تغییرات میزان نپتالاکتون و خصوصیات بیوشیمیایی پونه‌سای گربه‌ای (*Nepeta cataria* L.) در پاسخ به القای ترکیبات محرک‌زیستی

ندا اوژن[1]، مرتضی گلدانی[2*]، حسنعلی نقدی‌بادی[3]، علی مهرآفرین[3]، مهدی پارسا[2]

۱- دانشجوی دکتری زراعت، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران
۲- دانشیار، گروه زراعت، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران
۳- مرکز تحقیقات گیاهان دارویی، پژوهشکده گیاهان دارویی جهاد دانشگاهی کرج، ایران
*آدرس مکاتبه: مشهد، دانشگاه فردوسی مشهد، دانشکده کشاورزی، گروه زراعت، صندوق‌پستی: ۹۱۷۷۹۴۸۹۷۸
تلفن: ۸۸۰۵۸۰۶ (۰۵۱۳)، نمابر: ۸۷۸۸۴۳۰ (۰۵۱۳)
پست الکترونیک: Goldani@um.ac.ir

تاریخ دریافت: ۹۵/۹/۲۸ **تاریخ تصویب:** ۹۶/۱/۲۹

چکیده

مقدمه: کاربرد محرک‌های آلی و زیستی در مراحل مختلف رشد گیاه می‌تواند علاوه بر کاهش تنش‌های محیطی به افزایش رشد و عملکرد گیاهان کمک کند.

هدف: تعیین اثر فرمولاسیون مختلف محرک‌های زیستی کیتوزان، اسید هیومیک و اسیدسیتریک بر میزان نپتالاکتون و خصوصیات بیوشیمیایی پونه‌سای گربه‌ای بود.

روش بررسی: این تحقیق بر پایه طرح آماری بلوک کامل تصادفی (CRBD) در گلخانه تحقیقاتی پژوهشکده گیاهان دارویی جهاددانشگاهی اجرا شد. تیمارهای آزمایش شامل شاهد (عدم استفاده از فرمولاسیون)، اسیدسیتریک، غلظت‌های مختلف اسید هیومیک، فرمولاسیون‌های ترکیبی دوگانه کیتوزان + اسیدسیتریک و فرمولاسیون‌های ترکیبی سه‌گانه کیتوزان + اسید هیومیک + اسیدسیتریک بودند. ابتدا ریشه نشاها قبل از انتقال به گلدان‌ها اعمال تیمار شدند و سپس حدود ۲۰ روز بعد از کاشت طی ۳ مرتبه به فاصله زمانی ۱۵ روز یک‌بار، تیمارها بر روی سطح گیاه محلول‌پاشی شدند.

نتایج: نتایج نشان داد استفاده از فرمولاسیون‌های مختلف اسید هیومیک، اسید سیتریک و کیتوزان تأثیر معنی‌داری بر ارتفاع بوته ($P\leq ۰/۰۵$)، تعداد ساقه فرعی، تعداد برگ، وزن خشک برگ، ساقه و اندام هوایی بوته، میزان قندهای محلول، میزان فنل، تانن، فلاونوئید و متابولیت نپتالاکتون ($P\leq ۰/۰۱$) داشت. بیشترین میزان در اغلب خصوصیات مورفوفیزیولوژیکی در فرمولاسیون ۴۰۰ گرم در لیتر کیتوزان + ۸۰۰ گرم در لیتر اسید هیومیک + ۴۰۰ گرم در لیتر اسیدسیتریک مشاهده شد. بیشترین میزان نپتالاکتون نیز در فرمولاسیون ۲۰۰ گرم در لیتر کیتوزان + ۸۰۰ گرم در لیتر اسید هیومیک + ۴۰۰ گرم در لیتر اسیدسیتریک حاصل شد.

نتیجه‌گیری: کاربرد محرک‌های زیستی اسید هیومیک، اسید سیتریک و کیتوزان تأثیر مثبتی بر بهبود ویژگی‌های رویشی و بویژه خصوصیات فیتوشیمیایی گیاه دارویی پونه‌سای گربه‌ای داشت.

گل‌واژگان: پونه‌سای گربه‌ای، اسید سیتریک، اسید هیومیک، کیتوزان، محرک‌زیستی، نپتالاکتون

مقدمه

گیاه پونه‌سای‌گربه‌ای (*Nepeta cataria* L.) با نام انگلیسی Catnip به عنوان یک گیاه دارویی مورد استفاده در طب سنتی به ثبت رسیده است [۱]. این گیاه در اکثر نقاط اروپا و مناطقی از آسیا مانند ایران، افغانستان و هندوستان به صورت خودرو می‌روید ولی در آمریکا کشت می‌شود. نعناگربه‌ای به عنوان مقوی، ضدعفونی‌کننده، آرام‌بخش، مسکن ملایم و رافع اختلالات هاضمه مورد استفاده قرار می‌گیرد [۱]. به علاوه دم کرده این گیاه به علت طعم ملایم خود در درمان سرماخوردگی، بی‌قراری و تب کودکان به راحتی قابل استفاده است [۱، ۲]. مطالعات نشان می‌دهد که اسانس این گیاه به علت دارا بودن نپتالاکتون، دارای خاصیت ضد باکتریایی، ضدقارچی و ضدویروسی است و بر روی قارچ‌های جنس‌های میکروسپوریوم، آسپرژیلوس و پنی‌سیلیوم و باکتری‌های جنس استافیلوکوک موثر است [۲، ۱]. گیاه پونه‌سای گربه‌ای از جمله گیاهان دارویی مهم است که از دیرباز به عنوان گیاه دارویی در طب سنتی چین استفاده می‌شد. این گیاه به عنوان آرام‌بخش، مسکن ملایم، رافع اختلالات هاضمه و تب‌بر (با تشدید تعرق) مصرف می‌شود. پونه‌سای گربه‌ای به همراه گیاهان رزماری (*Rosmarinus officinalis*) و گل جعفری (*Tagetes*) تولید بوی نامطبوعی می‌کنند که پشه‌ها را فراری می‌دهند [۲، ۱].

افزایش تولید گیاهان در واحد سطح در نظام‌های کشاورزی رایج به کمک عملیات زراعی متعددی نظیر مصرف کودهای شیمیایی صورت می‌گیرد. نتیجه این فعالیت‌ها طی سال‌های اخیر بحران آلودگی‌های محیط زیست و بویژه آلودگی منابع خاک و آب بوده که زنجیره‌وار به منابع غذایی انسان‌ها راه یافته و سلامت جامعه بشری را مورد تهدید قرار داده است [۳]. کاهش این مخاطرات زیست محیطی همگام با افزایش عملکرد گیاهان زراعی بخصوص در گیاهان دارویی نیازمند به کارگیری تکنیک‌های نوین زراعی است که یکی از این تکنیک‌ها، استفاده از محرک‌های زیستی (Biostimulants) می‌باشد [۴، ۳]. استفاده از محرک‌های آلی و زیستی و مصرف آنها هنگام نیاز گیاه در مراحل مختلف رشد می‌تواند به رفع این مشکلات کمک کند [۵].

کیتوزان (Chitosan) یک بیوپلیمر آلی، غیرسمی و قابل تجزیه است که از دی استیله کردن کیتین مشتق شده است [۶]. استفاده از غلظت‌های مناسب کیتوزان با افزایش فتوسنتز، افزایش جوانه‌زنی بذرهای مختلف، مقاومت گیاهان در برابر بیماری‌ها و همچنین تحریک در جذب مواد غذایی موجب افزایش رشد گیاهان می‌شود [۸، ۷]. گزارش شده است کاربرد کیتوزان موجب کاهش اثرات تنش‌های محیطی، تقویت قدرت حیاتی دانه و بهبود کیفیت محصولات کشاورزی می‌شود [۱۱، ۱۰، ۹]. همچنین کیتوزان به عنوان یکی از الیسیتورهای زیستی کارآمد برای بهبود بخشیدن تولید متابولیت‌های ثانویه در کشت سلول، گیاهان دارویی (بادرنجبویه، اسطوخودوس، سرخارگل، آویشن، مریم گلی) تأیید شده است [۱۲].

اسید هیومیک (Humic acid) مخلوطی از مولکول‌های بسیار بزرگ با قابلیت کلات کنندگی عناصر می‌باشد که برای گیاهان، حیوانات و انسان غیرسمی است [۱۳]. اسید هیومیک از طریق بهبود جوانه‌زنی بذرها، افزایش تقسیم سلولی، رشد ریشه و اندام هوایی، فتوسنتز، جذب مواد غذایی توسط گیاه، مقاومت گیاه به تنش‌های زیستی و غیر زیستی باعث افزایش کمیت و کیفیت محصولات گیاهی و زراعی از جمله گندم، ذرت و غیره می‌شود [۱۴]. کاربرد اسید هیومیک موجب افزایش تعداد ساقه فرعی، تعداد چتر بوته، وزن هزار دانه، عملکرد بیولوژیکی و عملکرد دانه در گیاه دارویی زنیان (Trachyspermum ammi) شد. در حالی که بر ارتفاع بوته تأثیر معنی‌داری نداشت [۱۵]. مطالعات نشان داد که کاربرد اسید هیومیک بر روی توتون (*Nicotiana tabaccum* L.) و گیاهان دارویی (بادرنجبویه) موجب زیاد شدن میزان آلکالوئیدها در برگ‌ها می‌شود [۱]، همچنین اسید هیومیک موجب افزایش انتقال گلوکز از بین غشاهای سلولی در گیاهان پیاز (*Allium cepa* L.)، چغندر قند (*Beta vulgaris* L.) و آفتاب‌گردان (*Helianthus annuus* L.) و موجب افزایش میزان کربوهیدرات در سیب‌زمینی، چغندرقند، هویج (*Daucus carota* L.) و گوجه‌فرنگی (*Lycopersicum esculentum* L.) می‌شود [۱۷، ۱۶].

اسید سیتریک یک متابولیت حدواسط کلیدی است و نقطه آغاز چرخه تری کربوکسیلیک اسید است [۱۸]. اسید سیتریک معمولاً در مقادیر قابل توجهی در بافت‌های گیاهی وجود دارد به طوری که برگ‌های مرکبات، توت فرنگی و اسفناج دارای ۸ تا ۱۵ درصد سیترات در وزن خشک می‌باشند [۲۰]. سیترات در متابولیسم کربن و مقاومت گیاه به تنش‌های زیستی و غیر زیستی دخالت دارد. محلول‌پاشی گیاه ریحان با اسید سیتریک ۰/۱ درصد موجب تولید بیوماس بیشتر و عملکرد اسانس بیشتر شد [۲۱]. محلول‌پاشی اسید سیتریک موجب افزایش وزن خشک بوته، تعداد برگ، تعداد ساقه فرعی، درصد اسانس و میزان گاما ترپینئول گیاه مرزه (*Satureja hortensis*) شد، در حالی که بر ارتفاع بوته و تعداد گل در بوته تأثیر معنی‌داری نداشت [۲۲].

با توجه به اهمیت گیاه دارویی نعناگربه‌ای و نیاز به افزایش عملکرد کمی و فیتوشیمیایی آن در واحد سطح، انجام تحقیقات جامع در زمینه القای فرمولاسیون محرک‌های زیستی آلی کیتوزان، اسید هیومیک و اسیدسیتریک ضرورت دارد. این آزمایش با هدف بررسی و شناخت اثر القای تیمار فرمولاسیون محرک‌های زیستی شامل کیتوزان، اسید هیومیک و اسیدسیتریک بر تغییرات فیتوشیمیایی و مرفوفیزیولوژیکی پونه‌سای‌گربه‌ای (*Nepeta cataria* L.) انجام شد.

مواد و روش‌ها

آزمایش در قالب طرح پایه‌ای بلوک کامل تصادفی (CRBD) با ۳ تکرار در گلخانه تحقیقاتی گروه پژوهشی کشت و توسعه پژوهشکده گیاهان دارویی جهاددانشگاهی واقع در هلجرد کرج اجرا شد. تیمارهای آزمایش براساس منابع مطالعه شده [۵،۸،۱۲،۱۴،۱۵،۱۹،۲۵،۳۲،۳۴،۳۷] شامل فرمولاسیون شاهد (آب مقطر)، ۴۰۰ گرم در لیتر اسیدسیتریک ۴۰۰ گرم در لیتر اسید هیومیک، ۸۰۰ گرم در لیتر اسید هیومیک، ۲۰۰ گرم در لیتر کیتوزان + ۴۰۰ گرم در لیتر اسیدسیتریک ۴۰۰ گرم در لیتر کیتوزان + ۴۰۰ گرم در لیتر اسیدسیتریک، ۲۰۰ گرم در لیتر کیتوزان + ۴۰۰ گرم در لیتر اسید هیومیک + ۴۰۰ گرم در لیتر اسیدسیتریک،۲۰۰ گرم در لیتر کیتوزان + ۸۰۰ گرم در لیتر اسید هیومیک + ۴۰۰ گرم در لیتر اسیدسیتریک، ۴۰۰ گرم در لیتر کیتوزان + ۴۰۰ گرم در لیتر اسید هیومیک + ۴۰۰ گرم در لیتر اسیدسیتریک و۴۰۰ گرم در لیتر کیتوزان + ۸۰۰ گرم در لیتر اسید هیومیک + ۴۰۰ گرم در لیتر اسیدسیتریک بودند.

ابعاد گلدان‌های مورد استفاده شامل ۳۰ سانتی‌متر قطر دهانه و ۳۵ سانتی‌متر ارتفاع بودند که با مخلوط پرلیت، کود دامی پوسیده و خاک مزرعه به ترتیب با نسبت ۱۰، ۳۰ و ۶۰ درصد حجمی پر شدند. در هر گلدان ۵ نشای سالم و هم‌اندازه کشت و در نهایت پس از استقرار کامل به ۳ گیاه تنک شدند. شرایط گلخانه برای رشد مطلوب پونه‌سای گربه‌ای شامل ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی با متوسط دمای ۵±۲۸ درجه سانتی‌گراد در روز و ۵±۱۸ درجه سانتی‌گراد در شب بود [۴]. القای تیمارها شامل خیساندن ریشه نشاها در محلول تیمارها قبل از کاشت و محلول‌پاشی آنها بعد از کاشت بود. قبل از کاشت و در زمان انتقال نشاها، ابتدا ریشه نشاها با آب شستشو داده شد و سپس چند دقیقه در محلول حاوی محرک‌های زیستی قرار گرفتند. سپس تیمارها حدود ۲۰ روز بعد از کاشت طی ۳ مرتبه به فاصله زمانی ۱۵ روز یکبار بر روی سطح گیاه محلول‌پاشی شدند. محلول‌پاشی در ساعات اولیه صبح فتوسنتز گیاه عادی می‌باشد و تنفس نوری کمتر است به طور یکسان تا زمانی که قطرات شروع به ریزش از سطح گیاه نمایند، انجام شد. نمونه‌گیری از تیمارها در مرحله گلدهی به صورت تصادفی انجام شد.

خصوصیات مرفوفیزیولوژیکی مورد بررسی در این تحقیق شامل ارتفاع بوته، تعداد ساقه‌های جانبی، تعداد برگ، سطح برگ، وزن خشک ساقه، وزن خشک برگ و وزن خشک اندام هوایی بوته بود. خصوصیات فیتوشیمیایی مورد ارزیابی نیز شامل میزان فنل کل، تانن، فلاونوئید کل، قندهای محلول و مهمترین ترکیب اسانس یعنی میزان نپتالاکتون بود.

اندازه‌گیری قندهای محلول

۰/۲ گرم بافت تازه گیاه در ۳ میلی‌لیتر آب مقطر عصاره-گیری شده و سپس محلول همگن حاصل به کمک کاغذ صافی، صاف شد. سپس به ۵۰ میکرولیتر از آن ۰/۵ میلی‌لیتر فنل ۵ درصد و ۲/۵ میلی‌لیتر اسید سولفوریک ۹۸ درصد اضافه

شد. میزان جذب نمونه‌ها در طول موج ۴۹۰ نانومتر قرائت شده و مقدار قند نمونه، با روش (Dubios) گلوکز، فروکتوز و گزیلوز تعیین شد [۲۳].

تعیین میزان فنل کل و تانن

مقدار ۰/۲ گرم از پودر خشک شده با ۲۵ میلی‌لیتر متانول ۸۰ درصد عصاره‌گیری شد. سپس به یک میلی‌لیتر از عصاره به دست آمده ۵ میلی‌لیتر معرف فولین سیوکالتیو و ۱۰ میلی‌لیتر کربنات سدیم ۲۰ درصد اضافه شد و با آب مقطر به حجم ۱۰۰ میلی‌لیتر رسانده و به مدت ۴۵ دقیقه در دمای اتاق قرار داده شد تا شدت رنگ به حداکثر برسد. جذب نمونه در طول موج ۷۶۰ نانومتر قرائت شد و میزان فنل و تانن نمونه بر اساس منحنی استاندارد اسید گالیک و تانیک محاسبه شد [۲۶-۲۴].

تعیین میزان فلاونوئید

مقداری از گیاه خشک به روش خیساندن در متانول ۷۰ درصد با نسبت ۳ به یک به مدت ۲۴ ساعت عصاره‌گیری شد. ۲ میلی‌لیتر از عصاره متانولی گیاه با ۱/۵ میلی‌لیتر متانول، ۰/۱ میلی‌لیتر کلرید آلومینیوم ۱۰ درصد، ۰/۱ میلی‌لیتر استات پتاسیم و ۲/۸ میلی‌لیتر آب مقطر ترکیب شدند. سپس محلول‌ها در دمای اتاق به مدت ۳۰ دقیقه قرار داده شدند و جذب نمونه‌ها در طول موج ۴۱۵ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شد. میزان فلاونوئید نمونه‌ها بر اساس منحنی استاندارد کوئرستین تعیین شد [۲۷].

تعیین میزان نپتالاکتون

جهت استخراج اسانس نعناگربه‌ای (*Nepeta cataria* L.)، نمونه‌ها در سایه و هوای آزاد خشک شدند. سپس به مقدار ۱۰۰ گرم از ماده خشک با آب بوسیله دستگاه کلونجر (Clevenger) اسانس‌گیری صورت گرفت و توسط سولفات سدیم آب‌زدایی شد [۳۰-۲۸]. اسانس نعناگربه‌ای به دست آمده، به دستگاه گازکروماتوگرافی (GC) از نوع Agilent 6890 مجهز به طیف نگار جرمی مدل Agilent 5973 تزریق شد. نرم‌افزار مورد استفاده Chemstation بود. شناسایی طیف‌ها به کمک شاخص بازداری آنها و مقایسه آن با شاخص‌های موجود در کتب مرجع و مقالات و با استفاده از طیف‌های جرمی ترکیبات استاندارد و استفاده از اطلاعات موجود در کتابخانه کامپیوتری صورت گرفت. میزان مهمترین ترکیب اساسی اسانس نعناگربه‌ای یعنی نپتالاکتون نیز با توجه به سطح زیر منحنی آن در طیف کروماتوگرام حاصل از GC با روش Area normalization به دست آمد [۳۰-۲۸].

تجزیه و تحلیل آماری

تجزیه داده‌ها در قالب طرح آزمایشی بلوک کامل تصادفی با سه تکرار (شامل ده سطح ترکیبات مختلف کیتوزان، اسید سیتریک و اسید هیومیک) انجام شد. میانگین‌ها به طور جداگانه توسط آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح یک درصد آماری مورد مقایسه قرار گرفتند. تجزیه داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار آماری SAS (9.2) انجام شد. همچنین برای رسم نمودارها از نرم‌افزار اکسل ($Excel_{2007}$) استفاده شد.

نتایج

ارتفاع بوته

فرمولاسیون‌های مختلف کیتوزان، اسید هیومیک و اسید سیتریک تأثیر معنی‌داری ($P \leq ۰/۰۵$) بر ارتفاع بوته پونه‌سای گربه‌ای داشتند (جدول شماره ۱). بیشترین ارتفاع بوته در تیمار اسید سیتریک ۴۰۰ گرم در لیتر هیومیک ۸۰۰ گرم در لیتر وکیتوزان ۲۰۰ گرم در لیتر (۴۸/۸۹ سانتی‌متر) مشاهده شد که تفاوت معنی‌داری با تیمار شاهد داشت. کمترین ارتفاع بوته نیز در تیمار شاهد (۲۸/۱۱ سانتی‌متر) حاصل شد (جدول شماره ۲).

تعداد ساقه فرعی بوته

نتایج نشان داد تعداد ساقه فرعی در سطح احتمال ۱ درصد تحت تاثیر فرمولاسیون‌های مختلف کیتوزان، اسید هیومیک و اسید سیتریک بود (جدول شماره ۱). کاربرد غلظت‌های مختلف کیتوزان، اسید هیومیک و اسید سیتریک موجب کاهش ۵۴ تا ۱/۵ درصدی تعداد ساقه فرعی در گیاه پونه‌سای گربه‌ای

جدول شماره ۱- تجزیه واریانس اثرات تیمارهای محرک زیستی بر صفات مورفولوژیک

منابع تغییرات (S.O.V)	درجه آزادی df	میانگین مربعات						
		ارتفاع بوته	تعداد ساقه فرعی	تعداد برگ در گیاه	سطح برگ	وزن خشک ساقه	وزن خشک برگ	وزن خشک اندام هوایی
بلوک	۲	۳/۶۹ ns	۳/۵ ns	۸/۰۴ ns	۲۳/۱۵ ns	۰/۰۰۰۰۱ ns	۰/۰۱۱ ns	۰/۰۱ ns
تیمار	۹	۶۰/۴ *	۶۷/۸۹ **	۱۰۳۸/۹**	۲۲۸/۰۹ **	۰/۰۰۲۶ **	۰/۶۱۳**	۰/۶۹**
خطای آزمایش	۱۸	۱۸/۹۷	۹/۵	۴۷/۲۴	۲۲/۳۸	۰/۰۰۰۲۷	۰/۰۴۵	۰/۰۴۸
ضریب تغییرات (CV)		۱۰/۱۶	۱۶/۸۵	۹/۹۶	۱۴/۹۱	۱۴/۶۵	۱۲/۵۱	۱۲/۱۴

ns، *، **: به ترتیب غیرمعنی‌دار بودن و معنی‌دار بودن در سطوح ۵ و ۱ درصد احتمال

جدول شماره ۲- مقایسه میانگین تاثیر فرمولاسیون‌های مختلف کیتوزان، اسید هیومیک و اسید سیتریک بر صفات مورفولوژیک

تیمارها	ارتفاع بوته	تعداد ساقه فرعی	تعداد برگ	سطح برگ	وزن خشک ساقه	وزن خشک برگ	وزن خشک اندام هوایی
شاهد	۴۷/۳۳ ab	۲۳/۴۴ a	۶۲/۷۷ de	۳۷/۸ ab	۰/۱۴ a	۱/۹۳ ab	۲/۰۷ ab
C_{400}	۴۹/۸۹ a	۱۳/۲۱ cd	۶۲/۴۴ de	۳۳/۵۹ b	۰/۱۴ a	۱/۸۳ b	۱/۹۷ b
H_{400}	۳۷/۳۳ d	۱۲/۴۴ cd	۸۱/۷۷ bc	۲۳/۱۸ d	۰/۰۸۶ cd	۱/۲۶ c	۱/۳۵ c
H_{800}	۳۷/۵۵ cd	۱۰/۷۸ d	۵۵ e	۲۳/۰۷ d	۰/۰۷ d	۱/۲۶ c	۱/۳۲ c
$C_{400}CH_{200}$	۳۶/۷۷ d	۱۸/۹۲ ab	۳۸/۵۵ f	۱۴/۳۹ e	۰/۰۶۷ d	۰/۷۸ d	۰/۸۵ d
$C_{400}CH_{400}$	۴۱/۴۴ bcd	۱۶/۷۸ bc	۶۰ de	۳۷/۰۲ ab	۰/۱۲۳ ab	۲/۰۲ a	۲/۱۴ ab
$C_{400}H_{400}CH_{200}$	۴۴/۵۵ abcd	۲۳/۱۱ a	۸۶/۶۷ b	۳۳/۶۲ b	۰/۱۰۷ bc	۱/۸۳ b	۱/۹۴ b
$C_{400}H_{800}CH_{200}$	۴۵/۷۷ abc	۲۲/۶۷ a	۱۰۵/۵۵ a	۳۵/۹۵ ab	۰/۱۲ ab	۱/۸۸ ab	۲/۰۱ ab
$C_{400}H_{400}CH_{400}$	۴۴/۲۲ abcd	۲۱/۹۹ ab	۷۱/۶۷ cd	۳۵/۳۱ ab	۰/۱۲۳ ab	۱/۹۸ ab	۲/۱۱ ab
$C_{400}H_{800}CH_{400}$	۴۳/۷۷ abcd	۱۹/۶۶ ab	۶۵/۴۴ de	۴۳/۲۶ a	۰/۱۵ a	۲/۲۶ a	۲/۴۱ a

در هر ستون میانگین‌هایی که حداقل دارای یک حرف مشترک هستند، فاقد تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد می‌باشند.

نسبت به تیمار شاهد شد. بیشترین تعداد ساقه فرعی در تیمار شاهد (۲۳/۴ عدد) و کمترین میزان آن نیز با محلول‌پاشی اسید هیومیک ۸۰۰ گرم در لیتر (۱۰/۷۸ عدد) حاصل شد (جدول شماره ۲).

تعداد برگ بوته

استفاده از فرمولاسیون‌های مختلف کیتوزان، اسید هیومیک و اسید سیتریک تأثیر معنی‌داری ($P \leq ۰/۰۱$) بر تعداد برگ پونه‌سای گربه‌ای داشتند (جدول شماره ۱). بیشترین تعداد برگ با محلول‌پاشی کیتوزان ۲۰۰ گرم در لیتر + اسید هیومیک ۸۰۰ گرم در لیتر + اسید سیتریک ۴۰۰ گرم در لیتر (۱۰۵/۵ عدد) به دست آمد و کمترین میزان آن نیز با محلول‌پاشی کیتوزان ۲۰۰ گرم در لیتر+ اسید سیتریک ۴۰۰ گرم در لیتر (۳۸/۵ عدد) حاصل شد. تعداد برگ در تیمار اسید سیتریک ۴۰۰ گرم در لیترو تیمار ۲۰۰ گرم در لیترکیتوزان + اسید سیتریک ۴۰۰ گرم در لیتر تفاوت معنی‌داری با تیمار شاهد نداشت. این در حالی بود که افزودن غلظت‌های ۴۰۰ و ۸۰۰ گرم در لیتراسید هیومیک به تیمار ۲۰۰ گرم در لیترکیتوزان + اسید سیتریک ۴۰۰ گرم در لیترموجب افزایش معنی‌دار تعداد برگ نسبت به تیمار شاهد شد (جدول شماره ۲).

سطح برگ بوته

محلول‌پاشی ترکیب‌های مختلف کیتوزان، اسید هیومیک و اسید سیتریک تاثیر معنی‌داری ($P \leq ۰/۰۱$) بر سطح برگ پونه‌سای گربه‌ای داشتند (جدول شماره ۱). سطح برگ در تیمار اسید سیتریک ۴۰۰ گرم در لیتر تفاوت معنی‌داری با تیمار شاهد نداشت در حالیکه محلول‌پاشی غلظت‌های ۴۰۰ و ۸۰۰ گرم در لیتر اسید هیومیک میزان سطح برگ را نسبت به تیمار شاهد به طور معنی‌داری کاهش داد. بیشترین و کمترین میزان سطح برگ به ترتیب در تیمار کیتوزان ۴۰۰ گرم در لیتر + اسید هیومیک ۸۰۰ گرم در لیتر + اسیدسیتریک ۴۰۰ گرم در لیتر (۴۳/۲۶) و تیمار کیتوزان ۲۰۰ گرم در لیتر + اسیدسیتریک ۴۰۰ گرم در لیتر (۱۴/۳۹) مشاهده شد (جدول شماره ۲).

وزن خشک ساقه بوته

نتایج نشان داد وزن خشک ساقه در سطح احتمال ۱ درصد تحت تأثیر فرمولاسیون‌های مختلف کیتوزان، اسید هیومیک و اسید سیتریک قرار گرفت (جدول شماره ۱). بیشترین وزن خشک ساقه با محلول‌پاشی کیتوزان ۴۰۰ گرم در لیتر+ اسید هیومیک ۸۰۰ گرم در لیتر + اسید سیتریک ۴۰۰ گرم در لیتر (۰/۱۵ گرم) به دست آمد که تفاوت معنی‌داری با تیمار شاهد (۰/۱۴ گرم) و اسید سیتریک ۴۰۰ گرم در لیتر (۰/۱۴ گرم) نداشت. کمترین میزان آن نیز با محلول‌پاشی کیتوزان ۲۰۰ گرم در لیتر + اسید سیتریک ۴۰۰ گرم در لیتر (۰/۰۶۷ گرم) حاصل شد. محلول‌پاشی غلظت‌های ۴۰۰ و ۸۰۰ گرم در لیتر اسید هیومیک موجب کاهش معنی‌دار وزن خشک ساقه شد و همچنین کاربرد غلظت‌های ۲۰۰ و ۴۰۰ گرم در لیتر کیتوزان با اسید سیتریک نیز موجب کاهش وزن خشک ساقه شد اما محلول‌پاشی غلظت‌های بالای اسید هیومیک و کیتوزان با اسید سیتریک وزن خشک ساقه را پنجاه درصد نسبت به شاهد بهبود بخشید (جدول شماره ۲).

وزن خشک برگ بوته

استفاده از فرمولاسیون‌های مختلف کیتوزان، اسید هیومیک و اسید سیتریک تاثیر معنی‌داری ($P \leq ۰/۰۱$) بر وزن خشک برگ پونه‌سای گربه‌ای داشتند (جدول شماره ۱). محلول‌پاشی اسید سیتریک ۴۰۰ گرم در لیتر و غلظت‌های ۴۰۰ و ۸۰۰ گرم در لیتر اسید هیومیک وزن خشک برگ را نسبت به تیمار شاهد کاهش داد. محلول‌پاشی غلظت ۲۰۰ گرم در لیتر کیتوزان با اسید سیتریک ۴۰۰ گرم در لیتر نیز وزن خشک برگ را نسبت به تیمار شاهد کاهش داد اما غلظت ۴۰۰ گرم در لیتر کیتوزان با اسید سیتریک وزن خشک برگ را افزایش داد. استفاده از غلظت‌های بالای اسید هیومیک و کیتوزان با اسید سیتریک ۴۰۰ گرم در لیتر بیشترین تأثیر را در افزایش وزن خشک برگ داشتند. بیشترین و کمترین میزان وزن خشک برگ در تیمار کیتوزان ۴۰۰ گرم در لیتر + اسید هیومیک ۸۰۰ گرم در لیتر + اسید سیتریک ۴۰۰ گرم در لیتر (۲/۲۶ گرم) و کیتوزان ۲۰۰ گرم در لیتر + اسید سیتریک ۴۰۰ گرم در لیتر (۰/۷۸ گرم) مشاهده شد.

وزن خشک اندام هوایی بوته

محلول‌پاشی ترکیب‌های مختلف کیتوزان، اسید هیومیک و اسید سیتریک تاثیر معنی‌داری ($P \leq ۰/۰۱$) بر وزن خشک اندام هوایی نعناع گربه‌ای داشتند (جدول شماره ۱). بیشترین وزن خشک اندام هوایی با محلول‌پاشی کیتوزان ۴۰۰ گرم در لیتر + اسید هیومیک ۸۰۰ گرم در لیتر + اسید سیتریک ۴۰۰ گرم در لیتر (۲/۴۱ گرم) به دست آمد که تفاوت معنی‌داری با تیمار شاهد (۲/۰۷ گرم) نداشت و کمترین میزان آن نیز با محلول‌پاشی کیتوزان ۲۰۰ گرم در لیتر + اسید سیتریک ۴۰۰ گرم در لیتر (۰/۸۵ گرم) حاصل شد.

قندهای محلول

نتایج تجزیه واریانس نشان داد میزان گزیلوز، گلوکز و زایلوز در سطح احتمال ۱ درصد تحت تأثیر فرمولاسیون‌های مختلف کیتوزان، اسید هیومیک و اسید سیتریک قرار گرفتند (جدول شماره ۳). بیشترین میزان گزیلوز، گلوکز و زایلوز در تیمار کیتوزان ۲۰۰ گرم در لیتر + اسید سیتریک ۴۰۰ گرم در لیتر (گزیلوز: ۱۶/۳۵، گلوکز: ۳۹/۸ و فروکتوز: ۳۶/۱۷ گرم بر وزن تر) مشاهده شد. کمترین میزان آنها نیز در تیمار اسید هیومیک ۴۰۰ گرم در لیتر (گزیلوز: ۲۵/۵، گلوکز: ۵۵/۱ و

فروکتوز: ۵۳/۸۶ گرم بر وزن تر) به دست آمد. محلول‌پاشی اسید سیتریک ۴۰۰ گرم در لیتر میزان گلوکز را نسبت به تیمار شاهد به طور معنی‌داری افزایش داد اما میزان فروکتوز و زایلوز تفاوت معنی‌داری با تیمار شاهد نداشتند. میزان گزیلوز، گلوکز و فروکتوز تحت تأثیر محلول‌پاشی غلظت‌های ۴۰۰ و ۸۰۰ گرم در لیتر اسید هیومیک تفاوت معنی‌داری با تیمار شاهد نداشتند. افزودن غلظت‌های متفاوت اسید هیومیک به فرمول‌اسیون کیتوزان و اسید سیتریک تاثیر معنی‌داری بر میزان قندهای محلول در نعناع گربه‌ای نداشت (نمودار شماره ۱).

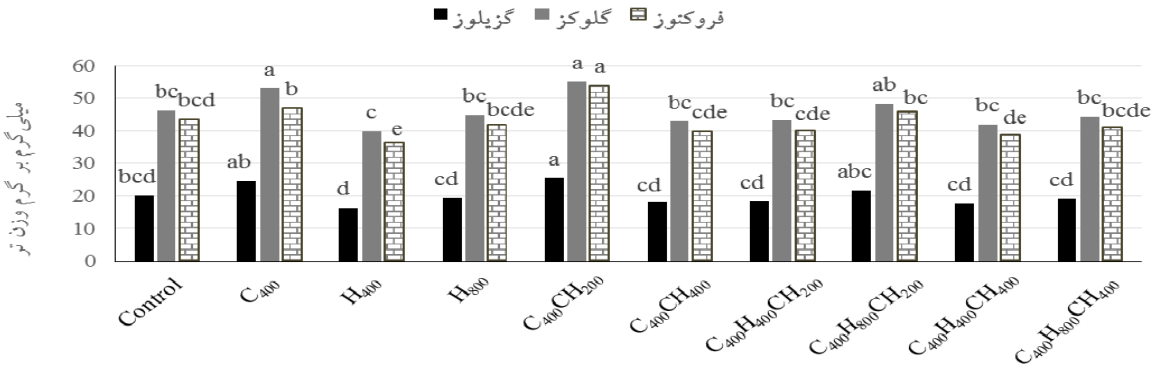
فنل، تانن و فلاونوئید کل

استفاده از فرمولاسیون‌های مختلف کیتوزان، اسید هیومیک و اسید سیتریک تأثیر معنی‌داری ($P \leq ۰/۰۱$) بر میزان فنل کل، تانن و فلاونوئید پونه‌سای گربه‌ای داشتند (جدول شماره ۱). بیشترین میزان فنل و تانن در تیمار اسید سیتریک ۴۰۰ گرم در لیتر (به ترتیب ۱۱/۶ و ۵/۶ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک) و کیتوزان ۴۰۰ گرم در لیتر + اسید سیتریک ۴۰۰ گرم در لیتر (به ترتیب ۱۱/۷ و ۵/۶ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک) مشاهده شد و کمترین میزان آنها نیز در تیمار کیتوزان ۲۰۰ گرم در لیتر + اسید هیومیک ۸۰۰ گرم در لیتر + اسیدسیتریک ۴۰۰ گرم در لیتر (به ترتیب ۳/۶ و ۱/۶ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک) حاصل شد. محلول‌پاشی غلظت‌های متفاوت اسید هیومیک چه تنهایی و یا در ترکیب با کیتوزان و اسید سیتریک موجب کاهش معنی‌دار میزان فنل و تانن نسبت به تیمار شاهد شدند. همچنین میزان فنل و تانن در تیمار کیتوزان ۲۰۰ گرم در لیتر + محلول اسید سیتریک ۴۰۰ گرم در لیتر تفاوت معنی‌داری با تیمار شاهد نداشت اما افزایش غلظت کیتوزان به ۴۰۰ گرم در لیتر موجب افزایش معنی‌دار میزان فنل و تانن شد (نمودار شماره ۲).

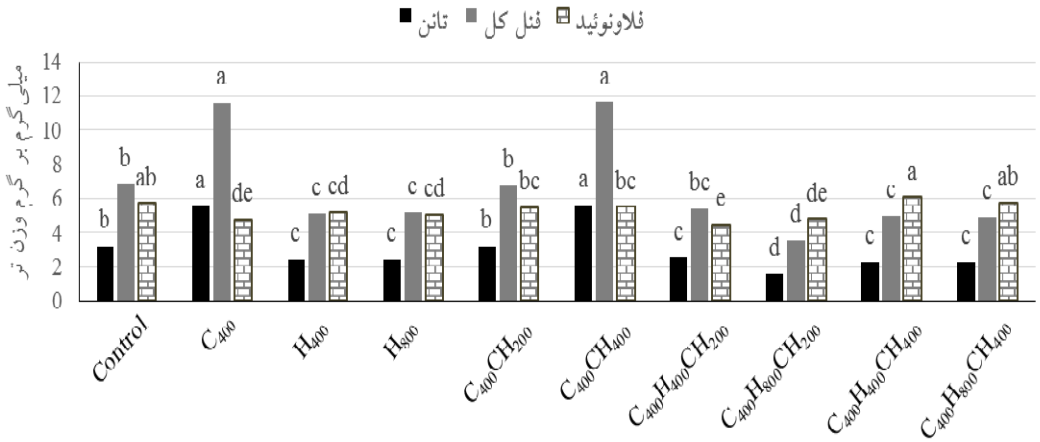
جدول شماره ۳- تجزیه واریانس اثرات تیمارهای محرک زیستی بر صفات فیتوشیمیایی

منابع تغییرات (S.O.V)	درجه آزادی df	میانگین مربعات					
		گلوکز	زایلوز	فروکتوز	فنل	تانن	فلاونوئید	نپتالاکتون
بلوک	۲	۱/۶ ns	۷/۶۵ ns	۰/۰۷۵ns	۰/۰۲۷ **	۰/۰۰۱۵ ns	۰/۰۰۰۹ ns	۱/۴۷ ns
تیمار	۹	۷۱/۲۲ **	۲۶/۹ **	۷۵/۹**	۰/۰۵۶ **	۰/۰۱۱ **	۰/۷۶**	۴۳/۴۷ **
خطای آزمایش	۱۸	۱۴/۳۸	۶/۸۷	۱۱/۰۸	۰/۰۰۱۸	۰/۰۰۰۵	۰/۰۶۳	۸/۳۹
ضریب تغییرات (CV)		۸/۲۵	۱۳/۰۴	۷/۷۷	۱۱/۶۱	۱۳/۲۷	۴/۷۶	۳/۷۷

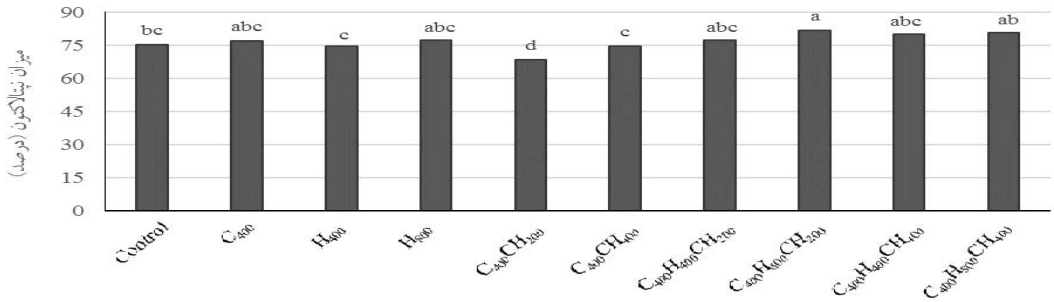
ns، *، **: به ترتیب غیرمعنی‌دار بودن و معنی‌دار بودن در سطوح ۵ و ۱ درصد احتمال



نمودار شماره ۱- مقایسه میانگین القای فرمولاسیون مختلف کیتوزان، اسید هیومیک و اسید سیتریک بر میزان قندهای محلول



نمودار شماره ۲- مقایسه میانگین القای فرمولاسیون مختلف کیتوزان، اسید هیومیک و اسید سیتریک بر میزان فنل، تانن و فلاونوئید



نمودار شماره ۳- مقایسه میانگین القای فرمولاسیون مختلف کیتوزان، اسید هیومیک و اسید سیتریک بر میزان نپتالاکتون

محلول‌پاشی اسید سیتریک ۴۰۰ گرم در لیتر و غلظت‌های ۴۰۰ و ۸۰۰ گرم در لیتر اسید هیومیک موجب کاهش معنی‌دار میزان فلاونوئید نسبت به تیمار شاهد شد. میزان فلاونوئید در صورت ترکیب اسید سیتریک با غلظت‌های ۲۰۰ و ۴۰۰ گرم در لیتر کیتوزان تفاوت معنی‌داری با تیمار شاهد نداشت. بیشترین میزان فلاونوئید در تیمار کیتوزان ۴۰۰ گرم در لیتر + اسید هیومیک ۴۰۰ گرم در لیتر + اسیدسیتریک ۴۰۰ گرم در لیتر (۶/۰۷ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک) مشاهده شد که تفاوت معنی‌داری با تیمار شاهد (۵/۷ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک) نداشت. کمترین میزان فلاونوئید نیز در تیمار کیتوزان ۲۰۰ گرم در لیتر + اسید هیومیک ۴۰۰ گرم در لیتر + اسیدسیتریک ۴۰۰ گرم در لیتر (۴/۵ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک) به دست آمد (نمودار شماره ۳).

نپتالاکتون

محلول‌پاشی ترکیب‌های مختلف کیتوزان، اسید هیومیک و اسید سیتریک تأثیر معنی‌داری ($P \leq ۰/۰۱$) بر میزان نپتالاکتون اسانس داشتند (جدول شماره ۱). میزان نپتالاکتون در تیمارهای اسید سیتریک ۴۰۰ گرم در لیتر (۷۷/۲ درصد) و غلظت‌های ۴۰۰ و ۸۰۰ گرم در لیتر اسید هیومیک (به ترتیب ۷۴/۶۵ و ۷۷/۴ درصد) تفاوت معنی‌داری با تیمار شاهد (۷۵/۴ درصد) نداشتند. کاربرد غلظت ۲۰۰ گرم در لیتر کیتوزان با اسید سیتریک ۴۰۰ گرم در لیتر موجب کاهش میزان نپتالاکتون نسبت به تیمار شاهد شد اما محلول ۴۰۰ گرم در لیتر کیتوزان با ۴۰۰ گرم در لیتر اسید سیتریک تفاوت معنی‌داری با تیمار شاهد نداشت. کاربرد غلظت‌های متفاوت اسید هیومیک با کیتوزان و اسید سیتریک موجب افزایش میزان نپتالاکتون شد به

طوری که بیشترین میزان آن در تیمار کیتوزان ۲۰۰ گرم در لیتر + اسید هیومیک ۸۰۰ گرم در لیتر + اسیدسیتریک ۴۰۰ گرم در لیتر (۸۰/۷ درصد) مشاهده شد. کمترین میزان نپتالاکتون نیز در تیمار کیتوزان ۲۰۰ گرم در لیتر + اسید سیتریک ۴۰۰ گرم در لیتر (۶۸/۵ درصد) حاصل شد.

بحث

نتایج این تحقیق نشان داد استفاده از فرمولاسیون‌های مختلف اسید سیتریک، کیتوزان و اسید هیومیک تأثیر معنی‌داری بر صفات مورفولوژیکی و فیتوشیمیایی گیاه پونه‌سای گربه‌ای داشت. بیشترین میزان سطح برگ، وزن خشک ساقه، وزن خشک برگ و اندام هوایی با کاربرد غلظت‌های بالای کیتوزان و اسید هیومیک با اسید سیتریک ۴۰۰ گرم در لیتر به دست آمد. این نتایج با یافته‌های سایر محققین مطابقت داشت [۳۴-۳۱]. کاربرد اسید هیومیک، کیتوزان و اسید سیتریک به سبب افزایش سطح برگ و موجب جذب بیشتر نور خورشید شده که، میزان فتوسنتز خالص را افزایش می‌دهد [۳۵] و بدین‌ترتیب وزن خشک اندام هوایی پونه‌سای گربه‌ای افزایش یافته است. قربانی و همکاران (۱۳۸۹) بیان کردند کاربرد اسید هیومیک به سبب افزایش شاخص سطح برگ ذرت موجب دریافت انرژی خورشیدی در طول زمان زیادتر شد و در نتیجه عمل فتوسنتز در مدت زمان بیشتری انجام شده و ماده خشک بیشتری تولید گردید [۱۶].

گزارش شده است که کیتوزان از طریق افزایش فتوسنتز، کاهش اثرات تنش‌های محیطی و تحریک جذب مواد غذایی، موجب افزایش رشد گیاهان می‌شود [۱۰-۷]. اسید هیومیک نیز از طریق افزایش تقسیم سلولی، رشد ریشه و اندام هوایی، فتوسنتز، جذب مواد غذایی مقاومت گیاه به تنش‌های محیطی باعث افزایش عملکرد محصولات زراعی می‌شود [۱۴]. همچنین به طور متعدد گزارش شده است که سیترات در متابولیسم کربن و مقاومت گیاه به تنش‌های زیستی و غیر زیستی دخالت دارد. محلول‌پاشی اسید سیتریک ۰/۱ درصد بر گیاه ریحان موجب تولید بیوماس و عملکرد اسانس بیشتر شد [۲۱].

محلول‌پاشی غلظت‌های ۴۰۰ و ۸۰۰ گرم در لیتر اسید هیومیک موجب کاهش اغلب صفات مورفولوژیکی پونه‌سای گربه‌ای شد، در حالی که ترکیب همین غلظت‌های اسید هیومیک با اسید سیتریک و کیتوزان موجب بهبود صفات رویشی نعناع گربه‌ای شد. این نتایج نشان می‌دهند که اگر اسید هیومیک به تنهایی در غلظت‌های بالا بر گیاه نعناع گربه‌ای محلول‌پاشی شود، اثر سمیت دارد. محلول‌پاشی اسید سیتریک ۴۰۰ گرم در لیتر در اغلب صفات موروفولوژیکی تفاوت معنی‌داری با تیمار شاهد نداشت اما زمانیکه با کیتوزان ۲۰۰ گرم در لیتر محلول‌پاشی شد، اغلب صفات مورفولوژیکی را نسبت به تیمار شاهد کاهش داد. اگرچه ترکیب غلظت ۲۰۰ گرم در لیتر کیتوزان با اسید سیتریک ۴۰۰ گرم در لیتر اغلب صفات مورفولوژیکی را کاهش داد اما افزایش غلظت کیتوزان به ۴۰۰ گرم در لیتر موجب بهبود صفات مورفولوژیکی شد.

بیشترین میزان قندهای محلول با محلول‌پاشی کیتوزان ۲۰۰ گرم در لیتر + اسید سیتریک ۴۰۰ گرم در لیتر حاصل شد. میزان قندهای محلول درسایر تیمارها تفاوت معنی‌داری با تیمار شاهد نداشتند، هرچند میزان گلوکز در تیمار محلول‌پاشی اسید سیتریک ۴۰۰ گرم در لیتر به طور معنی‌داری بیشتر از تیمار شاهد و میزان فروکتوز در تیمار اسید هیومیک ۴۰۰ گرم در لیتر به طور معنی‌داری کمتر از تیمار شاهد بود. این نتایج با یافته‌های برخی از محققین مطابقت و با برخی دیگر مغایرت داشت [۳۹-۳۶]. کاربرد اسید هیومیک در خاک و محلول‌پاشی آن بر روی گیاه لیلیوم نشان داد که مصرف اسید هیومیک در خاک میزان قندهای محلول را افزایش داد اما محلول‌پاشی آن تفاوت معنی‌داری با تیمار شاهد نداشت [۴۰]. همچنین گزارش شده است که کاربرد کیتوزان در گیاه بادرنجبویه (*Melissa officinalis* L.) میزان کربوهیدرات را در مقایسه با تیمار شاهد به طور معنی‌داری افزایش داد [۴۱]. افزایش تجزیه کربوهیدرات‌های نامحلول به کربوهیدرات‌های ساده محلول جهت تأمین انرژی یا تنظیم تعادل آبی گیاه و مقابله با تنش‌های محیطی صورت می‌گیرد [۴۲، ۴۰]. افزایش قندهای محلول در تیمار کیتوزان ۲۰۰ گرم در لیتر + اسید سیتریک ۴۰۰ گرم در لیتر با کاهش تولید بیوماس همراه بود که نشان دهنده اثر منفی

این تیمار بر رشد و نمو پونه‌سای گربه‌ای است. هر چند میزان قندهای محلول و بیوماس گیاه با افزایش غلظت کیتوزان در این فرمولاسیون، تفاوت معنی‌داری با تیمار شاهد نداشت.

کاربرد اسید سیتریک ۴۰۰ گرم در لیتر به تنهایی یا همراه کیتوزان ۴۰۰ گرم در لیتر موجب افزایش میزان فنل و تانن شد در حالی که کاربرد اسید هیومیک به تنهایی میزان فنل و تانن را نسبت به تیمار شاهد کاهش داد. همچنین افزودن غلظت‌های ۴۰۰ و ۸۰۰ گرم در لیتر اسید هیومیک به فرمولاسیون‌های کیتوزان و اسید سیتریک نیز موجب کاهش میزان فنل و تانن شد. محلول‌پاشی اسید سیتریک و هیومیک اسید به تنهایی موجب کاهش میزان فلاونوئید نسبت به تیمار شاهد شد در حالی که مصرف اسید سیتریک با غلظت‌های متفاوت کیتوزان تأثیر معنی‌داری بر میزان فلاونوئید نداشت. استفاده از غلظت پایین کیتوزان در فرمولاسیون اسید هیومیک و اسید سیتریک میزان فلاونوئید را کاهش داد اما افزودن غلظت بالای کیتوزان به فرمولاسیون اسید هیومیک و اسید سیتریک میزان فلاونوئید را نسبت به تیمار شاهد افزایش داد. این یافته‌ها با نتایج برخی از محققین مطابقت و با برخی نتایج دیگر مغایرت داشت [۴۷، ۴۶، ۴۵، ۴۴، ۴۳، ۳۱]. Manas و همکاران (۲۰۱۴) گزارش کردند که کاربرد اسید هیومیک تاثیر معنی‌داری بر میزان فنل در گیاه فلفل ندارد [۴۸]. گزارش شده است که کیتوزان عملی مشابه اسید جاسمونیک و سالیسیلیک اسید در انتقال سیگنال برای سنتز ترکیبات فنولی دارد به طوری که کاربرد کیتوزان در برخی گیاهان به سبب افزایش فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیالیاز و تأثیر بر فعالیت آنزیم پلی‌فنل اکسیداز موجب افزایش میزان ترکیبات فنولی می‌شود [۴۹].

کاربرد اسید هیومیک، اسید سیتریک و کیتوزان با یکدیگر موجب افزایش میزان نپتالاکتون در اسانس گیاه نعناع گربه‌ای شد. گزارش‌های متعدد بیان داشتند که میزان ماده مؤثره گیاهان دارویی با القای محرک‌های زیستی مانند اسید هیومیک، اسید سیتریک و کیتوزان افزایش می‌یابد. محلول‌پاشی اسید سیتریک ۰/۱ درصد موجب افزایش تولید بیوماس و عملکرد اسانس در گیاه ریحان شد و همچنین محلول‌پاشی اسید سیتریک، درصد اسانس و میزان گاما ترپینئول در گیاه مرزه (*Satureja hortensis*) را افزایش داد. این محققین بیان کردند که محلول‌پاشی اسید سیتریک با تغییر مسیر متابولیسم بافت‌های گیاهی، موجب افزایش جریان کربن به مسیرهای بیوسنتزی متابولیت‌های ثانویه شده است [۵۰، ۲۲، ۲۱]. کاربرد ۱۰ کیلوگرم در هکتار اسید هیومیک، درصد اسانس و میزان ماده موثره گل همیشه بهار را بهبود بخشید [۵۱]. Kim و همکاران (۲۰۰۵) نشان دادند که استفاده از غلظت‌های متفاوت کیتوزان موجب افزایش میزان رزمارینیک اسید، لینالول، ایوژنول و متیل ایوژنول در گیاه ریحان شد که افزایش میزان این ترکیبات با افزایش فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیالیاز همراه بود. آنها بیان نمودند که کیتوزان همانند سایر محرک‌های زیستی از قبیل بتاگلوکان و عصاره مخمر می‌تواند بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه در گیاهان را از طریق تحریک مسیر فنیل پروپانوئید بدون هیچ گونه تنشی افزایش دهد [۳۱].

نتیجه‌گیری

نتایج این آزمایش نشان داد که استفاده از اسید هیومیک، اسید سیتریک و کیتوزان در غلظت‌های بالا تأثیر مثبتی بر بهبود ویژگی‌های رویشی و فیتوشیمیایی گیاه دارویی پونه سای گربه‌ای داشتند. به طوری که بیشترین میزان اغلب خصوصیات مورفوفیزیولوژیکی در فرمولاسیون ۴۰۰ گرم در لیتر کیتوزان+ ۸۰۰ گرم در لیتر اسید هیومیک+ ۴۰۰ گرم در لیتر اسیدسیتریک و بیشترین میزان نپتالاکتون نیز در فرمولاسیون ۲۰۰ گرم در لیتر کیتوزان + ۸۰۰ گرم در لیتر اسید هیومیک + ۴۰۰ گرم در لیتر اسیدسیتریک حاصل شد.

منابع

1. Mozaffarian V. Identification of Medicinal and Aromatic Plants of Iran. Farhang Moaser Publishers, Tehran. 2012, pp: 523-528.

2. Van Wyk BE and Wink M. Medicinal plants of the world. Timber Press. 4th. USA. 2010.

3. Jahan M and Koocheki A. Effect of organic production of German chamomile (*Maricaria chamomilla* L.) on its chemical composition. *Pajouhesh & Sazandegi* 1996; 61: 87 - 95.

4. Fallahi J, Koocheki A and Rezvani Moghaddam P. Investigating the effects of organic fertilizer on quantity index and the amount essential oil and chamazulene in chamomile (*Matricaria recutita*). *Iranian Journal of Field Crops.* 2008; 7 (1): 127 – 35.

5. Gawronaka H. Biostimulators in modern agriculture (general aspects) Arysta Life Science. Published by the editorial House Wies Jutra, Limited. Warsaw, *International Journal of Agriculture and Crop Sciences* 2008; 7 (25): 89.

6. No HK, Young PN, Ho LS and Meyers SP. Antibacterial activity of chitosans and chitosan oligomers with different molecular weights. *Int. Food Microbiol*. 2002; 4: 65 - 72.

7. Dutta PK, Dutta J and Tripathi VS. Chitin and chitosan: Chimistry, Properties and applications. *Journal of Scientific & Industrial Res*. 2004; 63 (1): 20-31.

8. Dzung NA. Appliccation of Chitin, Chitosan and their derives for agriculture in Vietnam. *Journal of Chitin Chitosan* 2005; 10 (3): 109-113.

9. Uthairatanakij A, Teixeira da Silva JA and Obsuwan K. Chitosan for Improving Orchid Production and Quality. *Orchid Science and Biotechnol*. 2007; 1 (1): 1-5.

10. Luan LQ, Ha VTT, Nagasawa N, Kume T, Yoshii F and Nakanishi TM. Biological effect of irradiated chitosan on plantsin vitro, *Biotechnol. Applied Biochem.* 2005; 41: 49-57.

11. Li CF and Wu JC. Chitosan benefits cultivation of vegetables. In R. H. Chen, and H. C. Chen (Eds.). Advances in Chitin Science III. Rita advertising Co. Ltd., 2010, pp: 448 - 451.

12. Cheng X, Zhou U and Cui X. Improvement of phenylethanoid glycosides biosynthesis in Cistanche deserticola cell suspension cultures by chitosan elicitor. *Biotechnol. J*. 2006; 121: 253 – 260.

13. Mackowiak C, Grossl PR and Bugbee BG. Beneficial effects of humic acid on micronutrient availability to wheat. *Soil. Sci. AM.J.* 2001; 65: 1744 - 1750.

14. Mayhew L. Humic acid substances in biological agriculture. *Eco-Agriculture* 2004; 34: 182.

15. Barghamadi K and Najafi Sh. Effect of Different Levels of Nitroxin and Humic Acid on Quantitative Properties and Essential Oil of Ajowan (*Carum copticum* L.) C. B. Clarke) *Journal of horticulture science* (In Persian). 2015; 29 (3): 321- 341.

16. Ghorbani S, Khazaei HR, Kafi M and Bannayan Aval M. Effects of humic acid application with irrigation water on yield and yield components of corn (*Zea mays* L.). *Agroecol*. 2010; 2 (1): 123- 131.

17. Tan K.H. Humic Matter in Soil and the Environment. Marcel Dekker, New York. 2003.

18. Kirimura K, Honda Y and Hattori T. Citric Acid. *Industrial Biotechnology and Commodity Products.* Elsevier Inc., 2011; Sep 9, Vol. 3: 135-142.

19. Trejo-Tellez LI, Gomez-Merino FC and Schmitt JM. "Citric acid: biosynthesis, properties and applications on higher plants"in Citric Acid, eds D.A.Vargas and J.V. Medina (NewYork, NY: Nova Science Publishers, Inc.). 2012, pp: 43 - 70.

20. Anjum NA, Hasanuzzaman M, Hossain MA, Thangavel P, Roychoudhury A, Gill SS, Merlos Rodrigo MA, Adam V, Fujita M and et al. Jacks of metal/metalloid chelation trade in plants-an overview. *Front. Plant Sci*. 2015; 6: 1- 17.

21. Jafari N and Hadavi E. Growth and essential oil yield of Basil (*Ocimum basilicum* L.) as affected by foliar spray of citric acid and salicylic acid. *Zeitschrift fur Arznei- und Gewurzpflanzen* 2012; 17 (2): 80 - 83.

22. Radmanesh E, Naghdi Badi H, Hadavi E and

Mehrafarin A. Shoot Growth, Gamma-Terpinene and Essential Oil Content of *Satureja hortensis* L. in Response to Foliar Application of FeSO4 and Citric Acid. *Journal of Medicinal Plants* 2015; 14 (53): 45 - 57.

23. Dubios M, Gilles KA, Hamilton JK, Rebers PA and Smith F. Calorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem*. 1956; 28: 350- 356.

24. Ferreres F, Gomes D, Valent P, Gonçalves R, Pio R, Chagas EA, Seabra RM and Andrade PB. Improved loquat (*Eriobotrya japonica* Lindl.) cultivars: Variation of phenolics and antioxidative potential. *Food Chem*. 2009; 114: 1019-1027.

25. Wettasinghe M and Shahid F. Antioxidant and free radical-scavenging properties of ethanolic extracts of defatted borage (*Borago officinalis* L.) seeds. *Food Chem*. 1999; 67: 399-414.

26. Siddhuraju P and Becker K. The antioxidant and free radical scavenging activities of processed cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp.) seed extracts. *Food Chem*. 2007; 101: 10-19.

27. Chang C, Yang M, Wen H and Chern J. Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. *J. Food Drug Analaysis* 2002; 10: 178-182.

28. Adams RP. Identification of essential oil components by gas chromatography / mass spectrometry.Allured Publishing Corporation Carol Stream, IL. 2001.

29. McLafferty FW and Stauffer DB. The Wiley / Nbs registry of mass spectral data. New York: Wiley. 1989.

30. Safaei-Ghomi J, Djafari-Bidgoli Z and Batooli H. Volatile constituents' analysis of *Nepeta cataria* from central Iran. *Chemistry of Natural Compounds* 2009; 45 (6): 913 – 915.

31. Kim HJ, Chen F, Wang X and Rajapkse NC. Effect of Chitosan on the Biological Properties of Sweet Basil (*Ocimum basilicum* L.). *J. Agric. Food Chem*. 2005; 53: 3696 - 3701.

32. Mondal MMA, Malek MA, Puteh AB, Ismail MR, Ashrafuzzaman M and Naher L. Effect of foliar application of chitosan on growth and yield in okra. Australian Journal of Crop Science. *AJCS*. 2012; 6 (5): 918 - 921.

33. Ulukan H. Humic acid application into field crops cultivation. Kahraman Maras Sutcu Imam University *J. Sci. Eng*. 2008; 11 (2): 119-128

34. Hartz1 TK and Bottoms TG. Humic Substances Generally Ineffective in Improving Vegetable Crop Nutrient Uptake or Productivity. *Horticulture Sci*. 2010; 45(6): 906 - 910.

35. Sarmadnia GH and Koocheki A. Crop physiology. Jihad Daneshgahi Publication of Mashhad, Mashhad, Iran. 2001.

36. El-Bassiouny HSM, Bakry BA, El-Monem Attia AA and Abd Allah MM. Physiological Role of Humic Acid and Nicotinamide on Improving Plant Growth, Yield, and Mineral Nutrient of Wheat (*Triticum durum*) Grown under Newly Reclaimed Sandy Soil. *Agricultural Sciences* 2014; 5: 687 - 700.

37. Al-Erwy AS, Al-Toukhy A and Bafeel SO. Effect of Chemical, Organic and Bio Fertilizers on photosynthetic pigments, carbohydrates and minerals of Wheat (*Triticum aestivum* L.) Irrigated with Sea Water. *Int. J. Adv. Res. Biol. Sci*. 2016; 3 (2): 296-310.

38. Abu-Muriefah SS. Effect of chitosan on common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) plants grown under water stress conditions. *International Research Journal of Agricultural Science and Soil Sci*. 2013; 3 (6): 192- 199.

39. Kamal AM and Ghanem kM. Response of cap gooseberry plants (*Physalis peruviana* L.) to some organic amendments and foliar spray with chitosan. *J. Plant Production, Mansoura Univ.* 2011; 2 (12): 1741 - 1759.

40. Parandian F and Samavat S. Effects of Fulvic and Humic acid on Anthocyanin, soluble Sugar, ∝-Amylase Enzyme and some micronurient elements

in Lilium. *International Research Journal of Applied and Basic Sci*. 2012; 3 (5): 924-929.

41. Khaje H and Naderi S. The effect of chitosan on some antioxidant enzymes activities and biochemistry characterization in melissa (*Melissa officinalis*). *Crop Science Research in Arid Regions* 2014; 1 (1): 100 - 113.

42. Badr AC, Genet P, Dunand FV, Toussaint ML, Epron DA ans Badot PM. Effect of Copper on growth in Cucumber plants and its relationships with carbohydrate accumulation and change in ion contents. *Plant Sci*. 2003; 166: 1213 - 1218.

43. Farouk S, Ramadan AA and Showler AT. Chitosan effects on physiochemical indicators of drought-induced leaf stress in cowpea. *Plant Knowledge J*. 2013; 2 (4): 135-144.

44. Cho MH, No HK and Prinyawiwatkul W. Chitosan treatments affect growth and selected quality of sunflower sprouts. *J. Food Sci*. 2008; 73: 70-77.

45. Ali A, Muhammad MTM, Sijam K ans Siddiqui Y. Effect of chitosan coatings on the physicochemical characteristics of Eksotika II papaya (*Carica papaya* L.) fruit during cold storage. *Food Chem*. 2011; 124: 620 - 626.

46. Yin H, Frette XC, Christensen LP and Grevsen K. Chitosan oligosaccharides promote the content of polyphenols in Greek oregano (*Origanum vulgare* ssp. hirtum). *J. Agric. Food Chem*. 2012; 60: 136–143.

47. Singh S. Enhancing phytochemical levels, enzymatic and antioxidant activity of spinach leaves by chitosan treatment and an insight into the metabolic pathway using DART-MS technique. *Food Chem*. 2016; 199, 176 - 184.

48. Manas D, Bandopadhyay PK, Chakravarty A, Pal S and Bhattacharya A. Effect of foliar application of humic acid, zinc and boron on biochemical changes related to productivity of pungent pepper (*Capsicum annuum* L.). *African Journal of Plant Sci*. 2014; 8 (6): 320 – 335.

49. Ruiz-García Y and Gómez-Plaza E. Elicitors: A Tool for Improving Fruit Phenolic Content. *Agriculture* 2013; 3: 33-52.

50. Miri SM, Ahmadi S and Moradi P. Influence of Salicylic Acid and Citric Acid on the Growth, Biochemical Characteristics and Essential Oil Content of Thyme (*Thymus vulgaris* L.). *Journal of Medicinal Plants and By-products* 2015; 2: 141-146.

51. Farjami AA and Nabavi Kalat SM. Effect of Humic Acid and Phosphorus on the Quantity and Quality of Marigold (*Calendula officinalis* L.) Yield. *Iranian Journal of Crop Ecophysiology* 2014; 7 (4): 443-452.

Changes in Nepetalactone Content and Biochemical traits of Catnip (*Nepeta cataria* L.) in Response to Induction of Biostimulants Compounds

Ozhan N (Ph.D. student)[1], Goldani M (Ph.D.)[1]*, Naghdi Badi H (Ph.D.)[2], Mehrafarin A (Ph.D.)[2], Parsa M (Ph.D.)[1]

1- Department of Agronomy and Plant Breeding Ferdowsi University of Mashhad, Iran
2- Medicinal Plants Research Center, Institute of Medicinal Plants, ACECR, Karaj, Iran
*Corresponding author: Department of Agronomy and Plant Breeding Ferdowsi University of Mashhad, P.O.Box: 9177948978, Mashhad, Iran
Tel: +98-513-8805806, Fax: +98-513-8788430
E-mail: Goldani@um.ac.ir

Abstract

Background: The use of organic and biological stimulants at different stages of plant growth may increase growth and yield of plants in addition to reducing environmental stresses.

Objective: The aim of this study was to determine the induction effect of various formulations of chitosan, humic acid, and nicgtric acid on nepetalactone content and biochemical traits in catnip.

Methods: This study, which was based on a completely randomized design (CRBD), was conducted in the research greenhouse of Medicinal Plants Research Institute, ACECR. Treatments consisted of: control, citric acid, different concentrations of humic acid, dual combinatorial formulations of chitosan and citric acid, and triple combinatorial formulations of chitosan, citric acid, and humic acid. First, the roots of the transplants were treated before being transferred to the pot. Then, about 20 days after planting, treatments were sprayed on the plants three times – once every15 days.

Results: Results showed that the induction of different formulations of humic acid, citric acid, and chitosan had significant effects on plant height ($P \leq 0.05$), the number of lateral branches, the number of leaves, dry weight of leaves, stems, and shoot, content of soluble sugar, phenols, tannins, flavonoids, and nepetalactone ($P \leq 0.01$). The highest amounts - in most morpho-physiological traits - were observed 400 ppm chitosan + 800 ppm humic acid + 400 ppm citric acid treatment. The maximum content of nepetalactone was obtained at 200 ppm chitosan + 800 ppm humic acid + 400 ppm citric acid.

Conclusion: The use of biostimulants formulation including humic acid, citric acid, and chitosan had a significant positive effect on improving vegetative characteristics and especially on phytochemical traits of catnip (*Nepeta cataria* L.).

Keywords: *Nepeta cataria* L., Biostimulant, Chitosan, Citric acid, Humic acid