تولید متابولیت ثانویه بادرنجبویه گزارش نشده است. اتوکلاو سبب دناتوره شدن پروتئین‌ها و تجزیه اسیدهای آمینه عصاره سلولی قارچ می‌شود (Salehi et al., 2018). همچنین Kumar et al. (2017) بیان کردند الیسیتورهای موجود در عصاره کشت احتمالاً در برابر حرارت ناپایدار بوده و ممکن است قابلیت تحریکی خود را در اتوکلاو از دست داده باشند. در مطابقت با نتایج به‌دست آمده در این پژوهش، گزارش شده که استفاده از عصاره کشت و هموژنایت سلولی اتوکلاو شده نیز می‌توانند به‌طور چشم‌گیری منجر به افزایش متابولیت‌های ثانویه ارزشمند در گیاهان دارویی شود (Kruszka et al., 2022). با مقایسه نتایج حاصل از تأثیر عصاره کشت استریل شده با اتوکلاو و فیلتر، بر رشد و محتوای لیگنان در کشت ریشه مویین کتان، مشخص کردند که به جز درجه افزایش رشد و محتوای لیگنان، الگوی نتایج تقریباً یکسان است. افزایش محتوای لیگنان، فعالیت فنیل آلانین آمونیالیاز (PAL) و وزن خشک سلول با افزودن عصاره کشت استریل شده با فیلتر، بیشتر از عصاره کشت اتوکلاو شده بود. بنابراین می‌توان استنباط کرد که برخی مولکول‌های (محصولات خارج سلولی سلول‌های قارچی) مسئول افزایش تجمع لیگنین و رشد، ممکن است حساس به حرارت باشند که در طول اتوکلاو، اثر محرکی و فعالیت تحریک کننده رشد خود را از دست داده‌اند (Kumar et al., 2012).

یافته‌های این پژوهش نشان دادند استفاده از عصاره کشت و هموژنایت سلولی قارچ *S. indica* به تنهایی یا توام با هم می‌توانند به‌عنوان محرک‌های زیستی بر برخی شاخص‌های فیزیولوژیکی گیاه دارویی بادرنجبویه تأثیر بگذارند. فتوسنتز یک فرآیند فیزیولوژیکی کلیدی برای رشد و نمو گیاهان است که کلروفیل یک رنگدانه مهم برای آن هستند (Li et al., 2019). همچنین کاروتنوئیدها مهمترین رنگدانه‌های گیاهی هستند که دارای خواص آنتی‌اکسیدانی هستند. کاروتنوئیدها از سلول‌ها در برابر آسیب‌های ناشی از رادیکال‌های آزاد محافظت می‌کنند و در تحمل گیاه به تنش‌های محیطی، نقش مهمی بازی می‌کنند. در پژوهش حاضر، تأثیر عصاره کشت و هموژنایت سلولی اتوکلاو شده *S. indica* بر محتوای رنگیزه‌های فتوسنتزی (کلروفیل a، کلروفیل b ، کلروفیل کل و کاروتنوئیدها) بادرنجبویه چندان معنی‌دار نبود. برخلاف نتایج پژوهش حاضر، در پژوهشی بر روی گیاه گوجه فرنگی، Haghighat et al. (2024) گزارش نموده‌اند بیشترین میزان کلروفیل کل و کاروتنوئیدها در تیمار تلقیح‌شده با قارچ *S. indica* و کمترین مقدار آنها در تیمار تلقیح‌نشده مشاهده شده است. نتایج پژوهش انجام‌شده در انگور حاکی از آن است که تلقیح با قارچ *S.*

*indica*سبب افزایش محتوای کلروفیل می‌شود (Espareh et al., 2023). همچنین Li et al. (2019) گزارش کردند که بیشترین محتوای رنگیزه‌های فتوسنتزی، در گیاهچه‌های موز تلقیح‌شده با این قارچ بدست آمده است. تاکنون روند تغییرات رنگیزه‌های فتوسنتزی و سایر صفات فیزیولوژیکی بادرنجبویه تحت تأثیر محلول‌پاشی عصاره کشت و هموژنایت سلولی اتوکلاو شده بررسی نشده است. با توجه به این نتایج می‌توان استنباط کرد که یکی از دلایل عدم همسویی نتایج، احتمالاً به‌خاطر این است که سایر پژوهشگران گیاهان مذکور را با قارچ *S. indica* تلقیح و همزیست کرده‌اند، امّا در پژوهش حاضر، عصاره کشت و هموژنایت سلولی اتوکلاو شده بر روی اندام هوایی گیاه محلول‌پاشی شده است. همان‌طور که اشاره شد اتوکلاو سبب دناتوره شدن پروتئین‌ها و تجزیه اسیدهای آمینه عصاره قارچ می‌شود (Salehi et al., 2018). نتایج پژوهش حاضر با نتایج پژوهش Baishya et al. (2015) که گزارش داده‌اند محتوای کلروفیل a، کلروفیل b و کاروتنوئیدها در گیاهان شاهد و تیمارشده با قارچ *S. indica* اتوکلاو شده تفاوت معنی‌داری ندارد، مطابقت زیادی دارد. در پژوهش حاضر،کمترین محتوای رنگیزه‌های فتوسنتزی در تیمار ترکیبی ½ عصاره کشت+۱۶۰ میلی‌گرم در لیتر هموژنایت سلولی و همچنین غلظت بالای هموژنایت سلولی به‌دست آمد. پژوهش‌های مختلف نشان داده است که کاهش کلروفیل عمدتاً به علّت تخریب ساختمان کلروپلاست و دستگاه فتوسنتزی، فتواکسیداسیون کلروفیل‌ها، تخریب پیش ماده‌های کلروفیل و یا ممانعت از بیوسنتز کلروفیل است (Arif et al., 2020). تأثیر محلول‌پاشی عصاره کشت و هموژنایت سلولی قارچ *S. indica* به‌طور جداگانه و ترکیبی بر تغییرات محتوای پرولین، مالون‌دی‌آلدهید، قندهای محلول و فلاونوئید کل در سطح احتمال ۱ درصد معنی‌دار بود. نتایج این پژوهش نشان داد محتوای پرولین در برخی تیمارها در مقایسه با شاهد افزایش یافت و بیشترین محتوای آن در تیمار هموژنایت سلولی با غلظت‌های ۸۰ و ۱۶۰ میلی‌گرم در لیتر بدست آمد. در گیاهان در معرض تنش، اسمولیت‌هایی همانند پرولین که یک نوع آمینواسید ضد تنش است تولید می‌شوند که منجر به جاروب شدن رادیکال هیدروکسیل و گونه‌های فعال اکسیژن می‌شوند. پرولین فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان را افزایش داده و گونه‌های فعال اکسیژن را حذف نموده و منجر به افزایش مقاومت گیاه در برابر تنش اکسیداتیو و تنظیم رشد آن‌ها می‌شود (Haghparvar et al., 2022). محتوای مالون‌دی-آلدهید به عنوان شاخص تنش اکسیداتیو وارد به لیپیدهای غشاء، تحت تأثیر تیمارهای مذکور اندازه‌گیری شد. نتایج نشان داد تیمارهای مجزای هموژنایت سلولی به‌ویژه دو مقدار ۲۰ و ۸۰ میلی‌گرم در لیتر آن نسبت به تیمارهای مجزا و ترکیبی عصاره کشت، سبب افزایش بیشتر غلظت مالون‌دی آلدهید شد. روند تغییرات تولید مالون‌دی‌آلدهید تحت تأثیر محلول‌پاشی عصاره کشت و هموژنایت سلولی اتوکلاو شده تاکنون در گیاه دارویی بادرنجبویه بررسی نشده است. اثر تیمارهای این پژوهش به‌طور جداگانه و ترکیبی بر صفت میزان قندهای محلول بادرنجبویه در سطح احتمال یک درصد بسیار معنی‌دار بود و حداکثر مقدار آن در کاربرد جداگانه هموژنایت سلولی بدست آمد که به-میزان ۴۷ درصد نسبت به شاهد افزایش نشان داد. بسیاری از شرایط تنش‌زای محیطی بر متابولیسم قندها و پخش مواد فتوسنتزی در گیاهان در حال رشد اثر می‌گذارند. بر اساس نتایج این پژوهش، Haghighat et al. (2024) گزارش دادند تلقیح با قارچ *S. indica* میزان کربوهیدرات‌های محلول را افزایش داد. ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی شاخص‌هایی حساس به تغییرات محیطی هستند و در سازوکارهای دفاعی گیاهان نقش مهمی را بر عهده دارند (Khodamoradi et al., 2022). آنزیم فنیل آلانین آمونیالیاز یک آنزیم کلیدی در مسیر بیوسنتز ترکیبات فنلی

و فلاونوئیدها است که در شرایط تحت تنش زیستی و غیر زیستی فعالیت آن افزایش می‌یابد. در انواع تنش‌ها مانند محرک‌ها، آنزیم PAL فعال شده و سبب افزایش تولید ترکیبات فنلی می‌شود (Zhang et al., 2022). در این پژوهش، چهار سطح هموژنایت سلولی به‌صورت مجزا یا ترکیبی با عصاره کشت در مقایسه با شاهد تأثیر معنی‌داری بر تولید ترکیبات فنلی نداشت. برخلاف این نتایج، پژوهش‌های مختلفی نشان داده است که تلقیح با قارچ *S. indica* سبب افزایش ترکیبات فنلی می‌شود، امّا پژوهش مستقیمی در مورد تأثیر محلول‌پاشی با عصاره کشت و هموژنایت سلولی این قارچ در بادرنجبویه انجام نشده است. می‌توان استنباط کرد که برخی از مولکول‌های خارج سلولی قارچ، ممکن است در طول اتوکلاو، اثر محرکی خود را از دست داده‌اند. در پژوهش دیگری، عصاره کشت اتوکلاوشده در مقایسه با عصاره کشت استریل شده با فیلتر هیچ تاثیری بر تولید آلکالوئید در کشت سلولی نداشت (Kumar et al., 2017).

نتیجه‌گیری کلی

این پژوهش به بررسی تأثیر محلول‌پاشی عصاره کشت و هموژنایت سلولی قارچ اندوفیت *S. indica* به‌صورت مجزا و اثر توام آنها بر ترکیب شیمیایی، میزان اسانس و برخی صفات فیزیولوژیکی بادرنجبویه پرداخته است. در پژوهش حاضر، محرک‌ها منجر به افزایش اجزای اصلی اسانس نسبت به شاهد شدند. در مجموع ۳۸ ترکیب شیمیایی مختلف توسط دستگاه GC/MS در اسانس بادرنجبویه شناسایی شد که به‌ترتیب سیترونلال، گاما-۳-کارن، ترانس-کاروئول، سیترال و لینالول، ترکیبات اصلی بودند. بیشترین میزان اسانس و ترکیبات عمده آن شامل سیترونلال، ترانس-کاروئول، سیترال و لینالول توسط تیمار ترکیبی ½ عصاره کشت به‌همراه ۱۶۰ میلی‌گرم در لیتر هموژنایت سلولی و کمترین میزان در تیمار شاهد (بدون محرک) به دست آمد. سیترال با سیترونلال، ترانس-کاروئول و لینالول همبستگی مثبت و معنی‌دار و با محتوای گاما-۳-کارن همبستگی منفی و معنی‌دار نشان داد ($P \leq$ ۰/۰۱). نقشه حرارتی نشان داد که گیاهان تیمارشده را می‌توان در ۳ گروه اصلی گروه‌بندی کرد و جدایی آشکاری را بین شاهد و گروه‌های تیماری نشان داد. همچنین محلول‌پاشی عصاره کشت و هموژنایت سلولی این قارچ به‌طور معنی‌داری بر برخی فاکتورهای فیزیولوژیکی مانند قندهای محلول، محتوای مالون‌دی‌آلدهید، اسید آمینه پرولین و فلاونوئید کل تأثیر داشت. در مجموع، به نظر می‌رسد عصاره کشت و هموژنایت سلولی این قارچ، پتانسیل عمل به‌عنوان یک محرک زیستی برای بهبود تولید برخی از ترکیبات عمده اسانس در بادرنجبویه و سایر گیاهان دارویی را داشته باشد.

سپاسگزاری

بدین‌وسیله نویسندگان این مقاله مراتب تشکر و قدردانی خود را از دانشگاه ملایر به خاطر حمایت از انجام این پژوهش ابراز می‌کنند.

References

Adams, R. P. (2007). *Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/ mass Spectrometery*. Allured Publishing Corporation, Carol Stream.

Ahlawat, S., Saxena, P., Alam, P., Wajid, S., & Abdin, M. Z. (2014). Modulation of artemisinin biosynthesis by elicitors, inhibitor, and precursor in hairy root cultures of *Artemisia annua* L. *Journal of Plant Interactions*, *9*(1), 811–824. https://doi.org/10.1080/17429145.2014.949885

Ahmadi, T., L. Shabani & Sabzalian, M. R. (2021). Led light sources improved the essential oil components and antioxidant

activity of two genotypes of lemon balm (*Melissa officinalis* L.). *Botanical Studies*, 62(9), 1-13. https://doi.org/10.1186/s40529-021-00316-7

Albayrak, G., Ozturk, I., Tekintas, Y., Kurkcuoglu, M., Erguc, A. & Baykan, S. (2024). Chemical composition, antimicrobial and antibiofilm activities of essential oil from Turkish endemic *Prangos hulusii* fruits. *Journal of Essential Oil Research*, *36*(5), 481-492. https://doi.org/10.1080/10412905.2024.2392188

Arif, Y., Singh, P., Siddiqui, H., Bajguz, A., & Hayat, S. (2020). Salinity induced physiological and biochemical changes in plants: An omic approach towards salt stress tolerance. *Plant Physiology and Biochemistry*, *156*, 64–77. https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2020.08.042

Baenas, N., Garcia-Viguera, C., & Moreno, D. A. (2014). Elicitation: A tool for enriching the bioactive composition of foods. *Molecules*, *19*(9), 13541–13563. https://doi.org/10.3390/molecules190913541

Baharlou, M., Ghasemi Pirbalouti, A., & Malekpoor, F. (2019). Effect of different concentrations of L-phenylalanine on chemical compositions and yield of essential oil of lemon balm (*Melissa officinalis*). *Journal of Herbal Drugs*, *10*(4), 183-191. https://journals.iau.ir/article_678696.html

Baishya, D., Deka, P., & Kalita, M. C. (2015). *In vitro* co-cultivation of *Piriformospora indica* filtrate for improving biomass productivity in *Artemisia annua* (L.). *Symbiosis*, *66*(1), 37-46. https://doi.org/10.1007/s13199-015-0331-5

Bates, L. S., Waldren, R. P., & Teare, I. D. (1973). Rapid determination of free proline for water stress studies. *Plant and Soil*, *39*, 205-207. https://doi.org/10.1007/BF00018060

Behbahani, B. A., & Shahidi, F. (2019). *Melissa officinalis* essential oil: Chemical compositions, antioxidant potential, total phenolic content and antimicrobial activity. *Nutrition and Food Sciences Research*, *6*(1), 17–25. http://dx.doi.org/10.29252/nfsr.6.1.17

Chang, C., Yang, M., Wen, H., & Chern, J. (2002). Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. *Journal of Food and Drug Analysis*, *10*(3), 178–182. https://B2n.ir/md9358

Chung, M. J., Cho, S. Y., Bhuiyan, M. J. H., Kim, K. H., & Lee, S. J. (2010). Antidiabetic efects of lemon balm (*Melissa officinalis*) essential oil on glucose- and lipid-regulating enzymes in type 2 diabetic mice. *British Journal of Nutrition*, *104*(2), 180–188. https://doi.org/10.1017/S0007114510001765

Edris, A. E. (2007). Pharmaceutical and therapeutic potentials of essential oils and their individual volatile constituents: a review. *Phytotherapy Research*, *21*(4), 308-323. https://doi.org/10.1002/ptr.2072

Espareh, A., Ghabooli, M., Ershadi, A., Karimi, R., & Movahedi, Z. (2023). Effect of foliar application of calcium and inoculation with endophytic fungus, *Serendipita indica*, on improving growth, photosynthetic pigments, and increasing antioxidant capacity of 'Sultana grapevine' (*Vitis vinifera*) under drought stress. *Journal of Plant Biological Sciences*, *15*(1), 111-138. https://doi.org/10.22108/ijpb.2024.139540.1338 [In Persian]

Ghabooli, M., Khatabi, B., Ahmadi, F. S., Sepehri, M., Mirzaei, M., Amirkhani, A., Jorrín-Novo, J. V., & Salekdeh, G. H. (2013). Proteomics study reveals the molecular mechanisms underlying water stress tolerance induced by *Piriformospora indica* in barley. *Journal of Proteomics*, *94*, 289-301. https://doi.org/10.1016/j.jprot.2013.09.017

Ghasemi Pirbalouti, A., Nekoei, M., Rahimmalek, M., & Malekpoor, F. (2019). Chemical composition and yield of essential oil from lemon balm (*Melissa officinalis* L.) under foliar applications of jasmonic and salicylic acids. *Biocatalysis and Agricultural, Biotechnologydoi*, *19*, 101144. https://doi:10.1016/j.bcab.2019.101144

Haghighat, F., Ghabooli, M., Movahedi, Z., & Abdoli, M. (2024). Effects of endophytic fungi, *Serendipita indica* and *Colletotrichum tofieldiae* on the growth and morphophysiological traits of tomato plants at different phosphate concentrations in a hydroponic system. *Journal of Plant Biological Sciences*, *16*(2), 19-38. https://doi.org/10.22108/IJPB.2025.143232.1374 [In Persian]

Haghparvar, F. R., Hashemabadi, D., & Kaviani, B. (2022). Effect of arginine, proline and glutamine amino acids on morphological and physiological traits of two African Marigold. *Journal of Ornamental Plants*, *12*(3), 191-202. https://journals.iau.ir/article_687654_282800e8689617141fd1b4d8e1ffabc8.pdf

Hammer, O., & Harper, D. A. T. (2024). *Paleontological data analysis*. John Wiley & Sons.

Hao, X., Pu, Z., Cao, G., You, D., Zhou, Y., Deng, C. & Kai, G. (2020). Tanshinone and salvianolic acid biosynthesis are regulated by SmMYB98 in *Salvia miltiorrhiza* hairy roots. *Journal of Advanced Research*, *23*, 1-12. https://doi.org/10.1016/j.jare.2020.01.012

Hatami, M., Khanizadeh, P., Bovand, F., & Aghaee, A. (2021). Silicon nanoparticle-mediated seed priming and *Pseudomonas* spp. inoculation augment growth, physiology and antioxidant metabolic status in *Melissa officinalis* L. plants. *Industrial Crops and Products*, *162*, 113238. https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2021.113238

Heath, R. L., & Packer, L. (1968). Photoperoxidation in isolated chloroplasts: I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, *125*(1), 189-198. https://doi.org/10.1016/0003-9861(68)90654-1

Hedayati, A., & Abdoli, M. (2021). Foliar application of yeast extract and salicylic acid affect chemical composition and content of lemon balm (*Melissa officinalis* L.) essential oil. *Journal of Plant Molecular Breeding*, *9*(1), 12 -24. https://B2n.ir/rm7317

Hill, T. W., & Käfer, E. (2001). Improved protocols for *Aspergillus* minimal medium: trace element and minimal medium salt stock solutions. *Fungal Genetics Reports*, *48*(1), 20-21. https://newprairiepress.org/fgr/vol48/iss1/8/

Irigoyen, J., Einerich, D., & Sánchez- Díaz, M. (1992). Water stress induced changes in concentrations of proline and total soluble sugars in nodulated alfalfa (*Medicago sativa*) plants. *Physiologia Plantarum*, *84*(1), 55-60. https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1992.tb08764.x

Jangir, P., Shekhawat, P. K., Bishnoi, A., Ram, H., & Soni, P. (2021). Role of *Serendipita indica* in enhancing drought tolerance in crops. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, *116*, 101691. https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2021.101691

Jeyasri, R., Muthuramalingam, P., Karthick, K., Shin, H., Choi, S. H., & Ramesh, M. (2023). Methyl jasmonate and salicylic acid as powerful elicitors for enhancing the production of secondary metabolites in medicinal plants: An updated review. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, *153*(3), 447-458. https://doi.org/10.1007/s11240- 023-02485-8

Khodamoradi, S., Sagharyan, M., Samari, E., & Sharifi, M. (2022) Changes in phenolic compounds production as a defensive mechanism against hydrogen sulfide pollution in *Scrophularia striata*. *Plant Physiology and Biochemistry*, *177*, 23-31. https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2022.02.013

Kittler, J., Krüger, H., Lohwasser, U., Ulrich, D., Zeiger, B., Schütze, W., Böttcher, C., Gudi, G., Kästner, U., & Marthe, F. (2017). Evaluation of 28 balm and lemon balm (*Melissa officinalis*) accessions for content and composition of essential oil and content of rosmarinic acid. *Genetic Resources and Crop Evolution*, *65*(1), 745-757. https://doi.org/10.1007/s10722-017-0568-3

Kruszka, D., Selvakesavan, R. K., Kachlicki, P. & Franklin, G. (2022). Untargeted metabolomics analysis reveals the elicitation of important secondary metabolites upon treatment with various

metal and metal oxide nanoparticles in *Hypericum perforatum* L. cell suspension cultures. *Industrial Crops and Products, 178*, 114561. https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2022.114561

Kumar, P., Srivastava, V., & Chaturvedi, R. (2017). Elicitor enhanced production of protoberberine alkaloids from *in vitro* cell suspension cultures of *Tinospora cordifolia* (Willd.). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 130*, 417–426. https://doi.org/10.1007/s11240-017-1237-0

Kumar, V., Rajauria, G., Sahai, V., & Bisaria, V. (2012). Culture filtrate of root endophytic fungus *Piriformospora indica* promotes the growth and lignan production of *Linum album* hairy root cultures. *Process Biochemistry, 47,* 901–907. https://doi.org/10.1016/j.procbio.2011.06.012

Kumari, N, Varghese, B. A., Khan, M. A., Jangra, S., & Kumar, A. (2020). Abiotic elicitation: a tool for producing bioactive compounds. *Plant Archives, 20*, 2683–2689.

Kuzel, S., Vydra, J., Triska, J., Vrchotova, N., Hruby, M. & Cigler, P. (2009). Elicitation of pharmacologically active substances in an intact medical plant. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 57*, 7907–7911. https://doi.org/10.1021/jf9011246

Li, D., Mensah, R. A., Liu, F., Tian, N., Qi, Q., Yeh, K. W., Xuhan, X., Cheng, C. Z., & Lai, Z. X. (2019). Effects of *Piriformospora indica* on rooting and growth of tissue-cultured banana (*Musa acuminata* cv. Tianbaojiao) seedlings. *Scientia Horticulturae, 257,* 108649. https://doi.org/10.1016/j.scienta.2019.108649

Lichtenthaler, H. K. (1987). Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. In inflammation and oxidative damage in rats. *Food and Function, 12*(1), 397-407. https://doi.org/10.1039/D0FO01873B

Mehrpooya, Zh., Abdoli, M., & Talebian, M. A. (2021). Effect of salicylic acid and yeast extract on caffeic acid derivatives production in *Echinacea purpurea* L. *Journal of Medicinal Plants, 20*(78), 36-47. http://dx.doi.org/10.52547/jmp.20.78.36

Mensah, R. A., Li, D., Liu, F., Tian, N., Sun, X. L., Hao, X. Y., Lai, Z. X., & Cheng, C. Z. (2020). Versatile *Piriformospora indica* and its potential applications in horticultural crops. *Horticultural Plant Journal, 6*(2), 111–121. https://doi.org/10.1016/j.hpj.2020.01.002

Miraj, S., Rafieian-Kopaei, M., & Kiani, S. (2017). *Melissa officinalis* L: a review study with an antioxidant prospective. *Journal of Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 22*(3), 385–394. https://doi.org/10.1177/2156587216663433

Mrlianova, M., Tekelova, D., Felklova, M., Reinohl, V., & Toth, J. (2002). The influence of the harvest cut height on the quality of the herbal drugs *Melissae folium* and *Melissae herba*. *Planta Medica, 68*(2), 178-180. https://www.thieme-connect.com/products/ejournals/abstract/10.1055/s-2002-20247

Namdeo, A. G. (2007). Plant cell elicitation for production of secondary metabolites. *Pharmacological Reviews, 1*(1), 69-79. https://www.cabidigitallibrary.org/doi/full/10.5555/20083090443

Petrisor, G., Motelica, L., Craciun, L. N., Oprea, O. C., Ficai, D., & Ficai A. (2022). *Melissa officinalis*: Composition, Pharmacological Effects and Derived Release Systems—A Review. *International Journal of Molecular Sciences, 23*, 3591. https://www.mdpi.com/1422-0067/23/7/3591

Ronald, S. F., & Laima, S. K. (1999). Phenolics and cold tolerance of *Brassica napus*. *Plant Agriculture, 1*, 1-5.

Roy, A., Khan, A., Ahmad, I., Alghamdi, S., Rajab, B. S., Babalghith, A. O., & Islam, M. R. (2022). Flavonoids a bioactive compound from medicinal plants and its therapeutic applications. *BioMed Research International*, 5445291. https://doi.org/10.1155/2022/5445291

Salehi, M., Moieni, A., & Safaie, N. (2018). Elicitors derived from hazel (*Corylus avellana* L.) cell suspension culture enhance growth and paclitaxel production of *Epicoccum nigrum*. *Scientific Reports*, *8*(1), 12053. https://doi.org/10.1038/s41598-018-29762-3

Schilcher, H. (2016). *Leitfaden Phytotherapie*, Elsevier.

Shakeri, A., Sahebkar, A., & Javadi, B. (2016). *Melissa officinalis* L. A review of its traditional uses, phytochemistry and pharmacology. *Journal of Ethnopharmacology, 188*, 204-228. https://doi.org/10.1016/j.jep.2016.05.010

Silva, T. C., Bertolucci, S. K. V., Carvalho, A. A., Tostes, W. N., Alvarenga, I. C. A., Pacheco, F. V., ... & Pinto, J. E. B. P. (2021). Macroelement omission in hydroponic systems changes plant growth and chemical composition of *Melissa officinalis* L. essential oil. *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants*, *24*, 100297. https://doi.org/10.1016/j.jarmap.2021.100297

Son, Y. J., Park, J. E., Kim, J., Yoo, G., & Nho, C. W. (2021). The changes in growth parameters, qualities, and chemical constituents of lemon balm (*Melissa officinalis* L.) cultivated in three different hydroponic systems. *Industrial Crops and Products*, *163*, 113313. https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2021.113313

Taherpour, A., Maroof, H., Rafe, Z., & Larijani, K. (2012). Chemical composition analysis of the essential oil of *Melissa ofcinalis* L. from Kurdistan, Iran by HS/ SPME method and calculation of the biophysicochemical coefcients of the components. *Natural Product Research*, *26*(2), 152–160. https://doi.org/10.1080/14786419.2010.534733

Teimory, H., Ghabooli, M., & Movahedi, Z. (2021). Effects of different inoculation methods of *Serendipita indica* on some morphophysiological, biochemical, and yield traits of tomato under drought stress. *Journal of Plant Biological Sciences*, *13*(2), 1-22. https://doi.org/10.22108/ijpb.2021.128853.1253 [In Persian]

Twaij, B. M., & Hasan, M. N. (2022). Bioactive secondary metabolites from plant sources: types, synthesis, and their therapeutic uses. *International Journal of Plant Biology and Research, 13*(1), 4–14. https://doi.org/10.3390/ijpb13010003

Ulgen, C., Yildirim, A. B., Sahin, G. & Turker, A. U. (2021). Do magnetic field applications affect in vitro regeneration, growth, phenolic profiles, antioxidant potential and defense enzyme activities (SOD, CAT and PAL) in lemon balm (*Melissa officinalis* L.). *Industrial Crops and Products*, *169*, 113624. https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2021.113624

Varma, A., Kost, G., & Oelmüller, R. (2013). *Piriformospora indica: Sebacinales and Their Biotechnological Applications.* Springer Science & Business Media.

Yadegari, M. (2016). Effect of micronutrients foliar application and biofertilizeres on essential oils of lemon balm. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, *16*(3), 702-715.http://doi.org/10.4067/S0718-95162016005000051

Zhang, Y. W., Nie, F., Zheng, X. Y., & Zhao, S. J. (2022). L-tyrosine metabolic pathway in microorganisms and its application in the biosynthesis of plant-derived natural products. *World Journal of Traditional Chinese Medicine*, *8*(3), 386-394. https://B2n.ir/hm8608