

Improving some biochemical characteristics of lemon balm (*Melissa officinalis* L.) with phytohormones-like activity of plant-derived smoke

Faride Noroozi Shahri, Saeid Jalali Honarmand*, Mohsen Saeidi, Farzad Mondani

Department of Genetic and Plant Production, Razi University, Kermanshah, Iran.

(Received: January 26, 2022- Accepted: April 5, 2022)

ABSTRACT

In order to evaluate the phytohormones-like effects of plant-derived smoke on some biochemical characteristics of lemon balm, an experiment was conducted as a split plot in time based on complete randomized block design with three replications in research greenhouse of campus of agricultural and natural resources of Razi University in 2017. The main factor was different levels of leaf foliar application (including four concentrations of smoke-water (i.e., 1:5000, 1:1000, 1:500, and 1:100 (v/v)) accompanied with cytokinin, auxin, and gibberellic acid (each with a concentration of 50 μ M), as well as the control) and the sub-factor included two harvest stages. The results indicated that the application of different concentrations of smoke-water and growth phytohormones significantly increased the content of chlorophyll and carotenoids, photosynthesis rate, transpiration rate and stomatal conductance, but reduced the accumulation of soluble carbohydrate content and the percentage of electrolyte leakage. However, chlorophyll fluorescence parameters, anthocyanin content, soluble protein content and activity rate of antioxidant enzymes were not significantly affected by foliar application levels. In general, these findings indicate that plant-derived smoke similar to growth phytohormones has a great potential to improve biochemical efficiency of lemon balm and can be considered as a natural agrochemical.

Keywords: Auxin, cytokinin, gibberellic acid, karrikin, smoke-water.

بهبود برخی از ویژگی‌های بیوشیمیایی بادرنجبویه (*Melissa officinalis* L.) با فعالیت شبه فیتوهورمونی دود حاصل از گیاهان

فریده نوروزی شهری^۱، سعید جلالی هنرمند^{۲*}، محسن سعیدی^۲، فرزاد مندنی^۲

۱- به ترتیب دانش‌آموخته دکتری و دانشیار، گروه مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی، دانشگاه رازی، کرمانشاه، ایران.

(تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۱۱/۰۶ - تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۱/۱۶)

چکیده

به منظور بررسی اثر شبه فیتوهورمونی دود حاصل از گیاهان روی برخی صفات بیوشیمیایی گیاه بادرنجبویه آزمایشی به صورت اسپلیت پلات در زمان بر پایه طرح بلوک‌های کامل تصادفی با سه تکرار در گلخانه تحقیقاتی پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه رازی در سال ۱۳۹۶ اجرا شد. در این آزمایش سطوح مختلف محلول‌پاشی برگ (شامل شاهد، دودآب با غلظت‌های ۱:۵۰۰۰، ۱:۱۰۰۰، ۱:۵۰۰ و ۱:۱۰۰ (v/v)) و فیتوهورمون‌های سیتوکینین، اسیدجیبرلیک و اکسین هر یک با غلظت ۵۰ میکرومولار) به‌عنوان عامل اصلی و دو چین برداشت به‌عنوان عامل فرعی در نظر گرفته شد. نتایج نشان داد که غلظت‌های مختلف دودآب و فیتوهورمون‌های رشد به طور معنی‌داری محتوای کلروفیل و کاروتنوئیدها، سرعت فتوسنتز، سرعت تعرق و هدایت روزنه‌ای و محتوای فنول کل را افزایش دادند، در حالی که موجب کاهش تجمع کربوهیدرات‌های محلول و درصد نشت الکترولیت‌ها شدند. پارامترهای فلورسانس کلروفیل، محتوای آنتوسیانین‌ها، محتوای پروتئین‌های محلول و سرعت فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان تحت تاثیر معنی‌دار سطوح محلول‌پاشی قرار نگرفتند. به‌طور کلی، این نتایج نشان می‌دهد که تیمار دود حاصل از گیاهان مشابه با فیتوهورمون‌های رشد پتانسیل زیادی برای بهبود کارایی بیوشیمیایی گیاه بادرنجبویه دارد و می‌تواند به‌عنوان یک آگروکمیکال طبیعی مطرح شود.

واژه‌های کلیدی: اسیدجیبرلیک، اکسین، دودآب، سیتوکینین، کاربکین.

مقدمه

فیتوهورمون‌ها در مقادیر بسیار کم فرآیندهای بیوشیمیایی، فیزیولوژیک و مورفولوژیک گیاهان را تنظیم می‌کنند (Rademacher, 2015). حداقل نه گروه از فیتوهورمون‌ها مورد مطالعه وسیع قرار گرفته‌اند. در این میان اکسین‌ها، سیتوکینین‌ها، براسینواستروئیدها، جیبرلین‌ها و استریگولاکتون‌ها نقش مهمی در رشد و توسعه نرمال گیاهان، آبسزیک‌اسید و اتیلن واسطه پاسخ به تنش‌های غیر زیستی، جاسمونیک‌اسید دارای نقش در پاسخ‌های دفاعی در مقابل گیاهخواران و سالیسیلیک‌اسید در مقابل پاتوژن‌ها هستند. به‌علاوه طیف وسیعی از ترکیبات شیمیایی و بسیاری از پپتیدهای ترشحی به‌عنوان مولکول‌های سیگنالی، با فعالیت‌های شبه فیتوهورمونی شناخته شده‌اند (Tavormina et al., 2015). در سال‌های اخیر، نقش محرک دود حاصل از گیاهان نشان داده است که ترکیباتی بیواکتیو در آن وجود دارد. سه دسته از ترکیبات کلیدی دود شامل اکسیدهای نیتروژن، کاربکین‌ها و سیانوئیدها مورد بررسی قرار گرفته‌اند که علی‌رغم پاسخ چند گونه گیاهی به اکسیدهای نیتروژن و سیانوئیدها به نظر نمی‌رسد که این دسته از ترکیبات بتوانند مسئول پاسخ‌های فیزیولوژیک گیاهان تحت تیمار دود باشند (Flematti et al., 2011). کشف کاربکین‌ها دستاوردی مهم در بیوشیمی و فیزیولوژی گیاهی بود و مطالعات بعدی نشان داد که کاربکین‌ها جنبه‌های فیزیولوژیک مختلفی از چرخه زندگی گیاهان را تحت تاثیر قرار می‌دهند و وقتی در غلظت‌های کم استفاده می‌شوند دارای فعالیت‌های شبه‌فیتوهورمونی هستند (Jain et al., 2008). مطالعه روی اثرات ژنوتوکسیک و سیتوتوکسیک دود آب هیچ نوع ژنوتوکسیتی و آسیب به DNA را برای دود آب و کاربکین‌های حاصل از آن نشان نداده است. بنابراین

دود آب نهاده‌ای ایمن است که می‌توان از محرک‌های زیستی آن در جهت افزایش عملکرد محصولات زراعی و باغبانی استفاده کرد. آگروکمیکال‌های موجود در دود، ترکیباتی فرار، پایدار در برابر حرارت، محلول و مانا در آب هستند؛ لذا عصاره آبی دود یا اصطلاحاً دود آب روشی تسهیل‌شده در کاربرد آن می‌باشد (Light et al., 2015). مطالعات نشان می‌دهد که فیتوهورمون‌های رشد موجب بهبود وضعیت بیوشیمیایی گیاهان می‌شوند. بهبود پارامترهای فتوسنتزی (Kumar et al., 2001)، افزایش محتوای کلروفیل کل، کاروتنوئیدها (Bose et al., 2013; Kavina et al., 2011) و ترکیبات فنولی (Tian et al., 2011; Sayd et al., 2010)، همچنین افزایش محتوای پروتئین‌های محلول و سرعت فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان (Karalija et al., 2017) در گیاهان مختلف تحت کاربرد خارجی هر یک از فیتوهورمون‌های رشد (اکسین، سیتوکینین و اسید-جیبرلیک) گزارش شده است. عصاره‌های آبی دود نیز دارای پاسخ‌های شبه فیتوهورمونی و همچنین برهمکنش با فیتوهورمون‌های درون‌زاد و برون کاربرد گیاهان هستند (Aremu et al., 2016; Jain et al., 2008). ترکیبات بیواکتیو دود حاصل از گیاهان می‌توانند جایگزین الگوهای درونی فیتوهورمون‌ها در طول جوانه‌زنی شوند (Schwachtje & Baldwin, 2004). علاوه‌براین مشاهده شده است که کاربرد دود آب و کاربکینولید حاصل از آن در غلظت‌های پایین در حد نانومولار موجب افزایش سرعت فتوسنتز و همچنین افزایش محتوای کلروفیل کل، محتوای کاروتنوئیدها و ترکیبات فنولی می‌شوند (Aremu et al., 2012; Abdelgadir et al., 2013).

اسیدجیبرلیک و اکسین هر یک با غلظت ۵۰ میکرومولار) در پلات‌های اصلی و دو چین برداشت در پلات‌های فرعی قرار گرفت. فیتوهورمون‌های مورد استفاده عبارت از ۶-بنزیل آمینوپورین (6-BAP) (سیتوکینین)، اسیدجیبرلیک (GA₃) و ۳-ایندول استیک اسید (IAA) (اکسین) ساخت شرکت سیگما آلد ریچ بودند. تیمار شاهد شامل محلول‌پاشی با آب مقطر بود. در هر ۲۵۰ میلی‌لیتر از محلول‌های مورد استفاده که شامل آب مقطر واحدهای آزمایشی شاهد نیز می‌شد از یک قطره توئین ۲۰ به‌عنوان سورفکتانت استفاده شد.

جهت تهیه دودآب بر مبنای روش Van Staden *et al.* (2004) دستگاهی بهبودیافته با شماره ثبت اختراع ۹۹۰۰۱۹ در سازمان ثبت اسناد و املاک کشور طراحی شد. با استفاده از این دستگاه دود ناشی از سوختن اندام‌های خشک گیاهی، ابتدا از مخزنی حاوی آب مقطر تا زمان سوختن کامل ماده گیاهی عبور داده شد؛ به‌طوری‌که آب مقطر کاملاً به رنگ تیره و چگال درآمد. محلول حاصل پس از عبور از کاغذ صافی نمره یک واتمن به‌عنوان محلول پایه در نظر گرفته شد (با شماره ثبت اختراع ۱۰۰۷۳۷ در سازمان ثبت اسناد و املاک کشور) و سپس با استفاده از آب مقطر در غلظت‌های مورد نظر رقیق و جهت اعمال تیمارها به کار برده شد. در این مطالعه برای تهیه دودآب از اندام‌های هوایی و خشک گیاه شقایق (*Papaver rhoeas* L.) در مرحله گلدهی استفاده شد. انتخاب این گیاه و غلظت‌های مورد مطالعه تیمار دودآب، بر اساس نتایج حاصل از پیش-آزمون‌های مربوط به تهیه محلول پایه استاندارد از چند گونه گیاهی، فراوانی آن در منطقه مورد مطالعه و پاسخ گیاهان مختلف از جمله بادرنجبویه به تیمارهای اعمال-شده صورت گرفت.

بادرنجبویه (*Melissa officinalis* L.) یک گیاه دارویی پایا از تیره نعنائیان است. این گیاه حاوی متابولیت‌های ارزشمندی عمدتاً متعلق به دو گروه شیمیایی شامل ترکیبات ترپنی و فنیل پروپانوئیدی با ظرفیت بالای آنتی‌اکسیدانی، ضد میکروبی و ضد پروتوزوایی می‌باشد (Cunha *et al.*, 2016; Lin *et al.*, 2012). از آنجایی‌که عملکرد کمی و کیفی گیاهان دارویی علاوه بر ژنتیک به‌شدت تحت تاثیر عوامل محیطی و مدیریت کشت واقع می‌شود؛ بنابراین استفاده از ترکیبات محرک مانند دودآب می‌تواند با بهبود کارایی بیوشیمیایی و افزایش تولید این گیاهان گامی مهم در پیشبرد اهداف ملی اعم از خودکفایی دارویی، ایجاد اشتغال و توسعه اقتصادی باشد. بررسی منابع انجام‌شده نشان می‌دهد که اخیراً استفاده از دود حاصل از سوختن گیاهان و ترکیبات بیواکتیو آن به‌عنوان تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی در پژوهش‌های علمی رواج یافته است؛ ولی مطالعات انجام-شده عمدتاً در زمینه تحریک جوانه‌زنی بذر و افزایش قدرت گیاهچه بوده و کمتر به تاثیر این ترکیبات در سطح سلولی و بیوشیمیایی به‌عنوان یک شبه فیتوهورمون پرداخته شده است. لذا این پژوهش به مقایسه پاسخ‌های فیزیولوژیک و بیوشیمیایی گیاه دارویی بادرنجبویه به غلظت‌های مختلف دودآب و فیتوهورمون‌های رشد (سیتوکینین، اکسین و اسید-جیبرلیک) می‌پردازد.

مواد و روش‌ها

این آزمایش در سال ۱۳۹۶ در گلخانه تحقیقاتی پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه رازی به صورت اسپلیت پلات در زمان بر پایه طرح بلوک‌های کامل تصادفی با سه تکرار اجرا شد. در این آزمایش هشت سطح محلول‌پاشی برگ گیاه بادرنجبویه (شامل شاهد، دودآب با غلظت‌های ۱:۵۰۰، ۱:۱۰۰۰، ۱:۵۰۰۰ و ۱:۱۰۰ (v/v) به همراه فیتوهورمون‌های سیتوکینین،

تهیه شد. بذرها به‌طور مستقیم در عمق یک سانتی‌متری خاک کشت شدند. تراکم نهایی کاشت ۱۰ بوته در متر مربع بود. در طول دوره رشد دمای گلخانه بین ۲۲ تا ۳۰ درجه سانتی‌گراد و رطوبت نسبی هوا ۶۰ درصد بود و آبیاری بسته به نیاز گیاه انجام می‌شد.

کرت‌های آزمایشی در زمین گلخانه تهیه شد. بستر کاشت شامل خاک مزرعه، کود دامی و ماسه به نسبت ۱-۱-۱ بود. مشخصات فیزیکی و شیمیایی خاک مزرعه مورد استفاده در جدول ۱ آمده است. بذر گیاه بادرنجبویه از مرکز ملی ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران

جدول ۱- خصوصیات فیزیکی و شیمیایی خاک محل آزمایش

Table 1. Physical and chemical characteristics of experiment location soil

Sampling depth (cm)	Organic matter (%)	Silt (%)	Sand (%)	Clay (%)	EC (ds m ⁻¹)	Available Potassium (ppm)	Available Phosphorus (ppm)	Total Nitrogen (%)	pH
0-30	1.27	43.9	10.7	45.4	0.66	282	20.6	0.15	7.31

برای کاروتنوئیدها توسط دستگاه الیزا (مدل BioTek, Powerwave, XS2) اندازه‌گیری و سپس کمی‌سازی شد. شاخص‌های فلورسانس کلروفیل با استفاده از دستگاه فلورومتر (PEA: Plant Efficiency Analyser) (مدل Pocket Pea, Hansatech Instruments Ltd. UK) اندازه‌گیری شد. آخرین برگ توسعه‌یافته گیاه با استفاده از گیره مخصوص دستگاه به مدت ۳۰ دقیقه در تاریکی قرار گرفت و شاخص زنده‌مانی (PI)، حداکثر کارایی فتوشیمیایی فتوسیستم II (Maximum Photochemical Efficiency of PS-II) (Fv/Fm) و کارایی کمپلکس تجزیه‌کننده آب در فتوسیستم II (Fv/F0) در برگ‌های سازگار به تاریکی اندازه‌گیری شد. سرعت فتوسنتز در واحد سطح برگ، هدایت روزنه‌ای، سرعت تعرق، غلظت دی‌اکسیدکربن اتاقک زیر روزنه و دمای برگ با استفاده از دستگاه فتوسنتز متر (Bio scientific Ltd ساخت شرکت Portable LCI) اندازه‌گیری شد.

پس از استقرار کامل بوته‌ها و رسیدن آن‌ها به ارتفاع حدود ۱۵ سانتی‌متر اقدام به اعمال تیمارها شد. برداشت گیاهان در چین اول از ارتفاع ۱۰ سانتی‌متر انجام شد. محلول‌پاشی برای چین دوم پس از رسیدن گیاهان به مرحله رشدی مطابق با چین اول صورت گرفت. در هر یک از چین‌ها، محلول‌پاشی به مدت چهار هفته و در هر هفته دو روز متوالی بین ساعت‌های ۱۸ تا ۲۰ به وسیله سمپاش دستی انجام شد. سه روز پس از اعمال آخرین تیمار در هر چین، اقدام به ثبت تمامی صفات مورد مطالعه یا نمونه‌برداری جهت اندازه‌گیری‌های آزمایشگاهی شد. این صفات شامل محتوای رنگدانه‌های فتوسنتزی، پارامترهای تبادلات گازی، شاخص‌های فلورسانس کلروفیل، محتوای پروتئین‌ها و کربوهیدرات‌های محلول، سرعت فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان، مقدار نشت الکترولیت‌ها از غشای پلاسمایی، محتوای ترکیبات فنولیک شامل فنول کل و آنتوسیانین‌ها بود. سنجش تمامی صفات مذکور روی آخرین برگ‌های کاملاً توسعه‌یافته گیاه انجام شد. اندازه‌گیری محتوای رنگدانه‌های فتوسنتزی به روش Arnon (1967) در طول موج‌های ۶۶۳ نانومتر برای کلروفیل a، ۶۴۵ نانومتر برای کلروفیل b و ۴۷۰ نانومتر

محاسبه شد. در نهایت سرعت فعالیت این آنزیم به صورت میکرومول H_2O_2 تولیدشده در دقیقه (تعداد واحدهای آنزیم) در میلی گرم پروتئین های محلول بیان شد. سرعت فعالیت آنزیم کاتالاز به روش Sinha (1972) و با استفاده از محاسبه کاهش جذب H_2O_2 در طول موج ۵۷۰ نانومتر انجام شد. مقدار H_2O_2 موجود در مخلوط واکنش با استفاده از مفهوم قانون بیر-لامبرت و ضریب خاموشی آنزیم کاتالاز (۰/۰۳۹۴ سانتی متر بر مول) محاسبه شد.

برای سنجش محتوای فنول کل به روش Noreen & Ashraf (2009) از معرف فولین سیکالتو و استاندارد گالیک اسید استفاده شد و مقدار جذب نوری محلول واکنش در طول موج ۷۵۰ نانومتر قرائت شد. جهت رسم منحنی استاندارد محلول گالیک اسید با غلظت ۱۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر تهیه و سپس از این محلول پایه غلظت های پنج، ده، ۱۵، ۲۰ و ۳۰ میکروگرم بر میلی لیتر آماده شد و سایر مراحل کار همانند نمونه های اصلی انجام گرفت. در نهایت مقدار کل ترکیبات فنولی نمونه بر حسب میلی گرم گالیک-اسید بر گرم وزن تر محاسبه شد. محتوای آنتوسیانین ها به روش Nadernejad *et al.* (2013) و با عصاره گیری مواد گیاهی در متانول اسیدی (متانول خالص و اسید-کلریدریک خالص به نسبت حجمی ۹۹ به یک) سنجش و جذب نوری آن در طول موج ۵۵۰ نانومتر اندازه گیری شد. کمی سازی این ترکیبات با استفاده از مفهوم قانون بیر-لامبرت و در نظر گرفتن ضریب خاموشی ۳۳۰۰۰ سانتی متر بر مول محاسبه شد. اندازه گیری محتوای کربوهیدرات های محلول به روش فنل-اسیدسولفوریک انجام شد (Sheligl, 1986) و مقدار جذب نوری محلول واکنش در طول موج ۴۸۸ نانومتر قرائت شد. جهت تهیه استانداردها ابتدا محلول های ۲۰، ۴۰، ۶۰ و ۸۰ پی پی ام گلوکز تهیه و سایر مراحل کار همانند نمونه های اصلی

تمامی اندازه گیری ها در ساعت ۱۰ تا ۱۱ صبح انجام شد. هدایت مزوفیلی از تقسیم سرعت فتوسنتز به غلظت دی اکسید کربن درون روزنه ها به دست آمد (Fischer *et al.*, 1998). همچنین به منظور تعیین کارایی مصرف آب فتوسنتزی، سرعت فتوسنتز به هدایت روزنه ای تقسیم شد (Ritchie *et al.*, 1990).

جهت اندازه گیری پروتئین های محلول و سرعت فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدان شامل پراکسیداز، سوپراکسید دیسموتاز و کاتالاز، ابتدا اقدام به تهیه بافر استخراج، عصاره گیاهی و بافر فسفات شد. اندازه گیری محتوای پروتئین های محلول موجود در برگ به روش Bradford (1976) و با استفاده از عصاره گیاهی و معرف بلو انجام شد. برای رسم منحنی استاندارد محلول های صفر، ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ پی پی ام از آلبومین گاوی در بافر استخراج تهیه شد. مقدار جذب نوری تیمارها و محلول های استاندارد در طول موج ۵۹۵ نانومتر اندازه گیری و سپس نمودار پراکنش این دو پارامتر رسم و خط رگرسیون مربوطه برازش داده شد. سرعت فعالیت آنزیم پراکسیداز به روش Chance & Maehly (1955) با استفاده از عصاره گیاهی و سوپسترای آنزیم و محاسبه H_2O_2 مصرف شده در طول موج ۴۷۰ نانومتر اندازه گیری شد. مقدار H_2O_2 موجود در مخلوط واکنش با استفاده از مفهوم قانون بیر-لامبرت و ضریب خاموشی آنزیم پراکسیداز (۰/۰۲۶۶ سانتی متر بر مول) محاسبه شد. در نهایت سرعت فعالیت این آنزیم به صورت میکرومول H_2O_2 مصرف شده در دقیقه (تعداد واحدهای آنزیم) در میلی گرم پروتئین های محلول بیان شد. سرعت فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز به روش Beauchamp & Fridovich (1971) از طریق اندازه گیری توانایی آن در جلوگیری از احیای نوری نیتروبولوترازولیوم و با استفاده از طول موج ۵۶۰ نانومتر

۲/۰۴ میلی‌گرم بر گرم وزن تر برگ) از دودآب ۱:۱۰۰ و (v/v) بدون اختلاف معنی‌دار با دودآب ۱:۵۰۰ (v/v) و سیتوکینین و کمترین مقدار آن (۱/۳۵ میلی‌گرم بر گرم وزن تر برگ) از تیمار شاهد حاصل شد (جدول ۳).

نسبت کلروفیل a به کلروفیل b تحت تاثیر معنی‌دار سطوح محلول‌پاشی و چین‌های برداشت قرار نگرفت (جدول ۲). بیشترین محتوای کاروتنوئیدها (۰/۵۴ میلی‌گرم در گرم وزن تر برگ) مربوط به دودآب ۱:۵۰۰ (v/v) بدون تفاوت معنی‌دار با دودآب ۱:۱۰۰ (v/v) و کمترین مقدار آن (۰/۳۸ میلی‌گرم در گرم وزن تر برگ) مربوط به تیمار شاهد بود (جدول ۳). نسبت محتوای کلروفیلی به محتوای کاروتنوئیدی به‌طور معنی‌داری تحت تاثیر سطوح محلول‌پاشی قرار گرفت (جدول ۲). بیشترین مقدار این نسبت مربوط به دودآب ۱:۱۰۰ (v/v) بدون اختلاف معنی‌دار با دودآب ۱:۵۰۰ (v/v) و سیتوکینین بود؛ درحالی‌که سایر تیمارها تفاوت معنی‌داری با هم و با تیمار شاهد (۰/۵۹) نداشتند (جدول ۳). مشاهده شده است که سیگنال‌دهی سیتوکینین و نور در سطح ژن *ARR4* (*Arabidopsis Response Regulator4*) و فیتوکروم B همگرا است؛ لذا می‌توان گفت که سیتوکینین می‌تواند بیان بسیاری از ژن‌های هسته‌ای و کلروپلاستی را تنظیم کند (Yaronskaya et al., 2006). تنظیم این ژن‌ها می‌تواند در جهت افزایش بیوسنتز ۵-آمینولولینیک اسید (5-Aminolevulinic acid)، افزایش بیان ژن‌های کدکننده آنزیم‌های NADPH-پروتوکلروفیلید اکسیدوردوکتاز (NADPH-(protochlorophyllide oxidoreductase)، منیزیم پروتوپورفیرین IX کلاتاز (Mg protoporphyrin IX chelatase) و منیزیم پروتوپورفیرین IX متیل ترانسفراز (Mg protoporphyrin IX methyltransferase) یا کاهش بیان ژن‌های کدکننده آنزیم‌های کلروفیلاز

انجام شد. سپس با توجه به مقادیر جذب نوری منحنی استاندارد رسم شده و مقدار این ترکیبات برحسب میلی‌گرم کربوهیدرات محلول در گرم وزن خشک برگ به‌دست آمد. اندازه‌گیری پایداری غشای سلولی به روش *Lutts et al.* (1996) انجام گرفت. به این منظور ۰/۵ گرم دیسک برگ در فالكون‌های حاوی ۲۰ میلی‌لیتر آب مقطر در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت قرار داده شد. سپس هدایت الکتریکی آن‌ها توسط هدایت‌سنج الکتریکی (مدل ExStik@II, EC500) اندازه‌گیری شد (EC1). سپس نمونه‌ها به مدت ۲۰ دقیقه در بن‌ماری با دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند و پس از رسیدن دمای آن‌ها به دمای اتاق هدایت الکتریکی آن‌ها مجدداً اندازه‌گیری شد (EC2). پایداری غشای سلولی از نسبت EC1 به EC2 و به صورت درصد به‌دست آمد. در نهایت داده‌های حاصل پس از بررسی نرمال‌بودن با نرم‌افزار SAS نسخه ۹/۴ آنالیز و با استفاده از آزمون حداقل اختلاف معنی‌دار (LSD) در سطح پنج درصد مقایسه میانگین شدند.

نتایج و بحث

محتوای رنگدانه‌های فتوسنتزی

نتایج تجزیه واریانس نشان داد که مقدار کلروفیل a، b و کلروفیل کل و محتوای کاروتنوئیدها به‌طور معنی‌داری تحت تاثیر سطوح محلول‌پاشی قرار گرفتند (جدول ۲). بیشترین محتوای کلروفیل a (۱/۲۹ میلی‌گرم بر گرم وزن تر برگ) مربوط به دودآب‌های ۱:۵۰۰ و ۱:۱۰۰ (v/v) و کمترین مقدار آن (۰/۹۳ میلی‌گرم بر گرم وزن تر برگ) مربوط به تیمار شاهد بود. بیشترین مقدار کلروفیل b (۰/۷۵ میلی‌گرم در گرم وزن تر برگ) مربوط به دودآب ۱:۱۰۰ (v/v) بدون تفاوت معنی‌دار با دودآب ۱:۵۰۰ (v/v) و سیتوکینین و کمترین مقدار آن (۰/۴۱ میلی‌گرم در گرم وزن تر برگ) مربوط به تیمار شاهد بود. بیشترین مقدار کلروفیل کل

ژن‌های کدکننده آنزیم‌های درگیر در مسیر بیوسنتز یا کاهش بیان ژن‌های کدکننده آنزیم‌های تخریب کلروفیل باشد. این نتایج با نتایج Ghebrehiwot *et al.* (2013) که مشاهده کردند در تمامی شکل‌های کاربردی مانند دود آئروسول، دودآب و همچنین کاریکینولید حاصل از آن موجب افزایش سطح کلروفیل a، b و کلروفیل کل شد مطابقت دارد.

(Chlorophyllase) و منیزیم کلاتاز (Mg chelatase) باشد (Yaronskaya *et al.*, 2006, Costa *et al.*, 2005). دودآب در غلظت‌های ۱:۱۰۰ و ۱:۵۰۰ (v/v) بدون اختلاف معنی‌دار با سیتوکینین، محتوای کلروفیل را افزایش داد. با توجه به این مورد می‌توان گفت که احتمالاً مکانیسم اثر دودآب نیز همانند سیتوکینین و وابسته به افزایش بیوسنتز پیش ماده‌ها، افزایش بیان

جدول ۲- تجزیه واریانس رنگدانه‌های فتوسنتزی برگ‌های بادرنجبویه تحت تاثیر سطوح مختلف محلول‌پاشی و چین‌های برداشت
Table 2. Analysis of variance for photosynthetic pigments of lemon balm leaves as affected by different levels of foliar application and harvesting stages

Source of variation	df	Mean of Squares					
		Chlorophyll a	Chlorophyll b	Total chlorophyll	Carotenoids	chlorophyll a/b ratio	Chlorophyll/Carotenoids ratio
Block (B)	2	0.01 ^{ns}	0.02 ^{ns}	0.08 ^{ns}	0.007 ^{ns}	0.10 ^{ns}	0.11 ^{ns}
Foliar application (FA)	7	0.10 ^{**}	0.09 [*]	0.40 ^{**}	0.01 ^{**}	0.22 ^{ns}	0.32 ^{**}
Error a	14	0.02	0.02	0.07	0.006	0.30	0.09
Harvest stages (HS)	1	0.0002 ^{ns}	0.03 ^{ns}	0.04 ^{ns}	0.00009 ^{ns}	0.58 ^{ns}	0.15 ^{ns}
FA×HS	7	0.004 ^{ns}	0.01 ^{ns}	0.03 ^{ns}	0.0004 ^{ns}	0.05 ^{ns}	0.06 ^{ns}
B×HS	2	0.01 ^{ns}	0.0007 ^{ns}	0.01 ^{ns}	0.001 ^{ns}	0.04 ^{ns}	0.004 ^{ns}
Error b	14	0.01	0.009	0.01	0.001	0.14	0.04
CV %		9.54	17.58	8.00	7.16	18.05	25.47

ns، * و ** به ترتیب عدم وجود تفاوت معنی‌دار، معنی‌دار بودن در سطح یک درصد و پنج درصد را نشان می‌دهد. ns, * and ** are non-significant, significant at 1% and 5% level of probability, respectively.

جدول ۳- اثر سطوح مختلف محلول‌پاشی روی رنگدانه‌های فتوسنتزی برگ‌های بادرنجبویه

Table 3. Effect of different levels of foliar application on photosynthetic pigments of lemon balm leaves

Treatment	Treatment levels	Chlorophyll a	Chlorophyll b	Total chlorophyll	Carotenoids	Chlorophyll/Carotenoids ratio
		mg g ⁻¹ Leaf fresh weight				
Foliar application	Ctrl	0.93	0.41	1.35	0.38	0.59
	SW 1:5000 (v/v)	1.00	0.46	1.47	0.41	0.69
	SW 1:1000 (v/v)	1.07	0.46	1.53	0.41	0.66
	SW 1:500 (v/v)	1.29	0.73	2.02	0.54	1.16
	SW 1:100 (v/v)	1.29	0.75	2.04	0.49	1.19
	Ck	1.15	0.61	1.77	0.45	0.97
	GA	1.03	0.50	1.53	0.42	0.75
	IAA	1.03	0.49	1.53	0.42	0.74
LSD _{0.05}		0.18	0.20	0.33	1.10	0.38

Ctrl: شاهد، SW: دودآب، Ck: سیتوکینین، GA: اسیدجیبرلیک و IAA: اکسین.
Ctrl: control, SW: Smoke-Water, CK: Cytokinin, GA: Gibberellic acid and IAA: Auxin

بینایی و وابسته به غلظت در مقدار ترکیبات کاروتنوئیدی ایفا کردند و محتوای این ترکیبات در آن‌ها حد واسط بین دودآب‌های رقیق‌تر یعنی ۱:۵۰۰۰، ۱:۱۰۰۰ (v/v) و دودآب‌های غلیظ‌تر یعنی ۱:۱۰۰

نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد که دودآب‌های با غلظت بیشتر موجب افزایش محتوای کاروتنوئیدی شدند که با نتایج Ghebrehiwot *et al.* (2013) مطابقت نداشت. فیتوهورمون‌های استفاده‌شده نیز نتیجه

زنده‌مانی برابر با ۱۴/۰۵ و ۱۶/۴۴ بودند. کارایی کمپلکس تجزیه‌کننده آب در فتوسیستم II نیز در چین‌های اول و دوم برابر با ۴/۴۹ و ۴/۶۵ بود (جدول ۵). عدم تاثیر معنی‌دار سطوح مختلف محلول‌پاشی بر پارامترهای فلورسانس کلروفیل می‌تواند دلایل متعددی از جمله پاسخ‌دهندگی کمتر به فیتوهورمون‌های برون‌زاد یا آگروکمیکال‌های دود یا بهینه‌سازی زنجیره انتقال الکترون در شرایط نرمال در این گیاه باشد که بیش از آن تحت کاربرد مواد مذکور امکان‌پذیر نبوده است.

پارامترهای تبادلات گازی

سرعت فتوسنتز، سرعت تعرق و هدایت روزنه‌ای به‌طور معنی‌داری تحت تاثیر سطوح محلول‌پاشی قرار گرفتند (جدول ۶). بیشترین سرعت فتوسنتز (۸/۴۲ میکرومول دی‌اکسیدکربن بر متر مربع در ثانیه) مربوط به سیتوکینین بود که تفاوت معنی‌داری با دودآب ۱:۱۰۰ (v/v) و پس از آن با دودآب ۱:۵۰۰ (v/v)، اسید-جیبرلیک و اکسین نداشت. کمترین سرعت فتوسنتز (۳/۹۵ میکرومول دی‌اکسیدکربن بر متر مربع در ثانیه) نیز مربوط به تیمار شاهد بود (جدول ۷). بیشترین سرعت تعرق (۳/۴۷ میلی‌مول آب بر متر مربع در ثانیه) مربوط به دودآب ۱:۱۰۰ (v/v) بدون تفاوت معنی‌دار با تیمار سیتوکینین و دودآب ۱:۵۰۰ (v/v) و کمترین مقدار آن (۱/۳۷ میلی‌مول آب بر متر مربع در ثانیه) مربوط به دودآب ۱:۵۰۰ (v/v) بود (جدول ۷). بیشترین هدایت روزنه‌ای (۰/۱۲ مول بر متر مربع در ثانیه) مربوط به دودآب ۱:۱۰۰ (v/v) بدون تفاوت معنی‌دار با سیتوکینین و کمترین مقدار آن (۰/۰۵ مول بر متر مربع در ثانیه) مربوط به دودآب ۱:۱۰۰ (v/v) بدون تفاوت معنی‌دار با تیمار شاهد و دودآب ۱:۵۰۰ (v/v) بود (جدول ۷).

۱:۵۰۰ (v/v) بود. فیتوهورمون‌ها می‌توانند با تاثیر بر ژن‌های کدکننده مسیر بیوسنتز ژرانیل پیروفسفات سنتز کاروتنوئیدها را تحت تاثیر قرار دهد (Shaddad *et al.*, 2013). کاربرد فیتوهورمون‌ها به‌ویژه سیتوکینین از طریق افزایش غلظت کاروتنوئیدها، موجب محافظت کلروفیل در برابر اکسیداسیون نوری می‌شود (Candan & Tarhan, 2003)

باتوجه‌به اینکه صرف نظر از تغییرات نوری و دمایی گلخانه، گیاه در شرایط نسبتاً مطلوبی بود و تنش قابل توجهی وجود نداشت، پس بیان علت دقیق افزایش کاروتنوئیدها در چین‌های برداشت و سطوح محلول‌پاشی چندان ساده نیست. اما بررسی نسبت مقدار محتوای کلروفیل به محتوای کاروتنوئید شاخص مناسب‌تری به نظر می‌رسد. زیرا محتوای کل کلروفیل نشان‌دهنده ویژگی‌های سرسبزی در گیاهان است (Netto *et al.*, 2005). نتایج حاصل از مطالعه حاضر نشان داد که دودآب ۱:۱۰۰ (v/v) بدون تفاوت معنی‌دار با سیتوکینین و دودآب ۱:۵۰۰ (v/v) موجب حصول نسبت کلروفیل کل به کاروتنوئیدهای بالاتری در مقایسه با شاهد شد که با نتایج پیشین مطابقت داشت (Ghebrehiwot *et al.*, 2013; Sosnowski *et al.*, 2017).

پارامترهای کلروفیل فلورسانس

حداکثر کارایی فتوشیمیایی فتوسیستم II، شاخص زنده‌مانی و کارایی کمپلکس تجزیه‌کننده آب در فتوسیستم II در چین‌های برداشت اختلاف معنی‌داری داشتند ولی هیچ‌یک از پارامترهای فلورسانس کلروفیل تحت تاثیر معنی‌دار سطوح محلول‌پاشی قرار نگرفت (جدول ۴). حداکثر کارایی فتوشیمیایی فتوسیستم II در چین‌های اول و دوم به‌ترتیب برابر با ۰/۸۱ و ۰/۸۲ بود. چین‌های اول و دوم به‌ترتیب دارای شاخص

جدول ۴- تجزیه واریانس پارامترهای فلورسانس کلروفیل برگ‌های بادرنجبویه تحت تاثیر سطوح مختلف محلول پاشی و چین‌های برداشت

Table 4. Analysis of variance for chlorophyll fluorescence parameters of lemon balm leaves as affected by different levels of foliar application and harvesting stages

Source of variation	df	Mean of Squares		
		Maximum photochemical efficiency of PSII	Survival index	Water-splitting complex efficiency of PSII
Block (B)	2	0.00002 ^{ns}	10.57 ^{ns}	0.02 ^{ns}
Foliar application (FA)	7	0.00004 ^{ns}	3.74 ^{ns}	0.04 ^{ns}
Error a	14	0.00006	6.48	0.06
Harvest stages (HS)	1	0.0003 [*]	68.87 ^{**}	0.31 [*]
FA×HS	7	0.00002 ^{ns}	10.91 ^{ns}	0.02 ^{ns}
B×HS	2	0.000002 ^{ns}	5.05 ^{ns}	0.004 ^{ns}
Error b	14	0.00004	6.85	0.04
CV %		0.80	17.16	4.57

ns, * و ** به ترتیب عدم وجود تفاوت معنی‌دار، معنی‌دار بودن در سطح یک درصد و پنج درصد را نشان می‌دهد. ns, * and ** are non-significant, significant at 1% and 5% level of probability, respectively.

جدول ۵- اثر چین‌های برداشت روی پارامترهای فلورسانس کلروفیل برگ‌های بادرنجبویه

Table 5. Effect of harvest stages on chlorophyll fluorescence parameters of lemon balm leaves

Treatment	Treatment levels	Maximum photochemical efficiency of PSII	Survival index	Water-splitting complex efficiency of PSII
Harvest stages	First	0.81	14.05	4.49
	Second	0.82	16.44	4.65
LSD _{0.05}		0.004	1.62	0.12

متابولیسم نیترات و متعاقباً سنتز پروتئین در گیاهان می‌شود. فعالیت نیترات‌ردوکتاز بسیار متغیر و وابسته به حضور فیتوهورمون‌ها می‌باشد (Hayat & Ahmad, 2003). بنابراین احتمال می‌رود که کاربرد فیتوهورمون‌های مورد مطالعه خصوصاً سیتوکینین در غروب روزهای اعمال تیمار، موجب افزایش سطح پروتئین‌ها و آنزیم‌های مورد نیاز برای آسمیلاسیون در طی شب و افزایش سرعت فتوسنتز در طول روزهای پیش رو شده باشد. افزایش هدایت روزنه‌ای تحت تیمارهای دودآب و سیتوکینین نیز احتمالاً به دلیل افزایش فعالیت کامبیومی و تشکیل بافت‌های آوندی می‌باشد (Aldesuquy, 2000). عدم تطابق نتایج این مطالعه با نتایج Gilbert *et al.* (2002) احتمالاً به خاطر تفاوت در روش اعمال ترکیبات بیواکتیو دود بر گیاهان، دمای مناسب دودآب نسبت به دود آئروسول و عدم آسیب به آنزیم‌های حساس به دما مانند روبیسکو بود.

دمای برگ به‌طور معنی‌داری تحت تاثیر چین‌های برداشت قرار گرفت. دمای برگ در چین اول و دوم به- ترتیب برابر با ۳۳/۶۴ و ۳۰/۷۲ درجه سانتی‌گراد بود (جدول ۹). افزایش سرعت فتوسنتز تحت کاربرد سیتوکینین با نتایج Gupta *et al.* (2000) مطابقت داشت. سیتوکینین‌ها می‌توانند از مسیرهای مختلفی همچون افزایش تمایز کلروپلاست‌ها و یا افزایش رونویسی و ترجمه ژن‌های کدکننده آنزیم‌های درگیر در مسیر فتوسنتز مانند کربنیک‌انیدراز، نیترات‌ردوکتاز، سرعت و کارایی فتوسنتز را افزایش دهند (Taiz & Zeiger, 2012). چرا که کربنیک‌انیدراز در بافت‌های فتوسنتزی گیاهان C3 و C4 دسترسی دی‌اکسیدکربن برای روبیسکو را به‌وسیله کاتالیزه کردن واکنش برگشت‌پذیر هیدراته‌شده دی‌اکسیدکربن، تنظیم می‌کند و نیترات‌ردوکتاز موجب شروع

برداشت قرار گرفت (جدول ۸). بیشترین مقدار کربوهیدرات‌های محلول برگ مربوط به تیمار شاهد (۳۷۸/۲۳ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک برگ) بدون تفاوت معنی‌دار با دودآب‌های ۱:۵۰۰ و ۱:۱۰۰۰ (v/v) و کمترین مقدار آن (۱۸۹/۳۸ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک برگ) مربوط به دودآب ۱:۱۰۰ (v/v) بود (شکل ۱-a). چین اول دارای ۲۸۰/۲۵ و چین دوم دارای ۳۱۴/۱۰ میلی‌گرم کربوهیدرات‌های محلول در گرم وزن خشک برگ بود (جدول ۹).

کاهش قابل ملاحظه محتوای کربوهیدرات‌های محلول در گیاهان تیمار شده با دودآب ۱:۱۰۰ (v/v) همراه با اثرات مثبت سایر پارامترهای فتوسنتزی می‌تواند بهبود عملکرد کمی و کیفی گیاه بادرنجبویه ناشی از کاربرد دودآب را توجیه کند (Noroozi Shahri *et al.*, 2020)؛ زیرا افزایش محتوای گلوکز و فروکتوز موجب کاهش فعالیت آنزیم‌های فتوسنتزی و تنفسی مانند روبیسکو و هیدروکسی‌پیرووات‌ردوکتاز می‌شود. علاوه بر این گلوکز و ساکارز رونویسی ژن‌های فتوسنتزی را مهار می‌کنند. حتی در گیاهان جوان نیز افزایش تجمع کربوهیدرات‌های محلول موجب کاهش کلروفیل، کاهش پروتئین‌های فتوسنتزی، انقطاع فلوئم و حذف مخازن می‌شود. در این شرایط خصوصاً اگر شار فوتونی نیز کم باشد پیری برگ‌ها تسریع می‌شود. مطالعات نشان می‌دهند که کاربرد فیتوهورمون‌ها می‌تواند برخی از پاسخ‌های گیاه ناشی از حضور کربوهیدرات‌های محلول را مهار کند (Wingler *et al.*, 1998).

علاوه بر این دودآب اثر منفی بسته‌شدن روزنه‌ها در اثر غلظت بالای دی‌اکسیدکربن موجود در دود آتروسل را نیز مرتفع کرد (Gilbert *et al.*, 2002).

محتوای فنول کل و آنتوسیانین‌ها

محتوای فنول کل برگ به طور معنی‌داری تحت تاثیر سطوح محلول‌پاشی قرار گرفت (جدول ۶). بیشترین محتوای فنول کل (۰/۹۲ میلی‌گرم گالیک‌اسید بر گرم وزن تر برگ) مربوط به دودآب ۱:۵۰۰ (v/v) بدون تفاوت معنی‌دار با اکسین و کمترین مقدار آن (۰/۵۷ میلی‌گرم گالیک‌اسید بر گرم وزن تر برگ) مربوط به تیمار شاهد بود (جدول ۷). محتوای آنتوسیانین‌های برگ تحت تاثیر معنی‌دار سطوح محلول‌پاشی و چین‌های برداشت قرار نگرفت (جدول ۶). افزایش ترکیبات فنولیک در اثر کاربرد فیتوهورمون‌ها (Vats *et al.*, 2012) و دودآب (Aremu *et al.*, 2012) گزارش شده است. فیتوهورمون‌ها و ترکیبات شبه فیتوهورمونی دودآب تغییر در محتوای این ترکیبات را با تاثیر بر بیان ژن‌های کلیدی مسیر بیوشیمیایی فنیل-پروپانویید و مسیرهای ثانویه متابولیسم کربن موجب می‌شوند. علی‌رغم افزایش مقدار فنول کل، محتوای رنگدانه‌های فلاونوئیدی آنتوسیانین‌ها تحت تاثیر سطوح محلول‌پاشی قرار نگرفت. احتمالاً عدم تغییر معنی‌دار آنتوسیانین‌ها با وجود افزایش محتوای ترکیبات فنولیک، تولید سایر فنول‌ها باشد. علاوه بر این سیستم دفاعی آنتوسیانینی بیشتر در گیاهچه‌ها و ابتدای نمو مشاهده می‌شود (Candan & Tarhan, 2003)، بنابراین متاثرنشدن این رنگدانه‌ها در مرحله نموی مورد مطالعه امری بدیهی می‌باشد.

محتوای کربوهیدرات‌های محلول

محتوای کربوهیدرات‌های محلول برگ به طور معنی‌داری تحت تاثیر سطوح محلول‌پاشی و چین‌های

جدول ۶- تجزیه واریانس پارامترهای فتوسنتزی و ترکیبات فنولیک برگ‌های بادرنجبویه تحت تاثیر سطوح مختلف محلول‌پاشی و چین‌های برداشت

Table 6. Analysis of variance for photosynthetic parameters and phenolic compounds of lemon balm leaves as affected by different levels of foliar application and harvesting stages

Source of variation	df	Mean of Squares								
		Photosynthesis rate	Transpiration rate	Internal CO ₂	Leaf temperature	Stomatal conductance	Mesophilic conductance	water use efficiency	Total Phenol	Anthocyanins
Block (B)	2	1.20 ^{ns}	2.57 ^{**}	3082 ^{ns}	5.99 ^{ns}	0.0002 ^{ns}	519 ^{ns}	1479 ^{ns}	0.02 ^{ns}	2.42 ^{ns}
Foliar Application (FA)	7	13.37 ^{**}	3.07 [*]	2054 ^{ns}	2.44 ^{ns}	0.004 [*]	666 ^{ns}	3417 ^{ns}	0.05 ^{**}	2.19 ^{ns}
Error a	14	2.59	0.17	861	3.76	0.001	347	1089	0.009	3.83
Harvest Stages (HS)	1	2.57 ^{ns}	0.73 ^{ns}	176 ^{ns}	102 ^{**}	0.004 ^{ns}	336 ^{ns}	877 ^{ns}	0.009 ^{ns}	0.37 ^{ns}
FA×HS	7	2.22 ^{ns}	0.28 ^{ns}	2822 ^{ns}	2.68 ^{ns}	0.0008 ^{ns}	144 ^{ns}	720 ^{ns}	0.0005 ^{ns}	0.31 ^{ns}
B×HS	2	0.29 ^{ns}	0.25 ^{ns}	1962 ^{ns}	6.69 ^{ns}	0.0002 ^{ns}	150 ^{ns}	2287 ^{ns}	0.005 ^{ns}	0.004 ^{ns}
Error b	14	1.15	0.74	2941	3.21	0.001	244	3068	0.002	0.36
CV %		16.11	34.08	30.29	5.56	43.41	38.87	59.15	5.96	5.66

ns, * and ** are non-significant, significant at 1% and 5% level of probability, respectively. ns, * and ** به ترتیب عدم وجود تفاوت معنی‌دار، معنی‌دار بودن در سطح یک درصد و پنج درصد را نشان می‌دهد.

جدول ۷- اثر سطوح مختلف محلول‌پاشی روی پارامترهای فتوسنتزی و محتوای فنول کل برگ‌های بادرنجبویه

Table 7. Effect of different levels of foliar application on photosynthetic parameters and total phenolic content of lemon balm leaves

Treatment	Treatment levels	Photosynthesis rate ($\mu\text{ mol CO}_2\text{ m}^{-2}\text{ s}^{-1}$)	Transpiration rate ($\text{m mol H}_2\text{O m}^{-2}\text{ s}^{-1}$)	Stomatal conductance ($\text{mol m}^{-2}\text{ s}^{-1}$)	Total Phenol (mg GAE/g fresh weight)
Foliar application	Ctrl	3.95	2.15	0.06	0.57
	SW 1:5000 (v/v)	5.53	1.37	0.06	0.73
	SW 1:1000 (v/v)	5.86	1.91	0.05	0.76
	SW 1:500 (v/v)	7.35	3.16	0.10	0.92
	SW 1:100 (v/v)	8.22	3.47	0.12	0.76
	Ck	8.42	3.07	0.11	0.79
	GA	7.24	2.77	0.07	0.76
	IAA	6.82	2.29	0.07	0.82
LSD _{0.05}		1.99	0.51	0.04	0.11

Ctrl: شاهد، SW: دودآب، Ck: سیتوکینین، GA: اسیدجبرلیک و IAA: اکسین.
Ctrl: control, SW: Smoke-Water, CK: Cytokinin, GA: Gibberellic acid and IAA: Auxin

مشاهدات Iqbal *et al.* (2018) مطابقت دارد. معنی‌دار- بودن مقدار کربوهیدرات‌های محلول در دو چین مختلف گیاه نیز در اثر تغییر طول روز و مقدار فوتون دریافتی توجیه می‌شود. زیرا با ورود گیاه به شرایط طول روز

مصرف دودآب و سیتوکینین موجب افزایش رشد، افزایش انتقال ساکارز از برگ‌ها به سوی مخازن، کاهش مقدار ساکارز درون سلول‌های منبع و کاهش محتوای کربوهیدرات‌های محلول این تیمارها نسبت به شاهد می‌شود (Oliveira Neto *et al.*, 2009). این نتایج با

مقدار نشت الکترولیت‌ها (۹۰/۹۲ درصد) مربوط به غشای پلاسمایی سلول‌های برگ گیاهان شاهد بدون تفاوت معنی‌دار با دودآب‌های ۱:۵۰۰ و ۱:۱۰۰۰ (v/v) و کمترین مقدار آن (۷۱/۷۶ درصد) مربوط به دودآب ۱:۱۰۰ (v/v) بدون تفاوت معنی‌دار با دودآب ۱:۵۰۰ (v/v) و فیتوهورمون‌های مورد مطالعه بود (شکل ۱-b). چین اول و چین دوم برداشت به ترتیب دارای نشت الکترولیت‌ها از غشای پلاسمایی برابر با ۸۴/۰۵ و ۷۷/۴۹ درصد بود (جدول ۹). ثبات بیشتر غشاهای سلولی و نشت کمتر الکترولیت‌ها یکی از مهمترین پارامترهای کارایی فعالیت‌های بیوشیمیایی و پایداری عملکرد گیاه است. آگروکمیکال‌های موجود در دودآب همانند فیتوهورمون‌ها با کاهش آسیب رادیکال‌های آزاد موجود در سیستم‌های دریافت نور موجب یکپارچگی غشای سلولی و در نتیجه افزایش کارایی فعالیت‌های بیوشیمیایی شدند (Werner & Schmülling, 2009). این نتایج با گزارش Iqbal *et al.* (2018) مطابقت داشت.

کوتاه مقدار فیتوهورمون‌های درونی آن تغییر می‌یابد (Wingler *et al.*, 1998).

محتوای پروتئین‌های محلول و سرعت فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان

محتوای پروتئین‌های محلول برگ از نظر آماری تحت تاثیر سطوح محلول‌پاشی و چین‌های برداشت قرار نگرفت. سرعت فعالیت آنزیم پراکسیداز، سوپراکسید-دیسموتاز و کاتالاز نیز از نظر آماری تحت تاثیر هیچ یک از تیمارهای مختلف محلول‌پاشی قرار نگرفتند. تنها سرعت فعالیت آنزیم کاتالاز تحت تاثیر معنی‌دار چین‌های برداشت واقع شد (جدول ۸). سرعت فعالیت آنزیم کاتالاز در چین اول برابر با ۱۳۴۶/۸۶ و در چین دوم برابر با ۱۱۶۰/۳۳ واحد آنزیمی بر میلی‌گرم پروتئین‌های محلول بود (جدول ۹).

نشت الکترولیت‌ها از غشای پلاسمایی

درصد نشت الکترولیت‌ها از غشای پلاسمایی سلول‌های برگ به طور معنی‌داری تحت تاثیر سطوح محلول‌پاشی و چین‌های برداشت قرار گرفت (جدول ۸). بیشترین

جدول ۸- تجزیه واریانس برخی از پارامترهای بیوشیمیایی برگ‌های بادرنجبویه تحت تاثیر سطوح مختلف محلول‌پاشی و چین‌های برداشت

Table 8. Analysis of variance for some biochemical parameters of lemon balm leaves as affected by different levels of foliar application and harvesting stages

Source of variation	df	Mean of Squares					
		Soluble carbohydrates	Soluble protein	Peroxidase activity rate	Superoxide dismutase activity rate	Catalase activity rate	Electrolyte leakage
Block (B)	2	1187 ^{ns}	0.32 ^{ns}	20.58 ^{ns}	0.005 ^{ns}	409736 [*]	11.77 ^{ns}
Foliar application (FA)	7	28031 ^{**}	1.39 ^{ns}	51.11 ^{ns}	0.02 ^{ns}	86200 ^{ns}	312.95 ^{**}
Error a	14	982	0.88	39.87	0.03	65963	39.23
Harvest stages (HS)	1	13746 [*]	0.003 ^{ns}	107.36 ^{ns}	0.02 ^{ns}	417549 [*]	516.20 [*]
FA×HS	7	1146 ^{ns}	0.60 ^{ns}	28.83 ^{ns}	0.03 ^{ns}	50177 ^{ns}	37.09 ^{ns}
B×HS	2	928 ^{ns}	0.10 ^{ns}	3.76 ^{ns}	0.008 ^{ns}	111280 ^{ns}	23.69 ^{ns}
Error b	14	1910	0.80	33.02	0.02	56869	64.58
CV %		14.70	21.79	36.95	25.28	19.02	9.94

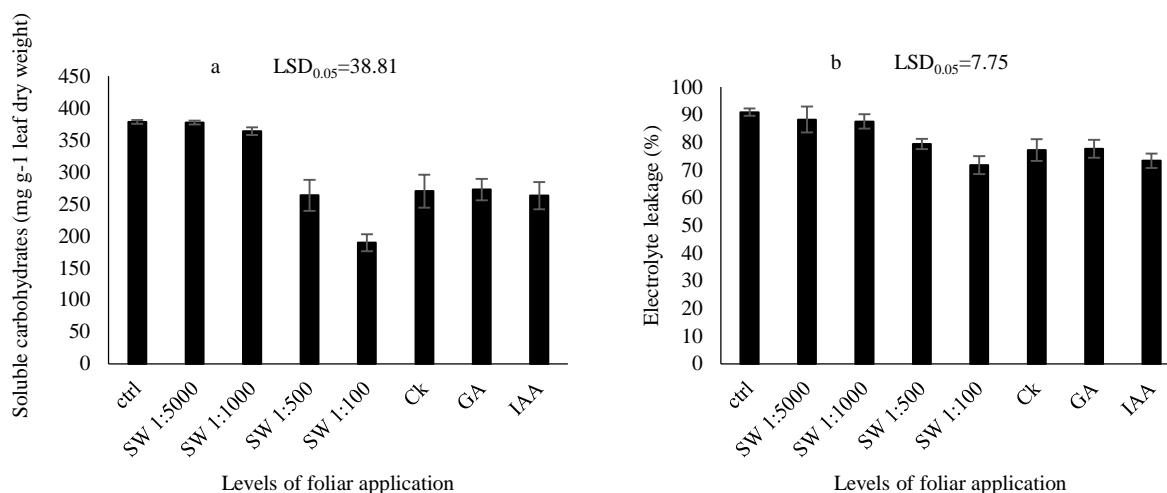
ns, * و ** به ترتیب عدم وجود تفاوت معنی‌دار، معنی‌دار بودن در سطح یک درصد و پنج درصد را نشان می‌دهد.

ns, * and ** are non-significant, significant at 1% and 5% level of probability, respectively.

جدول ۹- اثر چین‌های برداشت روی برخی از پارامترهای بیوشیمیایی برگ‌های بادرنجبویه

Table 9. Effect of harvest stages on some biochemical parameters of lemon balm leaves

Treatment	Treatment levels	Leaf temperature (°C)	Soluble carbohydrates (mg g ⁻¹ leaf dry weight)	Catalase activity rate (U min ⁻¹ mg ⁻¹ of soluble protein)	Electrolyte leakage (%)
Harvest stages	First	33.64	280.25	1346.86	84.05
	Second	30.72	314.10	1160.33	77.49
LSD _{0.05}		1.10	27.06	147.65	4.97



شکل ۱- اثر سطوح مختلف محلول پاشی بر: a: محتوای کربوهیدرات‌های محلول و b: نشت الکترولیت‌های برگ‌های بادرنجبویه. Ctrl: شاهد، SW: دودآب، Ck: سیتوکینین، GA: اسیدجیبرلیک و IAA: اکسین. خطوط بار، نشان‌دهنده خطای استاندارد است.

Figure 1. Effect of different levels of foliar application on a: soluble carbohydrates content and b: electrolyte leakage of lemon balm leaves. Ctrl: control, SW: Smoke-Water, Ck: Cytokinin, GA: Gibberellic acid and IAA: Auxin. Bar lines indicate the standard error.

الکترولیت‌ها از غشای پلاسمایی سلول‌های برگ نسبت به تیمار شاهد شد. سطوح مذکور در اکثر صفات مورد بررسی تفاوت معنی‌داری با فیتوهورمون‌های رشد نداشتند. برآیند این تغییرات در گیاه موجب بهبود وضعیت بیوشیمیایی، افزایش کارایی فتوسنتزی و تثبیت کربن می‌شود. اگرچه هنوز مکانیسم دقیق

نتیجه‌گیری کلی

دودآب در غلظت‌های ۱:۱۰۰ و ۱:۵۰۰ (v/v) موجب افزایش محتوای رنگدانه‌های فتوسنتزی، نسبت محتوای کلروفیل کل به کاروتنوئیدها، سرعت فتوسنتز، سرعت تعرق و هدایت روزنه‌ای، محتوای فنول کل و کاهش تجمع کربوهیدرات‌های محلول و درصد نشت

ترکیبات محرک دودآب در بهبود ویژگی‌های بیوشیمیایی گیاهان مشخص نیست؛ ولی مطالعات حاضر پاسخ‌های شبه فیتوهورمونی و احتمالاً اثر این ترکیبات را بر پروفیل فیتوهورمون‌های درونی گیاه تأیید می‌کنند. بنابراین دودآب می‌تواند به‌عنوان یک آگروکمیکال طبیعی با تکنیک نسبتاً ساده و مقرون‌به‌صرفه، پتانسیل لازم جهت بهبود فرآیندهای بیوشیمیایی گیاه بادرنجبویه را داشته باشد.

REFERENCES

1. Abdelgadir, H. A., Kulkarni, M. G., Aremu, A. O. & Van Staden, J. (2013). Smoke-water and karrikinolide (KAR1) foliar applications promote seedling growth and photosynthetic pigments of the biofuel seed crop. *Jatropha curcas* L. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 176, 743-747.
2. Aldesuquy, H. S. (2000). Effect of indol-3-yl acetic acid on photosynthetic characteristics of wheat flag leaf during grain filling. *Photosynthetica*, 38, 135-141.
3. Aremu, A. O., Bairu, M. W., Finnie J. F. & Van Staden, J. (2012). Stimulatory role of smoke-water and karrikinolide on the photosynthetic pigment and phenolic contents of micropropagated 'Williams' bananas. *Plant Growth Regulation*, 67, 271-279.
4. Aremu, A. O., Plačková, L., Novák, O., Stirk, W. A., Doležal, K., & Van Staden, J. (2016). Cytokinin profiles in ex vitro acclimatized *Eucomis autumnalis* plants pre-treated with smoke-derived karrikinolide. *Plant Cell Reports*, 35(1), 227-238.
5. Arnon, A. (1967). Method of extraction of chlorophyll in the plants. *Agronomy Journal*, 23, 112-121.
6. Beauchamp, C. & Fridovich, I. (1971). Superoxide dismutase: Improved assays and an assay predictable to acrylamide gels. *Annals of Biochemistry*, 44, 276-287.
7. Bose, S. K., Yadav, R. K., Mishra, S., Rajender, S., Sangwan, A., Singh, K., Mishra, B., Srivastava, A. K. & Sangwan, N. S. (2013). Effect of gibberellic acid and calliterpenone on plant growth attributes, trichomes, essential oil biosynthesis and pathway gene expression in differential manner in *Mentha arvensis* L. *Plant Physiology and Biochemistry*, 66, 150-158.
8. Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principles of protein dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248-254.
9. Candan, N. & Tarhan, L. (2003). Changes in chlorophyll-carotenoid contents, antioxidant enzyme activities and lipid peroxidation levels in Zn-stressed *Mentha pulegium*. *Turkish Journal of Chemistry*, 27, 21-30.
10. Chance, B. & Maehly, A. (1955). Assay of catalases and peroxidases. *Methods in Enzymology*, 2, 764-775.
11. Costa, M. L., Civello, P. M., Chaves, A. R. & Martínez, G. A. (2005). Effect of ethephon and 6-benzylaminopurine on chlorophyll degrading enzymes and a peroxidase-linked chlorophyll bleaching during post-harvest senescence of broccoli (*Brassica oleracea* L.) at 20 C. *Postharvest Biology and Technology*, 35, 191-199.
12. Cunha, F., Tintino, S. R., Figueredo, F., Barros, L., Duarte, A. E., Vega Gomez, M. C., Coronel, C. C., Rolón, M., Leite, N., Sobral-Souza, C. E. & Brito, S. V. (2016). HPLC-DAD phenolic profile, cytotoxic and anti-kinetoplastidae activity of *Melissa officinalis*. *Pharmaceutical Biology*, 54(9), 1664-1670.
13. Fischer, R., Rees, D., Sayre, K., Lu, Z. M., Condon, A. & Saavedra, A. L. (1998). Wheat yield progress associated with higher stomatal conductance and photosynthetic rate, and cooler canopies. *Crop Science*, 38, 1467-1475.
14. Flematti, G. R., Merritt, D. J., Piggott, M. J., Trengove, R. D., Smith, S. M., Dixon, K. W. & Ghisalberti, E. L. (2011). Burning vegetation produces cyanohydrins that liberate cyanide and stimulate seed germination. *Nature Communications*, 2(1), 1-6.
15. Ghebrehiwot, H., Kulkarni, M., Bairu, M. & Van Staden, J. (2013). Plant-derived aerosol-smoke and smoke solutions influence agronomic performance of a traditional cereal crop, Tef. *Experimental Agriculture*, 49, 244-55.
16. Gilbert, M., Ripley, B. & Van Staden, J. (2002). The effect of smoke on the photosynthetic gas exchange of *Chrysanthemoides monilifera*. *South African Journal of Botany*, 68, 525-531.
17. Gupta, N., Sunita, G. & Arvind, K. (2000). Exogenous cytokinin application increases cell membrane and chlorophyll stability in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Cereal Research Communications*, 28, 287-291.

18. Hayat, S. & Ahmad, A. (2003). Soaking seeds of *Lens culinaris* with 28-homobrassinolide increased nitrate reductase activity and grain yield in the field in India. *Annals of applied biology*, 143 (1), 121-124.
19. Iqbal, M., Asif, S., Ilyas, N., Raja, N. I., Hussain, M., Ejaz, M. & Saira, H. (2018). Smoke produced from plants waste material elicits growth of wheat (*Triticum aestivum* L.) by improving morphological, physiological and biochemical activity. *Biotechnology Reports*, 17, 35-44.
20. Jain, N., Stirk, W. A. & Van Staden, J. (2008). Cytokinin-and auxin-like activity of a butenolide isolated from plant-derived smoke. *South African Journal of Botany*, 74, 327-331.
21. Karalija, E., Zeljković, S. Č., Tarkowski, P., Muratović, E. & Parić, A. (2017). The effect of cytokinins on growth, phenolics, antioxidant and antimicrobial potential in liquid agitated shoot cultures of *Knautia sarajevensis*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 131, 347-57.
22. Kavina, J., Gopi, R. & Panneerselvam, R. (2011). Traditional and non-traditional plant growth regulators alter the growth and photosynthetic pigments in *Mentha piperita* Linn.. *International Journal of Environmental Sciences*, 11(7), 124-134.
23. Kumar, B., Pandey, D., Goswami, C. & Jain, S. (2001). Effect of growth regulators on photosynthesis, transpiration and related parameters in water stressed cotton. *Biologia Plantarum*, 44, 475-478.
24. Light, M. E., Anthonissen, R., Maes, A., Verschaeve, L., Pošta, M. & Van Staden, J. (2015). Genotoxicity testing of 3, 4, 5-trimethylfuran-2 (5H)-one, a compound from plant-derived smoke with germination inhibitory activity. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 778, 1-5.
25. Lin, J. T., Chen, Y. C., Lee, Y. C., Hou, C. W. R., Chen, F. L., & Yang, D. J. (2012). Antioxidant, anti-proliferative and cyclooxygenase-2 inhibitory activities of ethanolic extracts from lemon balm (*Melissa officinalis* L.) leaves. *LWT-Food Science and Technology*, 49(1), 1-7.
26. Lutts, S., Kinet, J. & Bouharmont, J. (1996). NaCl-induced senescence in leaves of rice (*Oryza sativa* L.) cultivars differing in salinity resistance. *Annals of Botany*, 78, 389-98.
27. Nadernejad, N., Ahmadi Moghadam, A., Hossyinfard, J., & Poorseyedi, S. (2013). Study of the rootstock and cultivar effect in PAL activity, production of phenolic and flavonoid compounds on flower, leaf and fruit in pistachio (*Pistacia vera* L.). *Iranian Journal of Plant Biology*, 5(15), 95-109.
28. Netto, A. T., Campostrini, E., De Oliveira, J. G. & Bressan-Smith, R. E. (2005). Photosynthetic pigments, nitrogen, chlorophyll a fluorescence and SPAD-502 readings in coffee leaves. *Scientia horticultrae*, 104, 199-209.
29. Noreen, Z. & Ashraf, M. (2009). Assessment of variation in antioxidative defense system in salt-treated pea (*Pisum sativum*) cultivars and its putative use as salinity tolerance markers. *Journal of Plant Physiology*, 166, 1764-1774.
30. Noroozi Shahri, F., Jalali Honarmand, S., Mondani, F., & Saeidi, M. (2020). Evaluation of growth phytohormones and different concentrations of plant derived smoke applications on growth characteristics and biological yield of medicinal plants lemon balm and basil. *Journal of Crops Improvement*, 22(1), 89-102. (In Farsi)
31. Oliveira Neto, C. F. D., Lobato, A. K. D. S., Gonçalves-Vidigal, M. C., Costa, R. C. L. D., Santos Filho, B. G. D., Alves, G. A. R., Maia, W. J. M. S., Cruz, F. J. R., Neves, H. K. B. & Lopes, M. S. (2009). Carbon compounds and chlorophyll contents in sorghum submitted to water deficit during three growth stages. *Journal of Food, Agriculture and Environment*, 7, 588-593.
32. Rademacher, W. (2015). Plant growth regulators: Backgrounds and uses in plant production. *Journal of Plant Growth Regulation*, 34(4), 845-872.
33. Ritchie, S.W., Nguyen, H. T. & Holaday, A. S. (1990). Leaf water content and gas-exchange parameters of two wheat genotypes differing in drought resistance. *Crop Science*, 30, 105-111.
34. Sayd, S. S., Taie, H. A., & Taha, L. S. (2010). Micropagation, antioxidant activity, total phenolics and flavonoids content of *Gardenia jasinoideis* Ellis as affected by growth regulators. *International Journal of Academic Research*, 2(3), 184-191.
35. Schwachtje, J. & Baldwin, I. T. (2004). Smoke exposure alters endogenous gibberellin and abscisic acid pools and gibberellin sensitivity while eliciting germination in the post-fire annual, *Nicotiana attenuata*. *Seed Science Research*, 14, 51-60.
36. Shaddad, M., Hm, A. E. S. & Mostafa, D. (2013). Role of gibberellic acid (GA3) in improving salt stress tolerance of two wheat cultivars. *International Journal of Plant Physiology and Biochemistry*, 5, 50-57.
37. Sheligl, H. Q. (1986). Die verwertung orgngischer souren durch chlorella lincht. *Planta Journal*, 47-51.
38. Sinha, A. K. (1972). Colorimetric assay of catalase. *Analytical Biochemistry*, 47(2), 389-394.
39. Sosnowski, J., Malinowska, E., Jankowski, K., Król, J. & Redzik, P. (2017). An estimation of the effects of synthetic auxin and cytokinin and the time of their application on some morphological and

- physiological characteristics of *Medicago x varia* T. Martyn. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 26(1), 66-73.
40. Taiz, L. & Zeiger, E. (2012). *Plant Physiology*. Sunderland, Massachusetts U.S.A.
41. Tavormina, P., De Coninck, B., Nikonorova, N., De Smet, I., & Cammue, B. P. (2015). The plant peptidome: An expanding repertoire of structural features and biological functions. *The Plant Cell*, 27(8), 2095-2118.
42. Tian, S. F., Wang, Y., Du, G., & Li, Y. X. (2011). Changes in contents and antioxidant activity of phenolic compounds during gibberellin-induced development in *Vitis vinifera* L. 'Muscat'. *Acta Physiologiae Plantarum*, 33(6), 2467-2475.
43. Van Staden, J., Jäger, A. K., Light, M. E., Burger, B. V., Brown, N. C. & Thomas, T. H. (2004). Isolation of the major germination cue from plant-derived smoke. *South African Journal of Botany*, 70(4), 654-659.
44. Vats, S., Tiwari, R., Alam, A., Behera, K. K. & Pareek, R. (2012). Evaluation of Phytochemicals, antioxidant and antimicrobial activity of in vitro culture of *Vigna unguiculata* L. Walp. *Researcher*, 4(11), 70-74.
45. Werner, T. & Schmülling, T. (2009). Cytokinin action in plant development. *Current Opinion in Plant Biology*, 12, 527-538.
46. Wingler, A., Von Schaewen, A., Leegood, R. C., Lea, P. J. & Quick, W. P. (1998). Regulation of leaf senescence by cytokinin, sugars, and light: Effects on NADH-dependent hydroxypyruvate reductase. *Plant Physiology*, 116, 329-335.
47. Yaronskaya, E., Vershilovskaya, I., Poers, Y., Alawady, A. E., Averina, N. & Grimm, B. (2006). Cytokinin effects on tetrapyrrole biosynthesis and photosynthetic activity in barley seedlings. *Planta*, 224, 700-709.