

اثر نیتروژن بر برخی صفات کمی و کیفی گیاه دارویی زرین گیاه

علی حیدرزاده^۱، سید علی محمد مدرس ثانوی^{۲*} و علی مختصی بیدگلی^۳
۱، ۲ و ۳. دانشجوی دکتری، استاد و استادیار، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
(تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۴/۱۶ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۷/۲۹)

چکیده

به منظور ارزیابی تأثیر سطوح مختلف نیتروژن روی صفات کمی و کیفی گیاه دارویی زرین گیاه (*Dracocephalum kotschy* Boiss)، آزمایشی در سال زراعی ۱۳۹۷-۱۳۹۶ در مزرعه تحقیقاتی دانشگاه تربیت مدرس به مرحله اجرا در آمد. این آزمایش در قالب بلوک‌های کامل تصادفی در سه تکرار انجام شد. تیمارهای مورد بررسی شامل سطوح کودی صفر، ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰، ۲۰۰، ۲۵۰، ۳۰۰ و ۳۵۰ کیلوگرم نیتروژن در هکتار بود. از اوره به عنوان کود نیتروژن و از نشاء زرین گیاه اکوتیپ فریدونشهر برای کشت استفاده شد. نتایج نشان داد که بیشترین ارتفاع (۲۹/۶۳ سانتی‌متر) از کاربرد ۱۳۲/۶ کیلوگرم نیتروژن در هکتار به دست آمد. بیشترین وزن تر کل با ۲۹۶۶ کیلوگرم در هکتار با کاربرد ۱۲۶/۸ کیلوگرم نیتروژن در هکتار حاصل شد. بیشترین وزن تر ساقه و برگ به ترتیب با کاربرد ۱۱۲/۶۹ و ۱۶۲/۶۹ کیلوگرم نیتروژن در هکتار مشاهده شد. کاربرد ۱۱۲/۶۹ کیلوگرم در هکتار نیتروژن بیشترین فلاونوئید کل (۷/۶۹ میکرومول بر گرم وزن تر برگ) را داشت و بیشترین عملکرد اسانس از کاربرد ۱۲۶/۵ کیلوگرم نیتروژن در هکتار به دست آمد. به خاطر این که هدف از کشت گیاهان اسانس دار، تولید عملکرد اسانس بیشتر می‌باشد لذا مقدار نیتروژن توصیه شده برای زرین گیاه برای دستیابی به حداکثر عملکرد اسانس، ۱۲۶/۵ کیلوگرم در هکتار می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: آنتوسیانین، در حال انقراض، زرین گیاه، عملکرد اسانس، فلاونوئید، نیتروژن.

Effect of nitrogen on some quantitative and qualitative traits of *Dracocephalum kotschy* Boiss

Ali Heidarzadeh¹, Seyed Ali Mohammad Modarres-Sanavy^{2*} and Ali Mokhtassi-Bidgoli³

1, 2, 3. Ph.D. Candidate, Professor and Assistant Professor, Faculty of Agriculture, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
(Received: Jul. 07, 2019- Accepted: Dec. 18, 2019)

ABSTRACT

In order to investigate the effects of nitrogen fertilizer on quantitative and qualitative traits of *Dracocephalum kotschy* Boiss, a field experiment was conducted in the Research Field of Tarbiat Modares University during 2018 growing season. The experiment was performed at three replications in a completely randomized blocks design. The experimental treatments included eight nitrogen fertilizer amounts (0, 50, 100, 150, 200, 250, 300 and 350 kg Nitrogen/ha). Urea as nitrogen fertilizer and the seedling of Fereydun Shahr as ecotype were used. The results showed that the maximum height (29.63 cm) was obtained from the application of 136.6 kg N ha⁻¹. The highest total fresh weight was observed with 2966 kg ha⁻¹ from the application of 126.8 kg N ha⁻¹. The highest stems and leaves fresh weight was produced by using 112.69 and 162.69 kgNha⁻¹, respectively. Application of 112.69 and 126.5 kg N ha⁻¹ had the highest total flavonoid (7.69 μmol/g of fresh leaf weight) and essential oil yield respectively. Because the purpose of cultivating medicinal plants to produce essential oil yields, therefore, the recommended amount of nitrogen to achieve maximum essential oil yield for *D. kotschy* is 126.5 kg ha⁻¹.

Keywords: Anthocyanin, *Dracocephalum kotschy* Boiss, endangered, essential oil yield, flavonoid, nitrogen.

* Corresponding author E-mail: modaresa@modares.ac.ir

مقدمه

بسیار با ارزش بوده و می‌تواند با قرارگیری در پروسه تولید انبوه سودآوری بالایی را به همراه داشته باشد. استفاده مناسب از روش‌ها و عوامل زراعی در تولید گیاهان دارویی به منظور افزایش میزان مواد مؤثره حائز اهمیت می‌باشد. از مهم‌ترین عوامل زراعی، عنصر نیتروژن است که گیاه در تمام مراحل دوره رشدی خود به آن نیاز دارد و در بسیاری از فرآیندهای متابولیکی گیاه نقش اساسی ایفا می‌کند (Sexena, 2004). لازمه پژوهش‌های علمی دقیق روی بخش تغذیه گیاهان زراعی و دارویی نیازمند تعیین دقیق سطح کودی مورد نیاز آن گیاه می‌باشد. تحقیقات مختلفی درباره اکثر گیاهان زراعی و دارویی به تفکیک گیاه صورت گرفته است که به مواردی از آن‌ها اشاره می‌شود. در بررسی نیاز نیتروژن گیاه نوروژک مشاهده شد که بیش‌ترین میزان ارتفاع بوته، قطر تاج پوشش، تعداد شاخه زایا، عملکرد بیولوژیک و عملکرد دانه با کاربرد ۲۰۰ کیلوگرم در هکتار به‌دست آمد (Amini et al., 2017). بیش‌ترین عملکرد اسانس در گیاه ریحان (*Ocimum basilicum* L.) از کاربرد ۱۰۰ کیلوگرم در هکتار نیتروژن در شرایط آبیاری مطلوب تولید شد (Afkari, 2018). محققین نشان دادند که با کاربرد ۱۲۰ کیلوگرم در هکتار نیتروژن در مرزنجوش وحشی (*Origanum vulgare* L.) بیش‌ترین عملکرد مشاهده شد (YazdaniBiouki et al., 2014). کاربرد ۵۰ کیلوگرم در هکتار نیتروژن در مرزه خوزستانی (*Satureja khuzistanica*) باعث تولید بیش‌ترین درصد اسانس و عملکرد اسانس شد (Nooshkam et al., 2016). با افزایش کاربرد نیتروژن از صفر به ۱۲۰ کیلوگرم در هکتار در گیاه چای ترش عملکرد بیولوژیک ۲۵/۵ درصد افزایش یافت (Sepahrom & Moosavi, 2016) و همچنین کاربرد بالای نیتروژن در گیاه کدو تخم کاغذی موجب افزایش میوه در بوته شد (Gholipoori et al., 2007) در حالی که در مطالعه‌ای روی عملکرد گیاه دارویی گل‌محمدی ثابت شده که مصرف مقادیر بالای کود نیتروژن منجر به کاهش گل برداشت شده می‌شود (Daneshkhah et al., 2007). سطح بهینه استفاده کود نیتروژن برای گیاه روناس (*Rubia tinctorum* L.) ۱۸۰ کیلوگرم در هکتار تعیین شد (Salek et al., 2017) و بیش‌ترین عملکرد گل گیاه

جنس *Dracocephalum* از مهم‌ترین جنس‌های تیره نعناعیان (Lamiaceae) است که شامل ۱۸۶ گونه می‌باشد که هشت گونه از آن در ایران می‌روید و یکی از گونه‌های بومی این جنس *Dracocephalum kotschyi* است که معمولاً در ارتفاعات کوهستانی استان‌های گرگان، مازندران، همدان، کرمانشاه، فارس (کوه دنا) و ارتفاعات تهران (کوه‌های البرز)، ارتفاعات شمال سمنان و اصفهان می‌روید (Mozaffarian, 2015; Rechinger, 1986). گونه *D.kotschyi* (2n=20) از گونه‌های انحصاری و بومی ایران است و با نام زرین‌گیاه یا بادرنجبویه دناپی شناخته می‌شود (Mozaffarian, 2003). زرین‌گیاه به صورت بوته‌ای-پشته‌ای، ساقه‌های گلدار به طول ۱۰ تا ۲۰ سانتی‌متر، بالارونده، با میان‌گره‌های کوتاه، با برگ‌های انبوه به طول ۱۰ تا ۲۰ و به عرض سه تا ۱۰ میلی‌متر به شکل تخم‌مرغی تا مستطیلی با قاعده قلبی می‌باشد (Mozaffarian, 2015). اهالی مناطق مختلف آن را بسیار ارزشمند می‌دانند و برای جمع‌آوری این گیاه با بقیه رقابت می‌کنند (Dostalek et al., 2010). برداشت بی‌رویه این گیاه در مرحله گلدهی توسط افراد بومی مانع از به‌بذر نشستن این گیاه شده و محدود بودن پراکنش جغرافیایی آن باعث کاهش جمعیت این گیاه را کاهش داده به طوری که گفته می‌شود زرین‌گیاه یکی از گیاهان در معرض انقراض (Endangered) ایران می‌باشد (Abdi, 2008; Jalali and Jamzad, 1999). پژوهشگران نشان دادند که زرین‌گیاه از لحاظ دارویی ارزشمند بوده (Golshani et al., 2004). در برگ‌های این گیاه ترکیبی به نام spinal-z وجود دارد که در درمان سرطان مورد استفاده قرار می‌گیرد و همچنین ترکیب فلاونی به نام xanthomicrol در این گیاه وجود دارد که از تکثیر سلول‌های سرطانی بدخیم جلوگیری می‌کند (Jahanian et al., 2005). اسانس موجود در گیاهان جنس *Dracocephalum* دارای خاصیت دارویی بوده و فعالیت آنتی‌اکسیدانی بالایی را داشته و همچنین خاصیت آنتی‌باکتریال و ضد عفونی‌کنندگی داشته و جهت درمان درد معده و نفخ به‌کار می‌روند (Dastmalchi et al., 2007). این گیاه

سطح دریا اجرا گردید. قبل از انجام آزمایش ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی خاک محل آزمایش در دو عمق صفر تا ۳۰ سانتی‌متری و ۳۰ تا ۶۰ سانتی‌متری تعیین شد (جدول ۱). مقادیر نیتروژن خالص شامل صفر، ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰، ۲۰۰، ۲۵۰، ۳۰۰ و ۳۵۰ کیلوگرم در هکتار بود. قابل ذکر است که با توجه میزان آزادسازی نیتروژن از ماده آلی خاک (جدول ۱) به میزان ۱۲/۶۹ کیلوگرم در هکتار، در بخش تحلیل داده‌ها و جداول و شکلها، این مقدار نیز به مقادیر کاربرد نیتروژن که به صورت نهاده خارجی به کرت‌های مربوطه اعمال شدند؛ لحاظ گردیده است. از فرم اوره برای تأمین نیتروژن استفاده شد. اعمال هر سطح نیتروژن به صورت سرک و در سه مرحله ساقه‌دهی، شروع گلدهی و گلدهی به ترتیب ۲۵، ۵۰ و ۲۵ درصد کل نیتروژن صورت گرفت.

مراحل آماده‌سازی زمین با اجرای عملیات شخم، دیسک‌زنی برای خردکردن کلوخه‌ها، تسطیح و ایجاد جوی و پشته توسط فاروئر قبل از کشت در اسفندماه ۱۳۹۶ و فروردین‌ماه ۱۳۹۷ انجام شد. کشت به صورت نشاء بود. برای این منظور بذره‌های زیرین گیاه آکوتیپ فریدونشهر سه ماه قبل از انتقال نشاء به مزرعه خریداری شده و در گلخانه دانشکده کشاورزی دانشگاه تربیت مدرس به تعداد کافی در محیط ۸۰ درصد کوکوپیت و ۲۰ درصد پیت ماس کاشته شدند. طول هر واحد آزمایشی ۳ متر و با عرض ۲ متر با فاصله بین ردیف ۵۰ سانتی‌متر و فاصله روی ردیف‌ها ۲۵ سانتی‌متر در نظر گرفته شد. کشت نشاء در اردیبهشت‌ماه سال ۱۳۹۷ در مزرعه صورت گرفت. به منظور جلوگیری از تداخل تیمارهای آزمایشی و سایر مراحل اجرای آزمایش فاصله‌ای به اندازه ۱/۵ متر بین بلوک‌ها و یک متر بین کرت‌ها، لحاظ گردید. آبیاری به صورت قطره‌ای و با استفاده از نوارهای آبیاری انجام گرفت. مبارزه با علف‌های هرز با دست در طول فصل زراعی انجام پذیرفت.

دارویی بابونه (*Matricaria chamomilla*) در سطح ۵۰ کیلوگرم در هکتار کود نیتروژن به دست آمد (Zeinali et al., 2014). کاربرد ۱۸۰ کیلوگرم نیتروژن در هکتار سبب افزایش قابل توجه عملکرد غده سیب زمینی شد (Kotodziejczyk, 2014) و کود نیتروژن با ۱۵۰ کیلوگرم در هکتار در گل ختمی (*Althaea officinalis*) به عنوان سطح کودی برتر انتخاب گردید (Meyghan & Moradi., 2018).

برای گذر از کشاورزی رایج به کشاورزی پایدار، اولین گام افزایش کارایی عملیات رایج به منظور استفاده از نهاده‌های پرهزینه، کمیاب یا نهاده‌هایی که خسارت زیست محیطی دارند، می‌باشد (Gliessman & Rosemeyer, 2010). هدف اصلی در این مرحله استفاده از نهاده‌هایی با کارایی بالاتر می‌باشد و با بهبود کارایی استفاده از نهاده‌ها، مقدار استفاده از آن و به تبع آن اثرات منفی آن‌ها بر محیط زیست کاهش خواهد یافت (Koocheki et al., 2017). روش‌های مختلفی برای بهبود و افزایش کارایی استفاده از نهاده‌های مختلف کشاورزی ارائه شده است که می‌توان به تراکم و فواصل مطلوب محصولات زراعی، استفاده از ماشین‌آلات مناسب، آگاهی از آفات برای استفاده کارآمد از آفت‌کش‌ها، زمان و نحوه صحیح مصرف و تعیین مقدار کودهای شیمیایی مورد نیاز گیاهان و ... اشاره نمود (Gliessman & Rosemeyer, 2010). این پژوهش با هدف تعیین نیاز کودی نیتروژن زین گیاه به مرحله اجرا درآمد.

مواد و روش‌ها

این پژوهش به صورت مزرعه‌ای در قالب بلوک‌های کامل تصادفی در سه تکرار در سال زراعی ۱۳۹۷ در مزرعه پژوهشی دانشکده کشاورزی دانشگاه تربیت مدرس واقع در ۱۷ کیلومتری غرب تهران با مختصات جغرافیایی ۳۵ درجه و ۵۵ دقیقه عرض شمالی و ۵۱ درجه و ۱۵ دقیقه طول شرقی با ارتفاع ۱۳۵۳ متر از

جدول ۱. خصوصیات فیزیکوشیمیایی خاک مزرعه

Table 1. Farm soil physicochemical properties

Depth of soil	Clay (%)	Silt (%)	Sand (%)	soil texture	pH	EC (dSm ⁻¹)	N (%)	P (mgkg ⁻¹)	K (mgkg ⁻¹)	Organic carbon (%)	Organic matter (%)
0-30	5	24	82	loam sandy	7.91	0.97	0.063	29.4	440	0.68	1.77
30-60	5	24	82	loam sandy	7.95	1.63	0.044	45.9	407	0.41	0.51

طبق روابط (۲)، (۳) و (۴) بر حسب میلی‌گرم بر گرم وزن تر برگ به دست آمد:

$$\text{Chlorophyll a} = (19.3 \times A_{663} - 0.86 \times A_{645})V/100W \quad (2)$$

$$\text{Chlorophyll b} = (19.3 \times A_{645} - 3.6 \times A_{663})V/100W \quad (3)$$

$$\text{Total Chlorophyll} = \text{Chlorophyll a} + \text{Chlorophyll b} \quad (4)$$

میزان فلاونوئید کل بر طبق روش Krizek *et al.* (1993) میزان ۰/۲ گرم بافت گیاهی با سه میلی‌لیتر اتانول اسید (که شامل اتانول و استیک اسید به نسبت ۹۹ به یک است) ساییده و سپس سانتریفیوژ شد. سپس محلول روئی به مدت ۱۰ دقیقه در حمام آب گرم با دمای °C ۸۰ قرار گرفت و پس از سرد شدن توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر در سه طول موج ۲۷۰، ۳۰۰ و ۳۳۰ نانومتر خوانده شد. برای محاسبه غلظت فلاونوئید کل، غلظت فلاونوئید در هر سه طول موج با رابطه (۵) بر اساس میکرو مول بر گرم وزن تر برگ محاسبه و در نهایت از جمع کردن غلظت‌ها در سه طول موج، غلظت فلاونوئید کل برآورده شد:

$$C = \frac{A}{\epsilon \times L} \times \frac{1000}{gF.W} \quad (5)$$

A = میزان جذب در طول موج‌های مختلف، L = عرض کووت (یک سانتی‌متر)، ϵ = ضریب خاموشی ($\text{cm}^{-1} \text{mol}^{-1}$)، C = غلظت فلاونوئید، $gF.W$ = وزن تر برگ استفاده شده (۰/۲ گرم)

میزان آنتوسیانین طبق روش Krizek *et al.* (1993) اندازه‌گیری شد. طبق این روش مقدار ۰/۲ گرم از برگ تر را برداشته و در سه میلی‌لیتر متانول اسیدی که شامل متانول و کلریدریک اسید به نسبت ۹۹ به یک است؛ به‌طور کامل ساییده شد، سپس عصاره‌ی حاصل سانتریفیوژ شده و محلول رویی به مدت یک شب در تاریکی قرار گرفت. میزان جذب در ۵۵۰ نانومتر خوانده شد. غلظت آنتوسیانین طبق رابطه (۶) بر اساس میکرو مول بر گرم وزن تر برگ محاسبه شد:

$$Cd = \frac{A}{\epsilon \times L} \times \frac{1000}{gF.W} \quad (6)$$

به‌منظور بررسی علمی تأثیر تیمارهای اعمال شده، برداشت نهایی در گلدهی کامل انجام گرفت. بدین منظور بوته‌ها از فاصله پنج سانتی‌متری سطح خاک کف‌بر شده و جهت اندازه‌گیری صفات مورد بررسی به آزمایشگاه انتقال داده شدند. بعد از برداشت، عملکرد تر اندام‌های هوایی و ارتفاع گیاه اندازه‌گیری شد. برای استخراج اسانس و محاسبه درصد و عملکرد اسانس، نمونه‌ها پس از برداشت در هوای آزاد، سایه خشک شدند. میزان اسانس گیاه به روش تقطیر با آب و با استفاده دستگاه کلونجر به مدت سه ساعت (Najafpour Navei & Mirza, 2007; Golparvar *et al.*, 2016) اندازه‌گیری و در نهایت عملکرد اسانس محاسبه گردد.

به منظور تعیین محتوی آب نسبی برگ پنج تکه از برگ به مساحت یک سانتی‌متر مربع تهیه و بلافاصله وزن آن‌ها توزین شدند (وزن تر برگ). سپس تکه‌های برگ در پتری دیش‌های درب‌دار داخل آب مقطر در دمای اتاق و نور کم به مدت ۲۴ ساعت قرار داده شدند. پس از این مدت تکه‌های برگ از آب مقطر خارج و سطح آن‌ها به آرامی با دستمال کاغذی خشک و سریعاً وزن تورژسانس آن‌ها با ترازوی AND HR 200i با دقت ۰/۰۰۱ گرم تعیین گردید (وزن آماس برگ). سپس تکه‌های برگ به مدت ۲۴ ساعت در داخل آون ۷۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند و در نهایت وزن خشک آن‌ها تعیین شد (وزن خشک برگ) و با استفاده از رابطه (۱) میزان محتوی نسبی آب برگ (RWC) براساس درصد محاسبه گردید (Ritchie *et al.*, 1990):

$$RWC = \frac{W_F - W_D}{W_T - W_D} \times 100 \quad (1)$$

RWC = درصد محتوی نسبی آب برگ، W_F = وزن تر برگ، W_D = وزن خشک برگ، W_T = وزن آماس برگ. اندازه‌گیری میزان کلروفیل a و b به روش Hiscox & Israelstam (1979) انجام گرفت. بدین منظور مقدار ۰/۵ گرم از ماده تر گیاهی را در ۱۰ میلی‌لیتر در دی‌متیل‌سولفوکساید (DMSO) ریخته و به مدت یک ساعت درون حمام بن‌ماری ۷۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. مقدار جذب عصاره حاصل با دستگاه اسپکتروفوتومتر در طول موج‌های ۶۴۳ و ۶۴۵ قرائت شد و میزان کلروفیل a، b و کلروفیل کل به‌ترتیب

نرم افزار Excel استفاده شد و همچنین مقایسه میانگین‌های صفات مورد بررسی به روش آزمون LSD (Least Significant Difference) انجام گرفت.

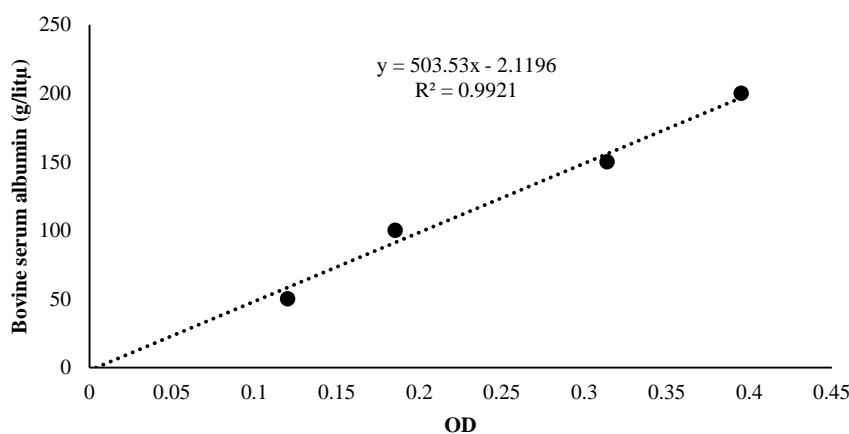
نتایج و بحث

نتایج تجزیه واریانس ارتفاع بوته نشان داد که مقادیر مختلف نیتروژن در سطح یک درصد معنی‌دار است (جدول ۲). با بررسی تیمار مذکور روی ارتفاع بوته زربین گیاه مشاهده شد که ۱۳۲/۶ کیلوگرم در هکتار نیتروژن بیش‌ترین ارتفاع را داشت (شکل ۲). افزایش ارتفاع به علت تأثیر نیتروژن روی رشد طولی سلول‌ها و به ویژه میانگره‌های ساقه می‌باشد که باعث افزایش سرعت تقسیم سلولی و رشد در سلول‌های ساقه گردیده و در نتیجه ارتفاع بوته افزایش پیدا می‌کند. نتایج این پژوهش نشان داد که رابطه بین افزایش سطوح نیتروژن با ارتفاع از رابطه درجه سه تبعیت می‌کند (شکل ۱)، لذا تا یک حد معینی افزایش نیتروژن سبب افزایش ارتفاع شد. افزایش ارتفاع گیاه به نوبه خود سبب افزایش تولید بیوماس کل بوته می‌شود (با توجه به همبستگی بین این دو صفت) که در نهایت تأثیر مستقیمی روی عملکرد اسانس می‌گذارد. پژوهشگران مشاهده کردند که کاربرد سطوح مختلف کود نیتروژنه (اوره) افزایش معنی‌داری را در ارتفاع بوته روناس داشته است (Baghalian *et al.*, 2010).

$A =$ میزان جذب در طول ۵۵۰ نانومتر، $L =$ عرض کووت (یک سانتی‌متر)، $\varepsilon =$ ضریب خاموشی ($\text{mol}^{-2} \text{cm}^{-1}$)، $C =$ غلظت آنتوسیانین، $gF.W =$ وزن تر برگ استفاده شده (۰/۲ گرم).

برای اندازه‌گیری پروتئین کل برگ، به ۰/۵ گرم از بافت تازه برگ پودر شده با نیتروژن مایع، چهار میلی‌لیتر بافر فسفات استخراج شامل ۵۰ میلی‌مولار بافر فسفات پتاسیم (pH=۷/۸)، یک درصد PVP (وزنی به حجمی) و ۰/۱ میلی‌مولار EDTA اضافه شد و به مدت ۲۰ دقیقه با سرعت ۱۵۰۰۰g در دمای چهار درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شد (Jiang *et al.*, 2016). از عصاره حاصل (محلول رویی) برای اندازه‌گیری پروتئین کل برگ استفاده شد. برای اندازه‌گیری پروتئین برگ از روش برادفورد (Bradford, 1979) استفاده گردید. ۱۲۰ میکرولیتر از عصاره حاصل با سه میلی‌لیتر محلول برادفورد مخلوط شد و بعد از ۲۰ دقیقه واکنش، میزان جذب در طول موج ۵۹۵ نانومتر با دستگاه اسپکتروفوتومتر قرائت شد. با قرار دادن اعداد قرائت شده در منحنی استاندارد میزان پروتئین بر حسب میکروگرم در لیتر محاسبه گردید. منحنی استاندارد در غلظت‌های مختلف با استفاده از آلبومین گاوی ترسیم شد (شکل ۱).

برای تجزیه و تحلیل داده‌ها مطابق روش تجزیه واریانس از برنامه آماری SAS (Statistical Analysis System) استفاده شد و برای ترسیم شکل‌ها از



شکل ۱. منحنی استاندارد پروتئین کل برگ (OD = عدد قرائت شده با اسپکتروفوتومتر)
Figure 1. Standard curve of total leaf protein (OD = Optimal optical density)

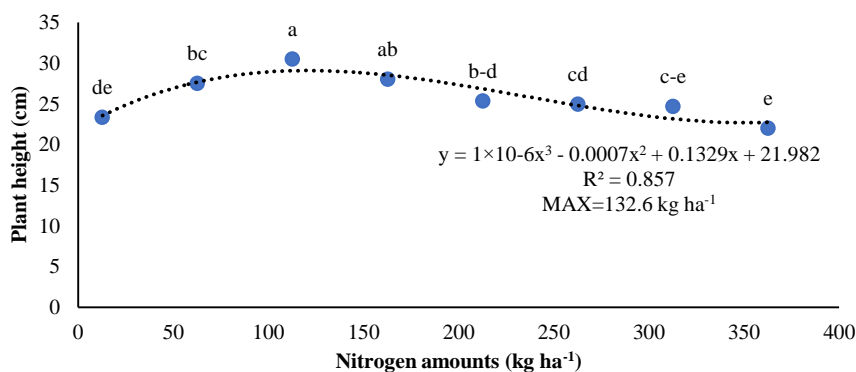
جدول ۳. نتایج تجزیه واریانس اثر نیتروژن بر برخی صفات زیرین گیاه

Table 3. Results of variance analysis effect of nitrogen on some traits of *D. kotschy*

Source of variation	df	Mean Squares				
		Height	Total fresh weight	Stem fresh weight	Leaf fresh weight	RWC
Block	2	3.38ns	517760ns	220027ns	104585ns	80.3ns
Nitrogen	7	22.49**	929807**	321973**	190338*	423.4**
Error	14	2.82	179631	58271	53753	76
CV (%)		7	18	20	19	12

ns, *, **: به ترتیب نبود تفاوت معنی‌دار و تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال پنج و یک درصد.

ns, *, **: Non-significant and significantly differences at 5% and 1% of probability level, respectively.



شکل ۲. مقایسه میانگین اثر نیتروژن بر ارتفاع بوته زیرین گیاه

Figure 2. Mean comparison effect of nitrogen on plant height of *D. kotschy*

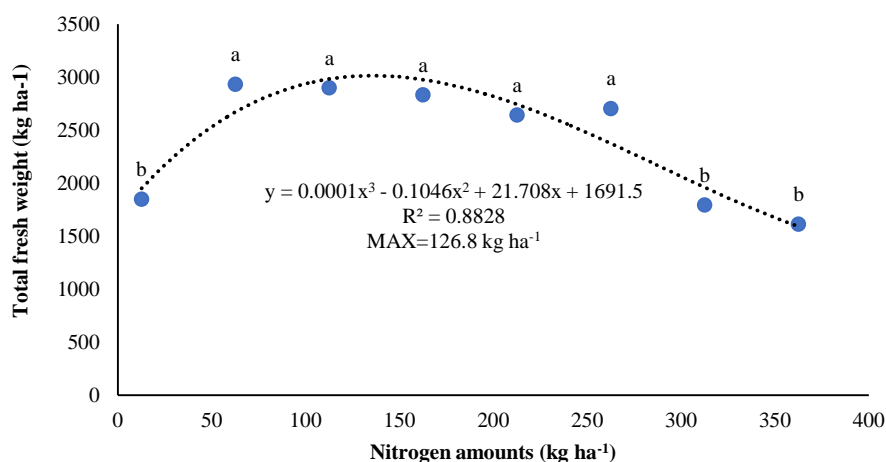
(جدول ۶). نیتروژن با فراهم نمودن شرایط مناسب برای رشد مواد فتوسنتزی را افزایش داده و در نتیجه با کاربرد آن سبب افزایش بیوماس کل، برگ و ساقه را شد ولی در مقادیر بالاتر کاربرد نیتروژن، این عنصر ضروری به حالت سمیت در گیاه تبدیل می‌شود و نه تنها باعث افزایش تولید بیوماس نشد بلکه نسبت به کاربرد سطوح مناسب پایین‌تر کاهش تولید مشاهده شد. مطالعات نشان دادند که گیاهان تا یک آستانه مشخص نیازمند کود می‌باشند و چنانچه روند افزایش کود ادامه یابد، در ابتدا روند افزایش عملکرد ثابت شده و با تکرار این روند، عملکرد کاهش می‌یابد (Abbas & Zadeh, 2005). لذا این گیاه تا یک حدی به کاربرد نیتروژن جواب مثبت می‌دهد. این نتایج با نتایج گل محمدی (2007) *Daneshkhan et al.* و علی‌چلی (2008) *Alijani & Amini* نیز نشان دادند که افزایش میزان مقادیر کاربرد کود نیتروژن دار باعث افزایش وزن تر گل بابونه گردید. Zhao (2006) اثر نیتروژن بر افزایش وزن خشک گیاه را به شرکت این عنصر در ساختار مولکول‌های بزرگ نظیر پروتئین‌ها، اسیدهای آمینه و اسیدهای نوکلئیک نسبت داد. *Saiedi-Gragani et al.*

جدول تجزیه واریانس نشان‌دهنده معنی‌دار بودن تیمارهای مورد بررسی روی وزن تر کل ($P \leq 0.01$)، ساقه ($P \leq 0.01$) و برگ ($P \leq 0.05$) می‌باشد (جدول ۲). رگرسیون حاصل از بررسی سطوح مختلف کاربرد نیتروژن روی وزن تر کل نشان داد که بیش‌ترین تولید بیوماس کل از کاربرد ۱۲۶/۸ کیلوگرم در هکتار نیتروژن به‌دست آمد (شکل ۳). مقایسه میانگین تیمارهای مورد بررسی نشان دادند که سطح کودی ۱۱۲/۶۹ کیلوگرم در هکتار و ۱۶۲/۶۹ کیلوگرم در هکتار به‌ترتیب بیش‌ترین وزن تر ساقه و برگ را به خود اختصاص دادند اما با سطوح کودی ۶۲/۶۹ الی ۲۶۲/۶۹ کیلوگرم در هکتار از نظر آماری اختلاف معنی‌داری را نداشتند (جدول ۳). در این پژوهش ثابت شد که ارتفاع با وزن تر برگ ($r = 0.83^{**}$)، وزن تر ساقه ($r = 0.78^{**}$) و وزن تر کل بوته ($r = 0.83^{**}$) همبستگی مثبت معنی‌داری داشتند (جدول ۶). همچنین وزن تر برگ با وزن تر ساقه ($r = 0.84^{**}$) در سطح احتمال یک درصد همبستگی مثبت و معنی‌داری داشتند (جدول ۶). جدول همبستگی صفات نشان داد که وزن تر کل بوته با وزن تر برگ همبستگی ($r = 0.95^{**}$) مثبت معنی‌داری را نشان داد

مختلف نیتروژن روی محتوی نسبی آب برگ در زرین گیاه تأثیر معنی داری در سطح احتمال یک درصد دارد (جدول ۲). با بررسی جدول مقایسه میانگین تیمارها مشاهده شد که سطح کودی ۱۱۲/۶۹ کیلوگرم در هکتار بیشترین محتوی نسبی آب برگ (۸۶/۳ درصد) را داشت (جدول ۳). کاربرد مقادیر بالاتر نیتروژن (بیشتر از ۱۶۲/۶۹ کیلوگرم در هکتار) سبب کاهش معنی دار محتوی نسبی آب برگ شد (جدول ۳) که نشان می‌دهد در صورت بیش بود نیتروژن، به طور مستقیم بر محتوی نسبی آب برگ تأثیر منفی داشته و این موضوع به نوبه خود سبب بستن روزنه‌ها و در نهایت منجر به کاهش رشد می‌شود، به طوری که کاربرد مقادیر بالای نیتروژن در نهایت بیوماس پایین تری را در میان آزمایش تولید نمودند.

(2014) در واکنش به گیاه جعفری به مقادیر صفر، ۱۰۰، ۱۲۰ و ۱۵۰ کیلوگرم در هکتار گزارش کردند که بیشترین وزن خشک بوته با کاربرد ۱۵۰ کیلوگرم نیتروژن در هکتار به دست آمد. بررسی تأثیر کود نیتروژن منجر به افزایش وزن خشک گیاه بابونه و تحریک رشد رویشی این گیاه شد (Omid beigi & Hassani, 2009; Malayeri, 2007; Rahmati et al., 2009).

محتوی نسبی آب برگ گیاه شاخص مناسبی برای بیان وضعیت آب در گیاه می‌باشد و وضعیت تعادل آب نسبی برگ و میزان تعرق را نشان می‌دهد. چنانچه میزان محتوی نسبی آب برگ در گیاه بالا باشد نشان‌دهنده این موضوع است که گیاه تورم سلولی خود را حفظ کرده رشد و نمو در آن تداوم دارد. جدول تجزیه واریانس نشان داد که کاربرد مقادیر



شکل ۳. مقایسه میانگین اثر نیتروژن بر وزن تر کل زرین گیاه.

Figure 3. Mean comparison effect of nitrogen on total fresh weight of *D. kotschy*.

جدول ۳. مقایسه میانگین اثر نیتروژن بر محتوی نسبی آب، پروتئین کل، وزن تر برگ و ساقه زرین گیاه

Table 3. Mean comparison effect of nitrogen on relative water content (RWC), total protein, fresh weight of leaf and stem of *D. kotschy*

Nitrogen levels (kg ha ⁻¹)	Stem fresh weight (kg ha ⁻¹)	Leaf fresh weight (kg ha ⁻¹)	RWC (%)	Leaf total protein (μg ml ⁻¹)
N ₀ (12.69)	845b	1000bc	83.1ab	500c
N ₅₀ (62.69)	1423a	1500a	79.2a-c	708a
N ₁₀₀ (112.69)	1543a	1356ab	86.3a	556bc
N ₁₅₀ (162.69)	1327a	1504a	78.8a-c	656ab
N ₂₀₀ (212.69)	1453a	1188a-c	68.2cd	712a
N ₂₅₀ (262.69)	1457a	1245a-c	55.3d	650ab
N ₃₀₀ (312.69)	855b	936c	67.0cd	620a-c
N ₃₅₀ (362.69)	765b	845c	56.4d	700a

میانگین‌هایی با حروف مشترک در هر ستون تفاوت معنی داری در سطح احتمال یک درصد برای وزن تر ساقه، محتوی نسبی آب برگ و پروتئین برگ و در سطح احتمال پنج درصد برای وزن تر برگ ندارند.

Means with the same in each column are not significantly different at 1% probability level for stem fresh weight, RWC and leaf total protein and at 5% for leaf fresh weight.

در مسیر Shikimate با کمبود نیتروژن فعال شده و سنتز فلاونوئیدها را افزایش می‌دهند (Scheible *et al.*, 2004). افزایش نیتروژن نیز با افزایش سنتز پروتئین‌ها و اسیدهای آمینه محلول باعث کاهش سنتز فلاونوئیدها می‌شوند (Dahui *et al.*, 2010). در پژوهشی دیگر محققین گزارش کردند کاربرد مقادیر بالای نیتروژن باعث کاهش مقدار فلاونوئید کل در گیاه دارویی *Chrysanthemum morifolium* گردید به طوری که، مقادیر بالای نیتروژن غلظت فلاونوئید را ۱۸-۳۵ درصد کاهش داد (Dahui *et al.*, 2010). همچنین محققین گزارش کردند، کاربرد مقادیر بالای نیتروژن و دمای پایین غلظت آنتوسیانین را در گیاه *Clematis pitcheri* افزایش می‌دهد (Kawa-Miszczak *et al.*, 2009). در پژوهشی دیگر محققین نشان دادند، کاربرد پتاسیم و نیتروژن میزان آنتوسیانین را در انگور افزایش داد. این محققین اذعان کردند، یک رابطه مستقیم بین افزایش کاربرد پتاسیم و جذب نیتروژن وجود دارد. همچنین مقدار مطلوب نیتروژن میزان آنتوسیانین انگور را در این تحقیق افزایش داد (Kavacik *et al.*, 2007).

مقادیر مختلف کود نیتروژن اثر معنی‌داری روی درصد و عملکرد اسانس در سطح احتمال یک درصد گذاشت (جدول ۴). مقایسه میانگین تیمارها نشان داد که مقدار کودی ۱۶۲/۶۹ کیلوگرم در هکتار با ۱/۸۶ درصد اسانس، بالاترین درصد اسانس را داشت ولی از لحاظ آماری با مقادیر ۶۲/۶۹ و ۱۱۲/۶۹ کیلوگرم نیتروژن در هکتار به ترتیب با ۱/۶۱ و ۱/۶۲ درصد اسانس تفاوت معنی‌داری را نشان نداد (شکل ۴).

جدول تجزیه واریانس نشان داد که سطوح مختلف نیتروژن روی پروتئین کل برگ تأثیر معنی‌داری گذاشت (جدول ۴). بیش‌ترین مقدار پروتئین کل برگ با کاربرد ۲۱۲/۶۹ کیلوگرم نیتروژن در هکتار به دست آمد، ولی با مقادیر نیتروژن ۶۲/۶۹، ۱۶۲/۶۹ الی ۳۶۲/۶۹ کیلوگرم در هکتار اختلاف معنی‌داری نداشت (جدول ۳). کمترین میزان پروتئین برگ مربوط به عدم کاربرد خارجی کود به همراه مقادیر ۱۱۲/۶۹ و ۳۱۲/۶۹ کیلوگرم نیتروژن در هکتار بود (جدول ۳).

طبق جدول تجزیه واریانس کاربرد مقادیر مختلف کود نیتروژن اثر معنی‌داری بر میزان آنتوسیانین در سطح احتمال یک درصد داشت (جدول ۴). با بررسی مقایسه میانگین تیمارها مشاهده شد که مقدار ۲۶۲/۶۹ کیلوگرم نیتروژن در هکتار با ۶۱ نانومول در گرم تر برگ آنتوسیانین، بیشتر از سایر تیمارها بود (جدول ۵). مقادیر مختلف نیتروژن اثر معنی‌داری روی فلاونوئید کل در سطح احتمال یک درصد گذاشت (جدول ۴). مقایسه میانگین مقادیر مختلف نیتروژن نشان داد که کاربرد ۱۱۲/۶۹ کیلوگرم در هکتار نیتروژن بیش‌ترین فلاونوئید کل را داشت ولی با مقادیر ۶۲/۶۹، ۲۱۲/۶۹، ۳۱۲/۶۹ و ۳۶۲/۶۹ کیلوگرم نیتروژن در هکتار از لحاظ آماری تفاوت معنی‌داری نداشت (جدول ۵). میزان فلاونوئیدها در گونه‌های مختلف گیاهی با مرحله رشد، بافت، وارپته، تش‌های محیطی مانند؛ اشعه ماورای بنفش، خشکی، شرایط خاک، شخم، آفات و بیماری‌ها و کاربرد کودها مرتبط می‌باشد (Dixon & Ravia, 1995). فلاونوئیدها متابولیت‌های ثانویه‌ای هستند که در مسیر چرخه Shikimate در گیاهان ساخته می‌شوند. بعضی از ژن‌ها

جدول ۴. نتایج تجزیه واریانس اثر نیتروژن بر برخی صفات کیفی زیرین گیاه

Table 4. Results of variance analysis effect of nitrogen on some qualitative traits of *D. kotschy*

Source of variation	df	Mean Squares							
		Leaf total protein	Essential oil percentage	Essential oil yield	Anthocyanin	Total flavonoid	Chlorophyll a	Chlorophyll b	Total chlorophyll
Block	2	40706ns	0.029ns	0.47ns	0.00002ns	0.011ns	0.42ns	0.009ns	0.44ns
Nitrogen	7	17500**	0.180**	13.93**	0.00024**	1.019**	5.58**	0.158*	7.28**
Error	14	5458	0.029	0.31	0.00005	0.036	0.15	0.056	0.33
CV (%)		12	12	9	17	3	4	15	5

ns, *, **: Non-significant and significant differences at 5 and 1% of probability level, respectively.

ns, *, **: Non-significant and significant differences at 5 and 1% of probability level, respectively.

جدول ۵. مقایسه میانگین اثر نیتروژن بر صفات بیوشیمیایی زرین گیاه

Table 5. Mean comparison effect of nitrogen on biochemical traits of *D. kotschyi*

Nitrogen levels (kg ha ⁻¹)	Chlorophyll a (mg/gF.W)	Chlorophyll b (mg/gF.W)	Total chlorophyll (mg/gF.W)	Anthocyanin (μmol/gF.W)	Total flavonoid (μmol/gF.W)
N ₀ (12.69)	8.8e	1.3bc	10.1d	0.036bc	6.15c
N ₅₀ (62.69)	9.9c	1.7ab	11.6b	0.040bc	7.46ab
N ₁₀₀ (112.69)	11.8a	1.7a	13.6a	0.043bc	7.69a
N ₁₅₀ (162.69)	9.0de	1.5a-c	10.5cd	0.041bc	7.22b
N ₂₀₀ (212.69)	9.6cd	1.5a-c	10.5cd	0.041bc	7.22b
N ₂₅₀ (262.69)	9.0de	1.3bc	10.4cd	0.061a	6.44c
N ₃₀₀ (312.69)	7.4f	1.3c	8.7e	0.046b	7.64a
N ₃₅₀ (362.69)	11.0b	1.8a	12.8a	0.032c	7.57a

میانگین‌هایی با حروف مشترک در هر ستون تفاوت معنی‌داری در سطح احتمال یک درصد برای کلروفیل a، کلروفیل کل، آنتوسیانین و فلاونوئید کل و در سطح احتمال پنج درصد برای کلروفیل b ندارند.

Means with the same in each column are not significantly different at 1% probability level for Chlorophyll a, total chlorophyll, anthocyanin and total flavonoid and at 5% for chlorophyll b.

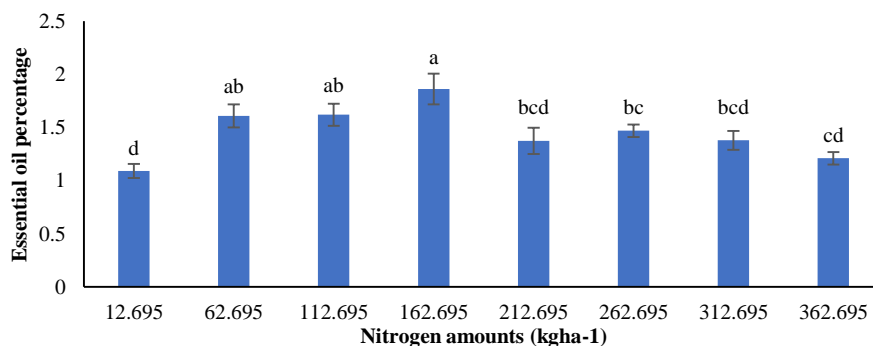
کیلوگرم در هکتار) ۲/۷۸ برابر تولید بیش‌تری خواهد داشت (شکل ۵). در همین راستا در بررسی نعنای فلفلی مشخص شد که کاربرد ۱۵۰ کیلوگرم نیتروژن در هکتار بیش‌ترین عملکرد به‌دست آمد (Golder & Vangelder, 1998). و هر سال اضافه کردن ۹۰ تا ۱۲۰ کیلوگرم نیتروژن در هکتار برای مزارع نعنای (Omidbaigi, 1997b) و ۱۰۰ تا ۱۵۰ کیلوگرم نیتروژن در هکتار برای ریحان (Omidbaigi, 1997b) توصیه می‌شود. در این بررسی مشخص شد که عملکرد اسانس با ارتفاع (** $t=0/86$), وزن تر کل بوته (** $t=0/95$), وزن تر برگ (** $t=0/93$), وزن تر ساقه (** $t=90$) و درصد اسانس (** $t=0/91$) همبستگی مثبت و معنی‌داری دارد (جدول ۶). عملکرد اسانس با میزان درصد اسانس و بیوماس کل در زرین گیاه همبستگی مثبت دارد لذا تولید عملکرد اسانس بالا بستگی به درصد اسانس مطلوب و بیوماس کل زیاد دارد. نیتروژن با اثر بر تولید مواد فتوسنتزی، سبب افزایش بیوماس کل در مقادیر کودی متوسط (۶۲/۶۹ تا ۲۶۲/۶۹ کیلوگرم در هکتار نیتروژن) شد و از طرفی درصد اسانس در مقادیر کودی ۶۲/۶۹ الی ۱۶۲/۶۹ به‌دست آمد. با این‌حال بیش‌ترین اسانس با ۹/۰۸ کیلوگرم در هکتار از کاربرد ۱۲۶/۵ کیلوگرم نیتروژن در هکتار حاصل شد. (Azizi et al., 2009) با بررسی افزایش سطوح نیتروژن روی درمنه نشان دادند که عملکرد ماده خشک بالا رفت، ولی درصد اسانس به طور معنی‌داری کاهش یافت. در پژوهشی روی درمنه Ozgüven et al. (۲۰۰۸) نشان دادند که افزایش

جدول همبستگی صفات مورد بررسی نشان داد که درصد اسانس با ارتفاع (** $t=0/82$), و وزن تر کل بوته (** $t=0/80$) همبستگی مثبت در سطح احتمال پنج درصد داشته و با وزن تر برگ (** $t=0/87$) همبستگی مثبت در سطح احتمال یک درصد دارد (جدول ۶). رگرسیون حاصل از مقایسه میانگین تیمارهای مورد بررسی نشان داد که بیش‌ترین عملکرد اسانس که عملکرد اقتصادی در تولید گیاهان دارویی به شمار می‌آید؛ از ۱۲۶/۵ کیلوگرم در هکتار نیتروژن حاصل شد (شکل ۵). عملکرد اسانس وابسته به بیوماس کل و درصد اسانس می‌باشد. بررسی این دو صفت نشان داد که کاربرد نیتروژن تا یک حدی سبب افزایش آن‌ها شد و لذا عملکرد اسانس نیز از این قاعده مستثنی نیست. در بررسی مرزنجوش وحشی نیز مشاهده شد که با کاربرد بالای نیتروژن، درصد اسانس کاهش یافت (Azizi et al., 2009). نیتروژن زیاد به علت افزایش اندازه سلول‌های حاوی اسانس و کاهش غلظت اسانس در اندام‌های گیاهی باعث کاهش درصد اسانس در سطوح بالاتر نیتروژن می‌شود (Azizi et al., 2009). همچنین کاربرد نیتروژن بالاتر از نیاز مناسب گیاه با تأثیر در تولید عملکرد بیولوژیک مانع از تولید متابولیت‌های ثانویه در گیاه شده و در نتیجه درصد اسانس در سطوح بالاتر کاهش پیدا می‌کند (Kheirandish et al., 2016). با کاربرد ۱۲۶/۵ کیلوگرم نیتروژن در هکتار میزان اسانس به حداکثر ۹/۰۸ کیلوگرم در هکتار اسانس خواهد رسید که نسبت به شرایط بدون کاربرد کود نیتروژن (۱۲/۶۹

سبب افزایش تعداد شاخه‌های فرعی و در نتیجه افزایش عملکرد گل بابونه شد (Akbari Niya *et al.*, 2003).

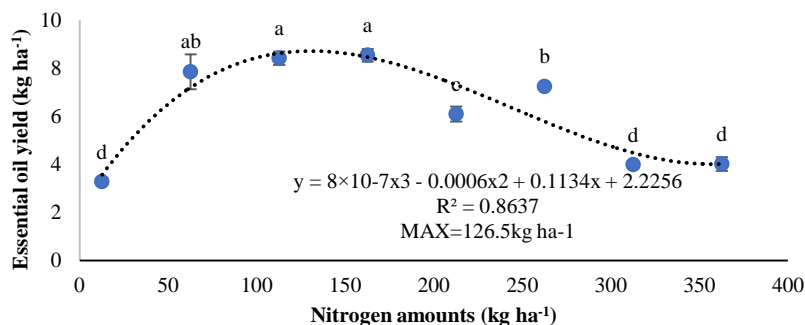
نتایج تجزیه واریانس نشان داد که مقادیر مختلف کود نیتروژن در سطح احتمال یک درصد روی کلروفیل a و کلروفیل کل و در سطح احتمال پنج درصد روی کلروفیل b معنی‌دار شدند (جدول ۴). جدول مقایسه میانگین تیمارهای مورد بررسی نشان داد که بیش‌ترین کلروفیل a (۱۱/۸ میلی‌گرم در گرم وزن تر برگ) و کلروفیل کل (۱۳/۶ میلی‌گرم در گرم وزن تر برگ) از کاربرد ۱۱۲/۶۹ نیتروژن به‌دست آمد، ولی بیش‌ترین کلروفیل b (۱/۸ میلی‌گرم در گرم وزن تر برگ) در مقدار ۳۶۲/۶۹ کیلوگرم نیتروژن در هکتار مشاهده شد که کاربرد مقادیر ۶۲/۶۹ تا ۲۱۲/۶۹ کیلوگرم در هکتار از لحاظ آماری اختلاف معنی‌داری نداشتند و در یک گروه آماری قرار گرفتند (جدول ۵). نتایج حاصل از همبستگی نشان داد که کلروفیل a با کلروفیل b ($r=0.84^{**}$) همبستگی مثبت معنی‌داری در سطح احتمال یک درصد دارد (جدول ۶).

سطح کودی نیتروژن محتوی اسانس را افزایش داد و بالاترین میزان اسانس از ۸۰ و ۱۲۰ کیلوگرم نیتروژن در هکتار مشاهده شد. بیش‌ترین مقدار اسانس در گل راعی با مصرف ۱۵۰ کیلوگرم در هکتار نیتروژن به‌دست آمد (Zadeh Esfahlan *et al.*, 2014). مصرف کود نیتروژن در گیاه دارویی گشنیز (*Coriandrum sativum*) نیز سبب افزایش درصد و عملکرد اسانس این گیاه شد زیرا میان افزایش مقادیر نیتروژن قابل دسترس و افزایش غلظت ترکیبات تشکیل‌دهنده گشنیز رابطه مستقیمی مشاهده گردید (Zheljazkov *et al.*, 2008). در حالی که افزایش مصرف کود نیتروژن به میزان ۱۵۰ کیلوگرم در هکتار تأثیر معنی‌داری بر رشد، عملکرد ماده خشک و اسانس گیاه دارویی بابونه در مقایسه با مصرف ۷۵ کیلوگرم در هکتار نداشت (Bagheri *et al.*, 2008). بررسی تأثیر کود اوره بر عملکرد دانه و اسانس دانه زنیان (*Trachyspermum ammi*) نشان داد مصرف کود شیمیایی عملکرد دانه زنیان را افزایش داد اما تأثیر بر درصد اسانس دانه نداشت. مصرف کود شیمیایی اوره



شکل ۴. مقایسه میانگین اثر نیتروژن بر درصد اسانس زیرین گیاه

Figure 4. Means comparison effect of nitrogen on essential oil percentage of *D. kotschyi*



شکل ۵. مقایسه میانگین اثر نیتروژن بر عملکرد اسانس زیرین گیاه.

Figure 5. Mean comparison effect of nitrogen on essential oil yield of *D. kotschyi*.

جدول ۶. ضرایب همبستگی بین صفات مورد بررسی زیرین گیاه تحت تأثیر مقادیر مختلف کود نیتروژن

Table 6. Correlation coefficients between studied traits of *D. kotschyi* under different levels of nitrogen fertilizer.

Traits	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M
Height (A)	1.00												
RWC (B)	0.65 ^{ns}	1.00											
Total fresh weight (C)	0.83 ^{**}	0.37 ^{ns}	1.00										
Leaf fresh weight (D)	0.83 [*]	0.50 ^{ns}	0.95 ^{**}	1.00									
stem fresh weight (E)	0.78 ^{**}	0.25 ^{ns}	0.97 ^{**}	0.84 ^{**}	1.00								
Leaf total protein (F)	-0.10 ^{ns}	-0.54 ^{ns}	0.21 ^{ns}	0.17 ^{ns}	0.23 ^{ns}	1.00							
Essential oil percentage (G)	0.82 [*]	0.31 ^{ns}	0.80 [*]	0.87 ^{**}	0.69 ^{ns}	0.27 ^{ns}	1.00						
Essential oil yield (H)	0.86 [*]	0.31 ^{ns}	0.95 ^{**}	0.93 ^{**}	0.90 [*]	0.25 ^{ns}	0.91 ^{**}	1.00					
Anthocyanin (I)	0.19 ^{ns}	-0.31 ^{ns}	0.33 ^{ns}	0.24 ^{ns}	0.37 ^{ns}	-0.09 ^{ns}	0.29 ^{ns}	0.34 ^{ns}	1.00				
Total flavonoid (J)	0.36 ^{ns}	0.03 ^{ns}	0.11 ^{ns}	0.08 ^{ns}	0.12 ^{ns}	0.47 ^{ns}	0.36 ^{ns}	0.23 ^{ns}	-0.33 ^{ns}	1.00			
Chlorophyll a (K)	0.35 ^{ns}	0.18 ^{ns}	0.28 ^{ns}	0.19 ^{ns}	0.32 ^{ns}	0.07 ^{ns}	0.11 ^{ns}	0.36 ^{ns}	-0.33 ^{ns}	0.35 ^{ns}	1.00		
Chlorophyll b (L)	0.21 ^{ns}	0.05 ^{ns}	0.21 ^{ns}	0.14 ^{ns}	0.24 ^{ns}	0.48 ^{ns}	0.12 ^{ns}	0.27 ^{ns}	-0.58 ^{ns}	0.63 ^{ns}	0.84 ^{**}	1.00	
Total Chlorophyll (M)	0.35 ^{ns}	0.16 ^{ns}	0.29 ^{ns}	0.21 ^{ns}	0.34 ^{ns}	0.13 ^{ns}	0.13 ^{ns}	0.37 ^{ns}	-0.34 ^{ns}	0.39 ^{ns}	0.99 ^{**}	0.87 ^{**}	1.00

ns, *, **: عدم همبستگی و همبستگی معنی دار در سطح احتمال پنج و یک درصد.

ns, *, **: No correlation, and a significant correlation in the level five and one percent, respectively.

همچنین کلروفیل کل با کلروفیل a ($r=0.99^{**}$) و کلروفیل b ($r=0.87^{**}$) همبستگی مثبت معنی داری دارد (جدول ۶). یکی از مهم ترین عوامل در حفظ ظرفیت فتوسنتزی در گیاهان زنده، میزان کلروفیل می باشد (Oliviera-Neto *et al.*, 2009). نیتروژن جزء ساختمانی اسیدهای آمینه، پروتئین ها، آنزیم ها، اسیدهای نوکلئیک، پلی پپتیدها و همچنین جزء اصلی مولکول کلروفیل می باشد (Neyra & Hagem, 1975). افزایش رادیکال های فعال، تولید ترکیب های فنولی، صدمه دیدن غشای کلروپلاست و اختلال در جذب نیتروژن خاک از مهم ترین عوامل کاهش دهنده غلظت کلروفیل است (Silva *et al.*, 2007). در تحقیق حاضر میزان کلروفیل در توزیع کود تا یک حد مشخصی افزایش پیدا کرد ولی با افزایش میزان نیتروژن، از میزان کلروفیل کاست. به خاطر این که هر مولکول کلروفیل دارای چهار اتم نیتروژن می باشد لذا در حالت سمیت این عنصر به ساختمان کلروفیل می تواند آسیب برساند بنابراین این مورد را می توان به حالت سمیت نیتروژن در گیاه نسبت داد.

همچنین کلروفیل کل با کلروفیل a ($r=0.99^{**}$) و کلروفیل b ($r=0.87^{**}$) همبستگی مثبت معنی داری دارد (جدول ۶). یکی از مهم ترین عوامل در حفظ ظرفیت فتوسنتزی در گیاهان زنده، میزان کلروفیل می باشد (Oliviera-Neto *et al.*, 2009). نیتروژن جزء ساختمانی اسیدهای آمینه، پروتئین ها، آنزیم ها، اسیدهای نوکلئیک، پلی پپتیدها و همچنین جزء اصلی مولکول کلروفیل می باشد (Neyra & Hagem, 1975). افزایش رادیکال های فعال، تولید ترکیب های فنولی، صدمه دیدن غشای کلروپلاست و اختلال در جذب نیتروژن خاک از مهم ترین عوامل کاهش دهنده غلظت کلروفیل است (Silva *et al.*, 2007). در تحقیق حاضر میزان کلروفیل در توزیع کود تا یک حد مشخصی افزایش پیدا کرد ولی با افزایش میزان نیتروژن، از میزان کلروفیل کاست. به خاطر این که هر مولکول کلروفیل دارای چهار اتم نیتروژن می باشد لذا در حالت سمیت این عنصر به ساختمان کلروفیل می تواند آسیب برساند بنابراین این مورد را می توان به حالت سمیت نیتروژن در گیاه نسبت داد.

نتیجه گیری کلی

با توجه به اهمیت تولید گیاهان دارویی و شناسایی این گیاهان با ارزش از اکوسیستم طبیعی، یکی از راه های افزایش عملکرد، تعیین عناصر غذایی مورد نیاز آنها می باشد تا علاوه بر افزایش عملکرد، بتوان کارهای به زراعی در بخش نیازهای غذایی انجام بگیرد. نتایج این پژوهش به عنوان اولین قدم در این فرآیند ثابت کرد که زرین گیاه به عنوان گیاه با ارزش و در حال انقراض برای تولید بیشترین عملکرد اسانس نیاز به ۱۲۶/۵ کیلوگرم نیتروژن در هکتار دارد.

REFERENCES

1. Abbas Zadeh, B. (2005). Nitrogen different levels effect and application methods on amount of essential oil in *Melissa officinalis* L. M.Sc. Thesis, Islamic Azad University, Karaj Branch. 127p. (in Farsi)
2. Abdi, A., (2008). Evaluation of red plant biodiversity in Markazi province. *Iranian Journal of Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetic Research*, 16 (1), 50-74. (In Farsi).
3. Afkari, A. (2018). Effects of drought stress and nitrogen fertilizer rate on some physiological characteristics, essential oil percentage, and yield of basil (*Ocimum basilicum* L.). *Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants*, 33 (6), 1047-1059. (in Farsi)
4. Akbari Niya, A., Ghalavand, A., Sefidkon, F., Rezaei, M. B. & Sharifi Ashorabadi, A., (2003). The effect of chemical fertilizers, manure and combination of yield and essential oil compounds Bishop. *Research and Development*, 61, 32-42.
5. Alijani, M. & Amini, M., (2008). Effect diferece level phosphate and nitrogen fertilizers on yield, yield components and essential oil of *German chamomile*. *Proceedings of the Crop Science Congress Sciences Breeding Plants*, 28-30 August, Karaj, Iran. (in Farsi)
6. Amini, M., Kafi, M. & Parsa, M. (2017). Evaluation of the effects of various fertilizers (N, P, K) application on morphological and growth characteristics of *Salvia leriifolia* Benth. *Journal of Agroecology*, 9(1), 232-244. (in Farsi)

7. Azizi, A., Yan, F. & Honermeier, B. (2009). Herbage yield, essential oil content and composition of three oregano (*Origanum vulgare* L.) populations as affected by soil moisture regimes and nitrogen supply. *Industrial Crops and Products*, 29, 554-561.
8. Azizi, A., Yan, F. & Honermeier, B., (2009). Herbage yield, essential oil content and composition of three oregano (*Origanum vulgare* L.) populations as affected by soil moisture regimes and nitrogen supply. *Industrial Crops and Products*, 29, 554-561.
9. Baghalian, K., Maghsodi, M. & Naghavi, M. R., (2010). Genetic diversity of Iranian madder (*Rubia tinctorum* L.) populations based on agromorphological traits, phytochemical content and RAPD markers. *Industrial Crops and Products*, 31(3), 557-562.
10. Bagheri, M., Golparvar, A., Shirani Rad, A. H., Zeinali, H. & Jafarpour, M., (2008). Effects of sowing date and nitrogen fertilizer on quantitative and qualitative characteristics *German chamomile* in Isfahan condition. *Journal of Agricultural Sciences*, 4 (1), 12-20. (in Farsi)
11. Bradford, M. M., (1976). A rapid and Sensitive Method for Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-dye Binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248-254.
12. Dahui, L., Wei, L. Duanwei, Z. Mingjian, G. Wenbing, Z. & Tewu, Y. (2010). Nitrogen effects on total flavonoids, chlorogenic acid, and antioxidant activity of the medicinal plant *Chrysanthemum morifolium*. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 173, 268-274.
13. Daneshkhan, M., Kafi, M., Nikbakht, A. & Mirjalili, M. H. (2007). Effects of different levels of nitrogen and potassium fertilizers on flower yield and essential oil content of *Rosa damascena* Mill. from Barzok of Kashan. *Iranian Journal of Horticultural Science and Technology*, 8(2), 83-90. (in Farsi)
14. Dastmalchi, K., Dorman, H.J.D., Kosar, M. & Hiltunen, R. (2007). Chemical composition and in vitro antioxidant evaluation of a water-soluble Moldavian balm (*Dracocephalum moldavica* L.) extract. *Journal of Food Science and Technology*, 40, 239-248.
15. Dostalek, T., Munzbergova, Z. & Plackova, I., (2010). Genetic diversity and its effect on fitness in an endangered plant species, *Dracocephalum austriacum* L. *Conservation Genetics*, 11(3), 773-783.
16. Engelbrecht, G. M. (2004). *The effects of nitrogen, phosphorus and potassium fertilization on the growth, yield and quality of Lachenalia*. Ph.D. Thesis. Agriculture Science University of the Free State, Bloemfontein. 200 p.
17. Gholipoori, A., Javanshir, A., Rahimzadeh Khoie, F., Mohammadi, A. & Bayat, H. (2007). The effect of different nitrogen levels and pruning of head on yield and yield components of medicinal pumpkin (*Cucurbita pepo* L.). *Journal of Agricultural Sciences and Natural Resources*, 13, 32-41. (In Farsi)
18. Gliessman, S. R. & Rosemeyer, M. (2010). *The Conversion to Sustainable Agriculture*. Principle, Processes and Practice. CRC Press. Taylor and Francis.
19. Gohari, A., Saeidnia, S., Matsuo, K., Uchiyama, N., Yagura, T. & Michiho, K. (2003). Flavonoid constituents of *Dracocephalum kotschy* growing in Iran and their trypanocidal activity. *Natural Medicines*, 57(6), 250-252.
20. Golder, H. V. & Vangelder, H. M. (1998). Influence of nitrogen fertilizer application level on oil production and quality in (*Mentha piperita* L.). *Applications in Plant Sciences*, 82, 68-71.
21. Golparvar, A. R., Hadipanah, A., Gheisari, M. M. & Khaliliazar, R. (2016). Chemical constituents of essential oil of *Dracocephalum moldavica* L. and *Dracocephalum kotschy* Boiss. from Iran. *Acta Agriculturae Slovenica*, 107 (1), 25-31.
22. Hiscox, A. & Israelstam, G. (1979). A method for the extraction of chlorophyll from leaf tissue without maceration. *Canadian Journal of Botany*, 57, 1332-1334.
23. Jahanian, F., Ebrahimi, S.A., Rahbar-Roshandel, N. & Mahmoudian, M. (2005). Xanthomicrol is the main cytotoxic component of *Dracocephalum kotschy* and a potential anti-cancer agent. *Phytochemistry*, 66(13), 1581-92.
24. Jalali, A. & Jamzad, Z. (1999). *Red data book of iran, research institute of forests and rangelands, Iran, Tehran*. 748 p. (in Farsi)
25. Jiang, Z., Ma, B., Erinle, K. O., Cao, B., Liu, X., Ye, S. & Zhang, Y. (2016). Enzymatic antioxidant defense in resistant plant: *Pennisetum americanum* (L.) K. Schum during long-term atrazine exposure. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 133, 59-66.
26. Kheirandish, E., Roshdi, M. & Yosefzadeh, S. (2016). Effects of water stress levels and nitrogen fertilizer on quantitative and qualitative characteristics of Dragonhead (*Dracocephalum moldavica* L.). *Journal of Crop Production*, 9 (1), 109-125. (in Farsi).
27. Kim, H. H., Ohkawa, K. & Nitta, E. (1998). Effects of bulb weight on the growth and flowering of *Leucocoryne coquimbensis* F. Phill. *Acta Horticulturae*, 454: 341-346.
28. Koocheki, M., Nassiri Mahallati, M., Moradi, R. & Mansoori, H. (2017). Strategies of Transition to Sustainable Agriculture in Iran I- Improving Resources Use Efficiency. *Journal of Agroecology*, 9 (3), 619-637. (in Farsi)
29. Kotodziejczyk, M. (2014). Effect of nitrogen fertilization and microbial preparation on potato yielding. *Plant, Soil and Environment*, 60 (8), 379-386.
30. Krizek, D. T. Kramer G. F. Upadhyaya A. & Mirecki R. M. (1993). UV-B Response of cucumber seedling grown under metal halid and high-pressure sodium/deluxe lamps. *Physiology of Plant*, 88, 350-358.

31. Meyghan, M. & Moradi, P. (2018). The effect of nitrogen and phosphorous fertilizers on morphophysiological properties of *Althaea officinalis*. *Iranian Journal of Plant Physiology*, 8(4), 2563-2571. (in Farsi)
32. Mozafarian, V. (2003). *Dictionary of Iranian plant name*. Farhang moaser, 740p. (in Farsi)
33. Mozafarian, V. (2015). *Identification of Medicinal and Aromatic plants of Iran*. Farhang Moaser, 1444p. (in Farsi)
34. Najafpour Navaei, M. & Mirzam M. (2007). Comparative survey on the essential oil composition of cultivated and wild *Dracocephalum kotschyi*. *Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants*, 23 (1), 128-133. (in Farsi)
35. Neyra, C. A. & Hageman, R. H. (1975). Nitrogen uptake and induction of nitrate reductase in excised corn roots. *Plant Physiology*, 56, 692-695.
36. Nooshkam, A., MajnunHosseini, N., Hdian, J., Jahansooz, M. R., Khavazi, K., Salehnia, A. N. & Hedayatpoor, S. (2016). Study the effects of biological and chemical fertilizer on quantitative and qualitative characteristics of savory specie (*Satureja khuzestanica* jamzad). *Journal of Crop Production*, 8 (4), 87-103. (in Farsi)
37. Omid beigi, R. & Hassani Malayeri, S. (2007). Effects of nitrogen fertilization and planting density on the bull's eye chamomile cultivar Zardband. *Journal of Agricultural Sciences of Iran*, 38 (2), 303-309. (in Farsi)
38. Omidbaigi, R. (2003a). *Production and processing of medicinal plants*. (Volume 2) (7th ed.). Behnashr Publications. Tehran. 438p. (in Farsi)
39. Omidbaigi, R. (2003b). *Production and processing of medicinal plants*. (Volume 3) (7th ed.). Behnashr Publications. Tehran. 397p. (in Farsi)
40. Ozgüven, M., Muzeaffer, K., Şener, B., Orhan, I., ŞeReroğlu, N., Kartal, M. & Kaya, Z. (2008). Effects of varying nitrogen doses on yield, yield ponents and artemisinin content of *Artemisia annua* L. *Industrial Crops and Products*, 27, 60-64.
41. Rahmati, M., Azizi, M., Hassanzadeh Khayat, M. & Nemati, H. (2009). The effect of different levels of density and nitrogen on morphological traits, yield, chamomile essential oil and chamazulene. *Journal of Horticultural Sciences*, 23 (1), 27-35. (in Farsi)
42. Rechinger, K. H. (1986). *Flora Iranica*. (pp 1-176.) Akademische Druck University Graz.
43. 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.
44. Saiedi-Gragani, H., Yazdani Bloki, R., Saiedi-Gragani, N. & Sodaieezadeh, H. (2014). Effect of sources and levels of nitrogen fertilizer on *Petroselinum crispum* Mill at Jiroft. *Iranian Journal of Field Crops Research*, 12 (2), 316-327. (in Farsi)
45. Salek, M., Saadatmand, S., Khavari-Nejad, R. A. & Zeinali, H. (2017). Effects of different levels of and superphosphate fertilizers on mineral elements accumulation in *Rubia tinctorum* L. *Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants*, 33 (2), 219-232. (in Farsi)
46. Saxena, A. (2004). Effect of nitrogen levels and harvesting management on quality of essential oil in peppermint cultivars. *Indian Performer*, 33(3), 182-185.
47. Sepahrom, A. & Moosavi, S. Gh. (2016). The effect of irrigation and nitrogen levels on morphological traits, yield and yield components of roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.). *Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants*, 32 (3), 436-449. (in Farsi)
48. Silberbush, M., Ephrath, J. E., Alekperov, C. & Ben-Asher, J. (2003). Nitrogen and potassium fertilization interactions with carbon dioxide enrichment in *Hippeastrum* bulb growth. *Scientia Horticulture*, 98, 85-90.
49. Sunil, K., Singh, P. R. & Humar, S. (1998). Effect of nitrogen, bulb size and spacing on bulb and bulblet production of tuberose (*Polinathes tuberosa* L.). *South Indian Horticulture*, 46 (3-6), 294-298.
50. YazdaniBiouki, R., BannayanAval, M., Sodaeezadeh, H. & Khazaei, H. R. (2014). Effect of different delevs of chemical and organic nitrogen on economic yield and nitrogen use efficiency of wild majoram (*Origanum vulgare* L.) under climatic conditions of Yazd and Mashhad. *Research in Crop Ecosystems*, 1 (2), 1-11. (in Farsi)
51. Zadeh Esfahlan, M. R., Ebadi, A. & Frsad Akhtar, N. (2014). The Effect of nitrogen and zinc levels on essential oil yield and some morphological traits of *Hypericum perforatums*. *Journal of Crop Ecophyiology*, 8 (2), 181-192.
52. Zeinali, H., Moslehi Yazddeli, A., Safaei, L., Jaberalansar, Z., Akhondi, A. & Skanderi, Z. (2014). Effects of different N.P.K fertilizer levels on quantitative and qualitative traits of *Matricaria chamomilla* L. *Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants*, 30 (4), 511-518. (in Farsi)
53. Zhao, J. (2006). The effect of nitrogen fertilization on spearmint. *Journal of Essential Oil Research*, 18, 452-455.
54. Zheljzkov, L., Pickett, K., Caldwell, C., Pincock, J., Roberts, J. & Mapplebeck, L. (2008). Cultivar and sowing date effects on seed yield and oil composition of coriander in Atlantic Canada. *Industrial Crops and Products*, 28 (1), 88-94.