

نشریه پژوهشی:

تأثیر تنش کم آبی و سیترویلین بر محتوای اسانس، رنگیزه‌های فتوستنز و کلروفیل فلورسانس گیاه دارویی زوفا در برداشت‌های مختلف (*Hyssopus officinalis* L.)

حسین احمدی^۱، مصباح بابالار^{۲*}، محمد علی عسکری^۳ و محمدرضا مرشدلو^۴

۱، ۲ و ۳. دانشجوی کارشناسی ارشد، استاد و دانشیار، دانشکده‌گان کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج، ایران

۴. استادیار، دانشکده کشاورزی، دانشگاه مراغه، مراغه، ایران

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۳/۱۳ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۵/۲۵)

چکیده

در مطالعه حاضر تأثیر سه سطح تنش کم آبی (۱۰۰، ۵۰ و ۲۵ درصد آب قابل دسترس) و سه سطح سیترویلین (شاهد، ۱ و ۲ میلی‌مولار) بر شاخص‌های رشد، سلامت فتوستنز و کمیت اسانس گیاه دارویی زوفا در دو برداشت متوالی (تابستان و پاییز، ۱۳۹۸) مورد بررسی قرار گرفت. استخراج اسانس و تعیین محتوای آن به وسیله دستگاه کلونجر در مرحله گلدهی کامل صورت گرفت. تجزیه واریانس نشان داد که تحت تنش کم آبی شدید (۲۵ درصد آب قابل دسترس) بازده اسانس، وزن تر، سطح برگ، ارتفاع گیاه، محتوای کلروفیل کل و حداکثر کارایی کوانتیمی فتوسیستم دو به طور معنی‌داری کاهش می‌یابد. اگرچه سیترویلین تأثیر معنی‌داری بر بازده اسانس نداشت، اما در غلظت دو میلی‌مولار توانست محتوای اسانس را در شرایط تنش شدید به ترتیب ۱۵ و ۳۰ درصد در برداشت اول و دوم نسبت به شاهد افزایش دهد. بر اساس نتایج مقایسه میانگین‌ها، کاربرد سیترویلین در غلظت دو میلی‌مولار توانست تأثیر معنی‌داری در افزایش محتوای کلروفیل کل، مقدار آنتوسیانین‌ها، محتوای نسبی آب و حداکثر کارایی کوانتیمی فتوسیستم دو در شرایط تنش شدید داشته باشد. در مجموع، نتایج آزمایش نشان داد کاربرد سیترویلین در غلظت‌های پایین می‌تواند به عنوان یک محرک متابولیکی جهت بهبود محتوای اسانس و شاخص‌های رشد زوفا توجیه اقتصادی داشته باشد.

واژه‌های کلیدی: تنش کم آبی، زوفا، کلروفیل فلورسانس، سیترویلین.

The effect of water deficiency stress and citrulline on essential oil content, photosynthetic pigments and chlorophyll fluorescence of hyssop (*Hyssopus officinalis* L.) in different harvests

Hosein Ahmadi¹, Mesbah Babalar^{2*}, Mohammad Ali Askary Sarcheshmeh³ and Mohammad Reza Morshedloo⁴

1, 2, 3. M. Sc. Student, Professor and Associate Professor, College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran

4. Assistant Professor, Faculty of Agriculture, University of Maragheh, Maragheh, Iran

(Received: Jun. 02, 2020- Accepted: Aug. 15, 2020)

ABSTRACT

In the present study, effects of exogenous citrulline (control, 1 mM and 2 mM) and water availability (100% WA, 50% WA and 25% WA) on growth indices, health of photosynthetic system, and essential oils quantity of hyssop were examined in two successive harvests (summer and autumn, 2019). Extraction of essential oils and determination of its content was performed by using clevenger-type apparatus in full blossoming stage. Analysis of variance showed that essential oil content, fresh weight, leaf area, plant height, total chlorophylls, and Fv/Fm indicator were decreased under severe water deficit stress (25% WA). Although citrulline doesn't have a significant effect on essential oil content, citrulline at 2 mM could increase essential oil content under severe water deficit stress by about 15% and 30% in the first and second harvest, respectively. According to mean comparison, citrulline employment at 2 mM could significantly improve total chlorophyll content, anthocyanines content, relative water content and Fv/Fm indicator under severe water deficit stress. Overall, results of experiment corroborate that citrulline in low concentrations can economically collaborate as a metabolic agent in improving the essential oil content and growth parameters of hyssop.

Keywords: Chlorophyll fluorescence, citrulline, *Hyssopus officinalis* L., water deficit.

* Corresponding author E-mail: mbabalar@ut.ac.ir

مقدمه

تنش کم‌آبی پس از تنش‌های زنده دومین عامل کاهش عملکرد و شایع‌ترین نوع تنش‌های محیطی می‌باشد که به طور تقریبی موجب محدودیت تولید در ۲۵ درصد از اراضی دنیا گردیده است. بنابراین توزیع و پراکنش گیاهان در سراسر دنیا تا حدود زیادی متأثر از میزان آب خواهد بود (Bigloui et al., 2010). در واقع کمبود آب به عنوان یکی از عوامل محدودکننده کشاورزی در جهان رشد گیاهان را محدود می‌سازد، لذا لازم است که گیاهان به آن سازگار شوند تا بقا یابند و تولید اقتصادی داشته باشند. تولید متابولیت‌های ثانوی در گیاهان دارویی، تحت کنترل عوامل ژنتیکی می‌باشد، با این حال مسیرهای تولید متابولیت‌های ثانوی در این گیاهان به شدت تحت تأثیر عوامل محیطی می‌باشد. پس تنش رطوبتی نیز می‌تواند به عنوان یک عامل محیطی در سنتز ترکیبات طبیعی گیاهان دارویی مؤثر باشد (Jaleel et al., 2008). گیاهان با تغییر متابولیسم سلولی و القای ساز و کارهای دفاعی به تنش آبی پاسخ داده و با آن سازگار می‌شوند. پاسخ به تنش آبی در گیاهان باعث از دست دادن تورژسانس سلولی، کاهش نرخ رشد، آسیب به سیستم فتوسنتزی و کاهش رنگیزه‌های نورساختی می‌گردد (Madani et al., 2019). از این رو، مطالعه و شبیه سازی مکانیسم‌های دفاعی برای درک جایگاه واقعی فیزیولوژی گیاهی در رهگیری تأثیرهای مضر تنش‌های محیطی لازم و ضروری است (Gupta et al., 2018).

با توجه به موقعیت جغرافیایی ایران و واقع شدن آن در مناطق خشک و نیمه خشک جهان، انتخاب گیاهان سازگار به کم‌آبی و دارای نیاز آبی کم جهت کشت و کار از اهمیت خاصی برخوردار است (Moosavi et al., 2017). یکی از این گیاهان می‌تواند گیاه دارویی زوفا (*Hyssopus officinalis* L.) باشد. زوفا یک گیاه چند ساله و اسانس‌دار است که متعلق به تیره نعناعیان (Lamiaceae) می‌باشد. زوفا گیاهی مقاوم به کم‌آبی است و در نواحی گرم و آفتابی رشد می‌کند، اما در ایران گونه افسینالیس آن به صورت وحشی در طبیعت وجود ندارد و تنها به صورت کشت شده (معرفی شده)

یافت می‌شود (Judzentine, 2016). زوفا دارای طیف وسیعی از ترکیبات بیولوژیکی فعال نظیر فلاونوئیدها، اسیدهای فنلی و اسانس (ترکیب‌های اصلی اسانس شامل بتاینن، پینوکامفن و ایزوپینوکامفن و المول است که خواص ضد تنگی نفس، ضد سرفه، ضد ویروس و تقویت‌کنندگی سیستم ایمنی را به آن بخشیده است (Ahmadi et al., 2020).

محلول‌های سازگار (Compatible solutes) ترکیباتی با وزن مولکولی کم، به شدت انحلال پذیر و آب دوست هستند که گیاهان را قادر می‌سازند تا از ساختار پروتئین‌های غشا در طی بروز تنش کم‌آبی طولانی مدت حفاظت کنند و اثر جبران ناپذیر آن را کاهش دهد. آن‌ها همچنین با حفظ حالت تورژسانس گیاهی و جاروب کردن رادیکال‌های آزاد نقش‌های فیزیولوژیکی خاصی را ایفا می‌کنند (Dutta et al., 2018). محلول‌های سازگار شامل فندها، پلی آمین‌ها، بتائین‌ها و آمینواسیدها هستند (Iqbal et al., 2015). سیتروکلین، یک آمینو اسید غیر ضروری و کمیاب است که در چرخه اوره است که از ارنیتین و کربومیل فسفات سنتز می‌شود. تحت تنش کم‌آبی تجمع این ترکیب اسمولیت در برخی از گیاهان سه کربنه و چهار کربنه افزایش می‌یابد و می‌تواند با مکانیسم پاکسازی رادیکال‌های آزاد هیدروکسیل بیشتر از محلول‌های سازگار دیگر نظیر مانیتول، پرولین و گلیسین بتائین از تنش اکسیداتیو ثانوی جلوگیری کنند (Dasgan et al., 2009; Yokota et al., 2002).

مطالعه‌ای نشان داد که در شرایط تنش کم‌آبی حداقل فلورسانس، فلورسانس متغیر و حداکثر کارایی کوانتومی فتوسیستم II کاهش یافت، ولی تولید زیست توده، محتوای آنتوسیانین‌ها و غلظت تریگونلین افزایش یافت (Baghbani arani et al., 2017). در همین راستا، در پژوهش دیگری نیز کاربرد خارجی اسپرمین و سالیسیلیک اسید در شرایط تنش کم‌آبی، فعالیت آنتی‌اکسیدانی، وزن خشک، محتوای کلروفیل، کارتنوئیدها را افزایش داد (Darvizeh et al., 2019). مطالعات بسیار زیادی تأثیر مثبت بسیاری از ایسیتورهای متابولیکی و غیر زیستی را در بهبود عملکرد رشد و اسانس را در گیاهان دارویی تایید

۹۷ آغاز گردید و در ۱۱ مرداد ماه ۱۳۹۸ به پایان رسید (میانگین دمای حداکثر و حداقل به ترتیب: ۳۴ و ۲۲ درجه سانتی گراد). جهت بدست آوردن مقادیر کافی از مواد گیاهی برای ارزیابی کمیت اسانس، گیاهان در مرحله گلدهی کامل از شش سانتی متری سطح خاک گلدان به صورت یکنواخت بریده شدند. بعد از برداشت اول، همان گیاهان برای چین دوم رشد و پرورش داده شدند. دوره رشدی برای برداشت دوم (تابستان و پاییز، ۱۳۹۸) از ۱۱ مرداد شروع گردید و در ۳۰ آبان ماه ۱۳۹۸ به پایان رسید (میانگین دمای حداکثر و حداقل به ترتیب: ۲۷ و ۱۵ درجه سانتی گراد).

مواد گیاهی و شرایط رشد

بذرهای گیاه دارویی زوفا از شرکت پاکان بذر اصفهان تهیه شدند. بذرها در هیپوکلیت سدیم پنج درصد به مدت دو دقیقه ضدعفونی و چند بار با آب مقطر استریل شسته شدند. بذرهای زوفا در ۱۱ اسفند ماه ۱۳۹۷ در درون سینی‌های نشاهای پلاستیکی در بستری از پرلیت-کوکوپیت (به نسبت ۳۰:۷۰، حجمی: حجمی) کشت شدند. آبیاری روزانه تا زمان سبز شدن بذرها صورت گرفت. نشاهای گیاهی هم اندازه که به ارتفاع ۱۲-۱۰ سانتی متر رسیده بودند (۶۰ روز بعد از جوانه زنی)، به گلدان‌های پلاستیکی ده لیتری حاوی چهار کیلوگرم بستر کشت انتقال داده شدند. به منظور کاهش فشردگی و بهبود تهویه خاک، بستر کشت از مخلوط خاک و پرلیت (به نسبت حجمی ۷۰ به ۳۰) تشکیل شده بود. برای تأمین عناصر غذایی کافی گیاهان در طول رشد، گیاهان از ابتدای رشد به طور منظم (دو بار در هفته) با یک محلول غذایی رقیق ثابت و یکنواخت (جدول ۱) تغذیه شدند. همچنین جهت جلوگیری از رسوب نمک‌های معدنی در مخلوط خاک به دلیل کود آبیاری مداوم، بستر کشت هر هفته یکبار نیز با آب بدون کود شستشو شد.

اعمال تیمارهای اصلی

محلول غذایی به طور منظم و به مقدار مورد نیاز (تا رسیدن به مقدار ظرفیت زراعی بستر) به تمامی گلدان‌ها تا زمان استقرار مناسب گیاهان داده شد.

کرده‌اند (Kulak et al., 2019). از طرفی دیگر کودهای اسیدآمین‌های در بازار به وفور قابل دسترس هستند. با توجه به این که دوز مصرفی سیتروپین (در حد چند میلی مولار) پایین بوده است، در مقیاس صنعتی و هنگام فرموله شدن بسیار ارزان تر تمام خواهد شد. بنابراین، کاربرد سیتروپین خواهد توانست به عنوان یک محرک متابولیکی برای بهبود تولید اسانس و رشد این گیاه دارویی و سایر گیاهان توجیه اقتصادی داشته باشد. از این رو، هدف اصلی مطالعه حاضر به شبیه سازی نحوه تأثیر تنش کم‌آبی و کاربرد سیتروپین به عنوان یک الیسیتورهای متابولیکی (محرک) و محلول سازگار بر محتوای اسانس، رنگیزه‌های فتوسنتز و فلورسانس کلروفیل اختصاص داده شد.

مواد و روش‌ها

طرح آزمایشی

مطالعه به صورت گلدانی در فضای آزاد گروه علوم باغبانی و فضای سبز دانشکده علوم و مهندسی کشاورزی دانشگاه تهران در دو چین متوالی (چین تابستان و پاییز) انجام شد (مختصات جغرافیایی محل آزمایش، $51^{\circ} 59' 50''$ طول غربی و $20^{\circ} 48' 35''$ عرض شمالی و ارتفاع از سطح دریا ۱۳۴۳ متر). سه سطح دسترسی به آب (۱۰۰، ۵۰ و ۲۵ درصد آب قابل دسترس خاک) و سه سطح محلول پاشی سیتروپین (شرکت مرک، آلمان) (شاهد، یک و دو میلی مولار) به طور همزمان و هنگامی که گیاهان به ارتفاع حدود ۲۰ سانتی متر رسیده بودند (استقرار مناسب)، اعمال شد. عامل سوم آزمایشی نیز مربوط به دو برداشت متوالی (برداشت تابستان و پاییز) بود. آزمایش به صورت فاکتوریل اسپلیت پلات در زمان و بر مبنای طرح بلوک‌های کامل تصادفی (RCBD) انجام شد که در آن کرت‌های اصلی شامل تنش کم‌آبی در سه سطح و کاربرد خارجی سیتروپین در سه سطح و کرت‌های فرعی همان زمان برداشت بودند. برای اندازه‌گیری تمامی صفات، نمونه برداری از برگ‌های زوفا ۶۰ روز پس از شروع اعمال تیمارهای اصلی در مرحله گدهی کامل (سیتروپین و تنش کم‌آبی طولانی مدت) با استفاده از نیتروژن مایع صورت گرفت. دوره رشدی برای برداشت اول (بهار و تابستان، ۱۳۹۸) از ۱۱ اسفند

جدول ۱. غلظت عناصر پرمصرف و کم مصرف در محلول غذایی (Babalar *et al.*, 2009).

	NO ₃	PO ₄	SO ₄	Cl	Total (meq/L)	Microelements (Concentration)	Concentration (mg/L)
K	1.2	H ₂ :0.2-H:0.4	0.2	-	2.05	NH ₄ MO ₇ O ₂₄	0.05
Na	-	-	-	0.1	0.1	H ₃ BO ₃	1.5
Ca	1.4	-	-	-	1.4	MnSO ₄ .4 H ₂ O	2
Mg	0.1	-	0.75	-	0.75	CuSO ₄ .4H ₂ O	0.25
NH ₄	0.1	-	-	-	0.1	ZnSO ₄ .7H ₂ O	1
H	-	H ₂ :0.2-H:0.4	-	-	0.6	Fe-EDTA	10
Total	2.7	1.2	1	0.1	5	Total	14.8

سطح از محلول سیتروپین (مرک، آلمان) نیز برای محلول پاشی (شاهد (آب مقطر)، ۱ و ۲ میلی مولار) اختصاص داده شد. در مجموع چهار مرتبه محلول پاشی سیتروپین به فواصل ۱۵ روز در هر برداشت اعمال شد که اولین محلول پاشی به طور همزمان با شروع اعمال تیمارهای تنش کم آبی آغاز شد. گیاهان شاهد نیز با آب مقطر محلول پاشی شدند.

بررسی صفات رشد

ارتفاع، وزن خشک، وزن تر و سطح برگ در سه تکرار اندازه‌گیری شد. اندازه‌گیری سطح برگ با استفاده از دستگاه سطح برگ سنج (ΔT , England) انجام شد.

سنجش رنگیزه‌های فتوسنتز

مقدار ۰/۲ گرم از برگ‌تر گیاه را در ۱۰ میلی‌لیتر استون ۸۰ درصد استخراج نموده، به طوری که نمونه‌های برگ به صورت بی‌رنگ درآیند. سپس توسط پلیت ریدر (Biotek, Agilent, USA) جذب مقداری از نمونه استخراج شده در سه تکرار و در طول موج‌های ۶۶۳، ۶۴۵ و ۴۸۰ نانومتر قرائت شد. در نهایت با استفاده از فرمول محاسبه‌ای، میزان کارتنوئیدها، کلروفیل a و b و کلروفیل کل بر حسب میلی‌گرم بر گرم وزن تر نمونه به دست آمد (Arnon., 1949). همچنین از دستگاه کلروفیل سنج پرتابل (SPAD) نیز برای قرائت محتوای کلروفیل استفاده شد. تعیین مقدار آنتوسیانین‌ها به روش (Wagner., 1979) انجام شد. یک دهم گرم از برگ‌های تر در ۱۰ میلی‌لیتر متانول اسیدی (متانول: هیدروکلریک اسید، ۱:۹۹) استخراج شد و به مدت یک شب نگه داشته شد و سپس به مدت ۱۵ دقیقه در ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه

پس از آن، تیمارهای تنش آبی بر مبنای تخلیه مجاز برنامه‌ریزی شده (Management allowed depletion) آب قابل دسترس مخلوط خاک با استفاده از فرمول‌های زیر با اندکی تغییر اعمال گردید (Allen *et al.*, 1998).

$$\theta_{V_{irrig}} = \theta_{V_{Fc}} - (\theta_{V_{Fc}} - \theta_{V_{pwp}}) \times f \quad (1)$$

$$V_{irrig} = \theta_{V_{irrig}} \times V_{soil\ mixture} \quad (2)$$

که در فرمول اول $\theta_{V_{irrig}}$ همان درصد حجمی آبیاری در سطح آب قابل دسترس مورد نظر (نسبت حجم آب مخلوط خاک به حجم کل مخلوط)، $\theta_{V_{Fc}}$ درصد حجمی محتوای آب مخلوط خاک در ظرفیت زراعی (۲۸.۵ درصد)، $\theta_{V_{pwp}}$ درصد حجمی محتوای آب مخلوط خاک در نقطه پژمردگی دائم (۱۱.۵ درصد) و f سهم انتخاب شده از آب قابل دسترسی (۰، ۵۰ و ۷۵ درصد) که از مخلوط خاک تخلیه خواهد شد. در فرمول دوم، V_{irrig} حجم آبیاری مورد نیاز برای گلدان‌های هر تیمار است. درصد حجمی، با ضرب شدن درصد رطوبت وزنی ظرفیت زراعی و نقطه پژمردگی دائم مخلوط خاک (اندازه‌گیری شده توسط دستگاه صفحه فشاری) در جرم مخصوص ظاهری مخلوط خاک بدست می‌آید. در مجموع سه رژیم آبی شامل ۱۰۰ درصد (شاهد)، ۵۰ درصد (تنش کم آبی متوسط) و ۲۵ درصد (تنش کم آبی شدید) آب قابل دسترس مخلوط خاک به روش وزن کردن روزانه تمامی گلدان‌ها اعمال شد. به منظور خارج کردن اثر افزایشی وزن گیاهان در حال رشد، از گلدان‌های بدون گیاه برای تنظیم وزن استفاده شد. همچنین به منظور افزایش دقت عمل در اعمال تیمارهای تنش آبی، رطوبت خاک در طول آزمایش چندین دفعه با دستگاه رطوبت سنج (TDR100, Spectrum technologies, Inc, USA) شاهد گردید. سه

گردید تا مواد سطح برگ اختلالی در آزمایش ایجاد نکنند. به هر لوله آزمایش به میزان ۴۰ میلی لیتر آب دیونیزه اضافه گردید و نمونه‌ها در دمای اتاق به مدت ۲۴ ساعت بر روی شیکر با ۱۵۰ دور در دقیقه قرار داده شد. سپس نمونه‌ها به مدت یک دقیقه مخلوط گردید و هدایت الکتریکی آن‌ها به عنوان EC اولیه توسط EC متر اندازه‌گیری شد. به منظور اندازه‌گیری EC ثانویه نمونه‌ها به مدت ۱۵ دقیقه درون اتوکلاو با دمای ۱۲۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند و پس از اتمام اتوکلاو و رسیدن دمای نمونه‌ها به دمای محیط مجدداً EC نمونه‌ها توسط EC متر به عنوان EC دوم اندازه‌گیری شد و در نهایت درصد نشت یونی از حاصل تقسیم EC اولیه بر EC ثانویه محاسبه گردید.

استخراج و تعیین بازده اسانس

برای تعیین بازده اسانس‌ها، برگ و سرشاخه گلدار خشک شده ۱۸ تک بوته از هر تیمار به سه گروه (با سه تکرار و هر تکرار نماینده شش تک بوته) تقسیم شدند. سپس به وسیله آسیاب آزمایشگاهی به قطعات ریز (جهت استخراج بهتر اسانس) خرد شدند و مقدار ۲۰ گرم از هر نمونه جهت اسانس‌گیری با استفاده از ترازوی دیجیتالی وزن شدند. نمونه‌ها به داخل بالن منتقل شده و با استفاده از آب مقطر به حجم ۴۰۰ سی‌سی رسانده شدند. سپس در دستگاه طرح کلونجر قرار داده شد و هر نمونه به مدت سه ساعت اسانس‌گیری شد. در نهایت بازده اسانس به صورت حجمی/وزنی ثبت گردید (Polish Pharmacopeia., 2006).

آنالیز آماری

تجزیه واریانس‌ها و آزمون مقایسه میانگین چند دامنه‌ای دانکن (DMRT) با نرم افزار SAS ورژن ۹/۴ انجام شد. نرمال بودن داده‌ها و خطای باقیمانده‌ها توسط دو آزمون شاپیرو-ویلک و کلموگروف-اسمیرنوف بررسی شد. ضریب همبستگی پیرسون بین صفات اندازه‌گیری شده توسط نرم افزار SPSS ورژن ۲۵ (شیکاگو، آمریکا) محاسبه گردید. در نمودارهای مربوط به اثر متقابل سیتروپین و تنش، مقایسه

سانتریفیوژ گردید. جذب نمونه‌ها در سه تکرار و در طول موج ۵۵۰ نانومتر اندازه گرفته شد. غلظت آنتوسیانین‌ها بر حسب ضریب خاموشی آن ($\text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1} \cdot 33000$) با استفاده از رابطه $A = \epsilon bc$ محاسبه گردید. در این رابطه، A میزان جذب، C غلظت آنتوسیانین‌ها و ϵ ضریب خاموشی می‌باشد.

فلورسانس کلروفیل

تمامی پارامترهای کلروفیل فلورسانس (F_0, F_m) قابل حمل (Fv/Fm) توسط یک دستگاه کلروفیل فلورسانس متر (HandyPEA, Hansatech Instruments, England) اندازه‌گیری شد. اندازه‌گیری این پارامترها به صورت خودکار توسط دستگاه در ۵ تکرار و از ساعت ۸ صبح تا ۱۰ صبح پس از ۲۰ دقیقه سازگاری به تازگی صورت گرفت.

اندازه‌گیری محتوای رطوبت نسبی آب و نشت یونی برگ

به منظور اندازه‌گیری محتوای نسبی آب برگ (RWC) از روش (Xu & Leskovar., 2015) استفاده شد. بدین منظور تعداد ۱۰ برگ تقریباً هم اندازه از برگ‌های جوان توسعه یافته از هر تک بوته مورد آزمایش جدا گردیده، بلافاصله با ترازوی حساس وزن شد و وزن آن‌ها به عنوان وزن تازه (FW) در نظر گرفته شد. سپس برگ‌ها به مدت ۲۴ ساعت درون لوله‌های آزمایش حاوی ۴۰ میلی لیتر آب مقطر در دمای چهار درجه سانتی‌گراد قرار داده شد و وزن نمونه‌ها به عنوان وزن تورژسانس (TW) در نظر گرفته شد. در مرحله بعد نمونه‌ها به مدت ۲۴ ساعت درون آون با دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت و وزن حاصل از آن‌ها به عنوان وزن خشک (DW) در نظر گرفته شد. میزان نسبی آب از طریق فرمول زیر محاسبه گردید:

$$RWC (\%) = [(FW - DW) / (TW - DW)] \times 100$$

نشت یونی نیز بر اساس روش Sullivan & Ross., (1979) اندازه‌گیری شد. در این روش از هر گیاه (برگ‌های توسعه یافته بالایی) تعداد ۱۰ دیسک برگ با قطر ۵/۰ سانتی‌متر تهیه و سه بار با آب مقطر دیونیزه شستشو داده شد و به لوله آزمایش منتقل

2009). کاهش سطح برگ و عملکرد بیولوژیکی مشاهده شده می‌تواند به دلیل بسته شدن روزنه‌ها و اختلال در جذب عناصر غذایی در شرایط تنش کم آبی نسبت داده شود. همچنین این رخداد ارتباط مستقیمی با سلامت سیستم فتوسنتزی و کلروفیل دارد (Mohammadi et al., 2019). در مطالعه‌ای نیز پارامترهای رشد و عملکرد بیولوژیکی گیاه دارویی شنبلیله در شرایط تنش کم آبی کاهش نشان دادند (Baghbani arani et al., 2017). جدول تجزیه واریانس نشان داد سیترولین بر محتوای نسبی آب در سطح یک درصد تأثیر معنی‌داری داشت (جدول ۵). مقایسه میانگین‌ها نشان داد محتوای نسبی آب در تیمار دو میلی مولار سیترولین تفاوت معنی‌داری با تیمار یک میلی مولار و شاهد داشت. سیترولین به عنوان یک اسمولیت در بسیاری از تیره‌های گیاهی عمل می‌کند، پس نقش آن در حفظ پتانسیل آب سلول و تورژسانس می‌تواند توجیه داشته باشد (Dutta et al., 2018). در این راستا، نتایج مشابه مطالعه ای نشان داد که تنش کم آبی سبب کاهش معنادار محتوای نسبی آب می‌شود، ولی کاربرد هیومیک اسید سبب بهبود معنادار آن می‌شود (Khorasaninejad et al., 2018). کاربرد خارجی سالیسیلیک اسید و آبسیزیک اسید در گیاه دارویی زنیان نیز سبب افزایش محتوای نسبی آب برگ شد (Ghasemi et al., 2019).

بازده اسانس

بر اساس جدول تجزیه واریانس، تنش کم آبی و زمان برداشت بر بازده اسانس تأثیر معناداری ($P < 0.05$) گذاشت (جدول ۲). روی هم رفته، در برداشت دوم بازده اسانس بالاتر از برداشت اول بود (جدول ۳). در برداشت اول و دوم، تنش کم آبی شدید بازده اسانس را در مقایسه با شاهد به ترتیب ۴۲/۵ و ۱۴ درصد کاهش داد (جدول ۳). کاربرد دو میلی مولار سیترولین تحت شرایط تنش شدید تأثیر معناداری بر بازده اسانس نداشت، ولی در برداشت اول ۱۵ درصد و در برداشت دوم ۳۰ درصد بازده اسانس را بهبود بخشید.

میانگین به صورت جداگانه برای هر برداشت (حروف کوچک برای برداشت اول و حروف بزرگ برای برداشت دوم) صورت گرفت. مقادیر در تمامی صفات (به جز پارامترهای کلروفیل فلورسانس با ۵ تکرار) میانگین سه تکرار \pm انحراف استاندارد (SD) می‌باشد.

نتایج و بحث

شاخص‌های رشد

بر اساس جدول ۲ اثر سیترولین بر ارتفاع در سطح احتمال یک درصد و بر وزن خشک در سطح پنج درصد معنی دار بود و اثر تنش کم آبی بر ارتفاع بوته و وزن تر در سطح احتمال یک درصد معنی دار بود. هیچ کدام از اثرات متقابل تفاوت معنی‌داری را نشان نداد. اثر زمان برداشت در سطح احتمال پنج درصد بر وزن تر و ارتفاع بوته و در سطح احتمال پنج درصد بر سطح برگ معنی دار بود. مقایسه میانگین‌ها نشان داد تحت شرایط تنش کم آبی شدید وزن تر، سطح برگ و ارتفاع بوته گیاهان تفاوت معنی‌داری را در مقایسه با شاهد نشان داد (جدول ۶). ارتفاع بوته و وزن تر در برداشت دوم بیشتر از برداشت اول بود، اما سطح برگ در برداشت دوم افزایش نشان داد (جدول ۳). کاربرد سیترولین در سطح یک میلی مولار بیشترین میزان وزن خشک (۴۴/۸ گرم) را در پی داشت که نسبت به شاهد تفاوت معنی‌داری را نشان داد. برعکس با کاربرد دو میلی مولار سیترولین، کاهش ارتفاع بوته نسبت به شاهد (بدون سیترولین) رخ داد (جدول ۵). در یک پژوهش مشابه روی گیاه دارویی زوفا (*Hyssopus officinalis* L.) نتایج نشان داد کاربرد الیسیتور سالیسیلیک اسید سبب افزایش عملکرد، بهبود صفات فیزیولوژیکی و اسانس گردید و کاهش عملکرد و رشد گیاه را جبران نمود (Sharifi, 2017). نتایج مطالعه‌ای که جهت بررسی تأثیر کاربرد ترکیبی خارجی سالیسیلیک اسید و آسکوربیک اسید بر شاخص‌های فیزیولوژیکی گیاه چای ترش تحت شرایط تنش کم آبی انجام گرفت نشان داد که وزن تر و وزن خشک چای ترش به صورت معنی‌داری کاهش پیدا کردند (Baghizadeh et al.,)

جدول ۲. تجزیه واریانس اثر سیتروکلین و تنش کم آبی بر صفات رشد و بازده اسانس زوفا.

Table 2. Results of variance analysis effect of citrulline and water deficit stress on growth traits in hyssop.

Sources of variance	df	Means of squares					
		Leaf area	Relative water content	Plant Height	Dry weight	Fresh weight	Essential oil content
Block	2	16.508	9.462	320.05**	720.685**	8235.5**	0.0008
Citrulline (C)	2	5.211	195.24**	162.16**	249.407	1034.667	0.070
Water deficit stress (S)	2	29.49	18.07	215.166**	24.079	3862.167**	0.119*
S×C	4	7.655	10.879	10.416	91.407	969.833	0.004
Main Error	16	14.419	29.15	16.18	66.726	594.645	0.013
Time of harvest (T)	1	88.882*	21.40	2787.85**	204.166	241108.9**	0.1157*
C×T	2	0.939	8.685	8.796	48.22	82.74	0.017
S×T	2	11.247	5.629	0.574	37.388	588.574	0.031
S×C×T	4	5.252	2.657	21.435	108.61	389.57	0.004
CV%	-	8.35	5.17	7.71	18.07	14.69	26.34

***, **, * و ns: به ترتیب تفاوت معنی دار در سطح احتمال ۱ و ۵ درصد و نبود تفاوت معنی دار.

**, *, ns: Significantly difference at the 1 and 5% of probability levels, and non-significantly difference, respectively.

جدول ۳. مقایسه میانگین اثر زمان برداشت بر برخی صفات زوفا.

Table 3. Mean comparison effect of harvest time on some traits of hyssop.

Main Factor	Chl. a content (mg g ⁻¹ Fw)	Total chlorophyll value (SPAD)	Total chlorophyll content (mg g ⁻¹ Fw)	Anthocyanines content (μmol g ⁻¹ Fw)	EO content %	Plant height (cm)	Fresh weight (g)	Leaf area (cm ²)	
									Harvest time
Harvest time	First	0.287 a	49.18 a	0.413 a	0.533 a	0.507 b	35.25 b	49.18 a	19.19 a
	Second	0.175 b	45.04 b	0.269 b	0.355 b	0.60 a	49.62 a	45.04 b	16.63 b

در هر ستون حروف یکسان نشان دهنده عدم تفاوت معنی داری باشد.

In each column, values with same letter does not have significantly difference with each other.

یکساله *Artemisia annua* L. با افزایش تنش کم آبی کاهش می یابد (Yadav et al., 2014).

نشست یونی برگ (Leaf ionic leakage)

نتایج تجزیه واریانس (جدول ۷) نشان داد اثر هیچکدام از فاکتورهای آزمایشی و اثر متقابل آنها برای صفت مورد نظر معنی دار نبوده است. با این حال، تاکنون مطالعات بی شماری افزایش نشست یونی را در تنش های محیطی نشان داده اند.

رنگیزه های نورساختی

تنش کم آبی در سطح احتمال یک درصد باعث کاهش معنادار محتوی کلروفیل کل (بر اساس قرائت کلروفیل سنج) شد. همچنین در سطح احتمال پنج درصد سبب افزایش معنادار محتوی کلروفیل ب و کاهش نسبت کلروفیل آب و قرائت کلروفیل سنج گردید. فاکتور زمان برداشت نیز برای تمامی صفات، به جز مقدار کارتنوئیدها، معنی دار بود (جدول ۴). نتایج تجزیه واریانس نشان داد سیتروکلین بر محتوی کلروفیل آ در سطح احتمال یک درصد و بر مقدار آنتوسیانین ها و قرائت کلروفیل سنج در سطح احتمال پنج درصد اثر معنی داری داشت (جدول ۴). با این وجود، اثرات متقابل بین فاکتورهای آزمایشی بر هیچ

در میان نوع گسترده متابولیت های ثانوی، اسانس های گیاهی توجه بسیاری را به خود جلب کرده است (Kulak et al., 2019). در سال های اخیر محققین بی شماری مطالعاتشان را روی ارزیابی کمی و کیفی اسانس های گیاهی متمرکز کرده اند که این موضوع به دلیل کاربرد گسترده آنها در صنایع آرایشی بهداشتی، غذایی و عطر سازی است (Zali et al., 2018). در واقع برای تحقق تولید مناسب یک گیاه حاوی اسانس، رسیدن به حداکثر عملکرد و بازده اسانس موضوعی ضروری است. بر اساس یک مطالعه، می توان به این نتیجه رسید که تغییر در بازده اسانس می تواند با زمان برداشت، نوسات فصلی، عملیات کشاورزی و تقویت خاک توجیه پذیری داشته باشد (Askari & Ehsanzadeh., 2015). بازده اسانس در گیاهان با سن بیشتر (برداشت دوم) بالاتر از گیاهان برداشت اول بود. در واقع، این مشاهده در توافق کامل با مطالعه Kazaie et al. (2008) بود. آن ها گزارش کردند که بازده اسانس در زوفاهای دوساله بیشتر از زوفاهای یکساله بود. طبق جدول ۶ بازده اسانس با افزایش سطح تنش کم آبی به طور معناداری کاهش یافت. به طور مشابهی یک گزارش در راستای موازی با این مطالعه حاضر قرار داشت. آنها نشان داد که بازده اسانس درمنه

آبی سبب کاهش محتوای کلروفیل کل، کلروفیل آ و نسبت کلروفیل آب/ب گردید، اما کاربرد ژئولیت و ورمی کمپوست، محتوای آنتوسیانین‌ها و کارتنوئیدها را بهبود بخشید. نویسندگان همچنین اظهار داشت که عدم بازیابی نیتروژن در شرایط تنش کم آبی و تولید رادیکال آزاد توانسته است باعث کاهش تولید و غلظت رنگی‌ها گردد (Baghbani arani *et al.*, 2017). طبق شکل ۵ بالاترین محتوای کلروفیل (قرائت کلروفیل سنج) در تیمار دو میلی مولار سیتروکلین بدست آمد که می‌تواند با توانایی آن در تأمین نیتروژن برای بیوسنتز رنگی‌ها رابطه مستقیمی داشته باشد. در مطالعه‌ای بر اکوتیپ‌های مختلف آویشن نیز نشان داده شد که کاربرد سالیسیلیک اسید به عنوان یک الیسیتور سبب بهبود تجمع کلروفیل کل گردید (Mohammadi *et al.*, 2019).

کدام از صفات تأثیر معناداری نداشت (جدول ۴). نتایج مقایسه میانگین‌ها نشان داد مقدار رنگی‌ها در برداشت اول بیشتر از برداشت دوم بود (جدول ۳). محتوای کلروفیل آ و نسبت کلروفیل آب/ب در تیمار دو میلی مولار سیتروکلین افزایش معناداری در مقایسه تیمار یک میلی مولار و شاهد داشت (جدول ۵). محتوای کلروفیل ب نیز فقط در شرایط تنش کم آبی شدید نسبت به شاهد افزایش معناداری داشت. نسبت کلروفیل آب/ب نیز فقط در شرایط تنش کم آبی شدید نسبت به شاهد کاهش معناداری داشت (جدول ۶). همچنین مقدار آنتوسیانین‌ها نیز در تیمار دو میلی مولار سیتروکلین نسبت به شاهد افزایش معناداری را نشان داد (جدول ۵). در جدول ۸، تجزیه همبستگی رنگی‌ها با سایر صفات فیزیولوژی آمده است. در توافق کامل با مطالعه ما، پژوهشی نشان داد که تنش

جدول ۴. نتایج تجزیه واریانس اثر سیتروکلین و تنش کم آبی بر رنگی‌های نوری زوفا.

Table 4. Results of variance analysis effect of citrulline and water deficit stress on photosynthetic pigments of hyssop.

Sources of variance	df	Means of squares						
		Anthocyanin content	SPAD value	Total chlorophyll content	Total carotenoids content	Chl. a/b ratio	Chl. b content	Chl. a content
Block	2	0.0175	42.14	0.00052	0.0015	0.447	0.00017	0.0010
Citrulline (C)	2	0.033*	87.41*	0.024	0.0011	4.807	0.0018	0.0276**
Water deficit stress (S)	2	0.016	155.87**	0.010	0.0014	3.078*	0.0060*	0.00080
S×C	4	0.011	14.045	0.011	0.0013	0.327	0.00049	0.007
Main Error	16	0.0097	20.54	0.0065	0.0015	0.948	0.0014	0.0031
Time of harvest (T)	1	0.426**	231.01**	0.280*	0.0059	2.986*	0.0090*	0.163**
C×T	2	0.0040	13.844	0.00068	0.0011	0.762	0.001	0.00081
S×T	2	0.0253	11.755	0.00083	0.0016	0.292	1.30	0.0026
S×C×T	4	0.0042	24.371	0.0013	0.0015	0.042	0.00054	0.00093
CV %	-	19.77	9.08	32.98	26.10	32.98	30.22	37.17

***, *, ns: به ترتیب تفاوت معنی دار در سطح احتمال ۱ و ۵ درصد و نبود تفاوت معنی دار.

**, *, ns: Significantly difference at the 1 and 5% of probability level, and non-significantly difference, respectively.

جدول ۵. مقایسه میانگین اثر سیتروکلین بر برخی صفات زوفا.

Table 5. Mean comparison effect of citrulline on some traits of hyssop.

Trait	Total chlorophyll value (SPAD)	Chl a/b ratio (mg g ⁻¹ Fw)	Chl a content (mg g ⁻¹ Fw)	Anthocyanines content (μmol g ⁻¹ Fw)	Relative water content (%)	Plant height (cm)	Dry weight (g)
Control	46.63 ab	1.85 b	0.191 b	0.395 b	83.38 b	44.5 a	37.38 b
Citrulline 1 mM	45.19 b	2.21 b	0.233 b	0.465 a	86.11 b	43.83 a	41.05 ab
Citrulline 2 mM	49.52 a	2.87 a	0.270 a	0.473 a	89.94 a	39 b	4.483 a

***, *, ns: به ترتیب تفاوت معنی دار در سطح احتمال ۱ و ۵ درصد و نبود تفاوت معنی دار.

**, *, ns: Significantly difference at the 1 and 5% of probability level, and non-significantly difference, respectively.

جدول ۶. مقایسه میانگین اثر تنش کم آبی بر برخی صفات زوفا.

Table 6. Mean comparison effect of water deficit stress on some traits of hyssop.

Trait	Chl a/b ratio (mg g ⁻¹ Fw)	Total Chlorophyll (SPAD)	Plant height (cm)	Fresh weight (g)	Leaf area (cm ²)	Essential oil content (%)
Control	2.74 a	49.47 a	46.16 a	162.22 a	18.95 a	0.631 a
Water deficit stress Moderate	2.29 ab	48.05 a	41.83 b	156.22 a	18.31 ab	0.528 b
Water deficit stress Severe	1.91 b	43.82 b	39.33 c	134.38 b	16.48 b	0.480 b

***, *, ns: به ترتیب تفاوت معنی دار در سطح احتمال ۱ و ۵ درصد و نبود تفاوت معنی دار.

**, *, ns: Significantly difference at the 1 and 5% of probability level, and non-significantly difference, respectively.

فلورسانس کلروفیل

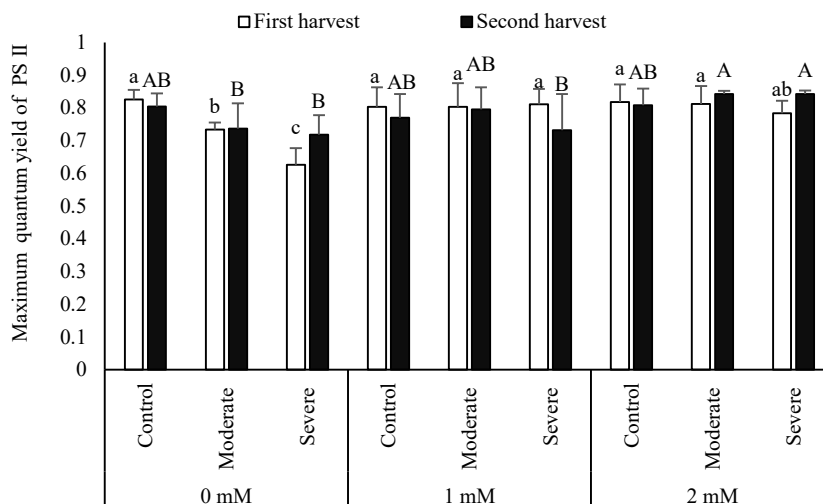
کارایی کوانتیمی فتوسیستم دو کاهش می‌یابد که این نشان دهنده آسیب به پروتئین‌ها و کمپلکس‌های برداشت کننده نور در فتوسیستم دو می‌باشد. در نتیجه مراکز باز واکنشی فتوسیستم دو کاهش می‌یابد (Baghbani arani *et al.*, 2017). در تأیید این گفته‌ها، در گیاه نخود نشان داده شده است که با افزایش سطح تنش کم آبی، حداکثر کارایی کوانتیمی فتوسیستم دو کاهش می‌یابد (Hosseinzadeh *et al.*, 2018). کاهش فلورسانس حداکثر، کاهش حداکثر کارایی کوانتیمی فتوسیستم دو و افزایش فلورسانس حداقل در شرایط تنش کم آبی در گیاه دارویی شنبلیله نیز گزارش شده است (Baghbani arani *et al.*, 2017). بر همین اساس تأثیر مثبت سیتروپن در جلوگیری از آسیب فتوسیستم و افت کارایی کوانتیمی آن را می‌توان به تحریک سیستم دفاع آنتی‌اکسیدان برای جاروب کردن رادیکال‌های آزاد و تأمین نیتروژن و کربن برای مصرف گیاه در شرایط بسته شدن روزنه‌ها و اختلال در جذب عناصر ناشی از تنش آبی نسبت داد. آمینو اسیدها نه تنها به عنوان مخزن نیتروژن سلول عمل می‌کنند، بلکه نقش‌های مهم آن‌ها در فرایندهای فیزیولوژیکی نظیر رشد، نمو، همانند سازی و پاسخ‌های سیگنالی به تنش‌های محیطی به خوبی ثابت شده است (Dutta *et al.*, 2018). گیاهان تحت شرایط تنش برای غلبه بر ناهنجاری پسابیدگی آمینو اسیدها را تجمع می‌دهند (Kusvuran *et al.*, 2013). در کنار نقش ساختاری آمینو اسیدها در بنا کردن اسکلت پروتئین‌ها، تجزیه نیز آن‌ها می‌تواند در طی تنش کم آبی و کمبود کربن و نیتروژن برای تأمین انرژی و ساخت متابولیت‌های ثانویه وارد عمل شود (Hildbranti *et al.*, 2015).

نتایج تجزیه واریانس نشان داد تأثیر سیتروپن، تنش کم آبی و اثر متقابل آنها بر حداکثر کارایی کوانتیمی فتوسیستم دو (F_v/F_m) در سطح احتمال یک درصد معنی دار بود. همچنین حداقل فلورسانس (F_0) و فلورسانس متغیر (F_v) نیز در سطح احتمال پنج درصد از سیتروپن تأثیر معنی دار پذیرفتند. فاکتور زمان برداشت برای هیچکدام از صفات تأثیر معنی داری نداشت (جدول ۷). بر اساس نتایج مقایسه میانگین، حداکثر کارایی کوانتیمی فتوسیستم دو (F_v/F_m) در هر دو برداشت با افزایش سطوح تنش کم آبی کاهش معناداری نشان داد (جدول ۶). در برداشت اول کاربرد سیتروپن در غلظت یک میلی مولار و در برداشت دوم کاربرد غلظت دو میلی مولار آن سبب جلوگیری از افت این شاخص در شرایط تنش کم آبی متوسط و شدید گردید. فلورسانس متغیر نیز در تیمار دو میلی مولار سیتروپن افزایش معناداری را در مقایسه با شاهد نشان داد، اما سیتروپن در سطح دو میلی مولار کاهش معناداری را نسبت به شاهد در مورد شاخص فلورسانس حداقل ایجاد نمود، تنش کم آبی شدید نیز سبب افزایش معنادار آن نسبت به شاهد شد (شکل‌های ۵ و ۶). کلروفیل فلورسانس یکی دیگر از مکانیسم‌های حفاظت از فتوسیستم‌ها می‌باشد که تحت شرایط تنش کم آبی افزایش می‌یابد و با توزیع انرژی بین فتوسیستم‌ها به واسطه فعال سازی مقصد الکترونی جایگزین نقش مهمی را در ایجاد سازگاری به تنش ایفا می‌کند (Kalaji *et al.*, 2016). وقتی سطح تنش افزایش می‌یابد، به دلیل شوک اکسیداتیو یک افزایش در حداقل فلورسانس رخ می‌دهد، اما فلورسانس حداکثر و حداکثر

جدول ۷. نتایج تجزیه واریانس اثر سیتروپن و تنش کم آبی بر پارامترهای فلورسانس کلروفیل و نشت یونی زوفا.
Table 7. Results of variance analysis effect of citrulline and water deficit stress on chlorophyll fluorescence parameters related to hyssop.

Sources of variance	df	Means of squares				
		F_v	F_m	F_0	F_v/F_m	Electrolyte leakage
Block	2	43479.86	41407.48	1765.31	0.0036	13.018
Citrulline (C)	2	96544.9*	35150.7	15808.61*	0.038**	46.46
Water deficit stress (S)	2	13926.7	4387.03	9277.37	0.020**	87.62
S×C	4	40344.1	27281.78	5799.52	0.016**	38.68
Main Error	16	24861.15	20343.52	1073.09	0.0026	115.45
Time of Harvest (T)	1	756.9	6035.21	392.71	3.6	39.18
C×T	2	47388.9	74111.41	10334.08	0.0090	22.90
S×T	2	9603.63	23382.41	6086.57	0.0039	14.74
S×C×T	4	9970.16	10614.06	3528.89	0.0060	67.79
CV%	-	19.31	16.34	12.85	7.45	33.01

***, **, * و ns: به ترتیب تفاوت معنی دار در سطح احتمال ۱ و ۵ درصد و نبود تفاوت معنی دار. ns, **, *, ns: Significantly difference at 1 and 5% of probability level, and non-significantly difference, respectively.



شکل ۱. مقایسه میانگین اثر متقابل سیتروکلین و تنش کم آبی بر حداکثر کارایی کوانتمی فتوسیستم دو در زوفا. در هر تیمار مقادیر با حروف یکسان تفاوت معنی داری با یکدیگر ندارند.

Figure 1. Mean comparison of interaction effect of citrulline and water deficit stress on maximum quantum yield of PS II parameter in hyssop. In each treatments, values with same letter does not have significant difference.

جدول ۸. جدول تجزیه همبستگی پیرسون برای شاخص‌های فیزیولوژیکی زوفا.

Table 8. Pearson correlation analysis for physiological indices in hyssop.

Traits	EL	RWC	PH	LA	DW	FW	SPAD	Chl. A	Chl. A/B	Ant	F ₀	F _V	F _M	F _V /F _M
EL	1													
RWC	0.237	1												
PH	0.417	-0.266	1											
LA	-0.191	0.283	-0.265	1										
DW	0.250	0.666**	-0.341	0.425	1									
FW	-0.48*	-0.141	0.89**	-0.192	-0.248	1								
SPAD	-0.060	0.623**	-0.364	0.77**	0.464	-0.240	1							
Chl A	0.333	0.590**	0.78**	0.538*	0.638**	-0.64**	0.586*	1						
Chl. A/B	0.145	0.772**	-0.329	0.486*	0.626**	-0.212	0.69**	0.722**	1					
Ant	-0.112	-0.063	0.69**	-0.57*	-0.369	0.61**	-0.47*	-0.67**	-0.368	1				
F ₀	0.097	-0.71**	0.046	-0.303	-0.402	-0.073	-0.54*	-0.400	-0.56*	0.016	1			
F _V	-0.035	0.644**	-0.085	0.307	0.567**	0.102	0.336	0.382	0.442	-0.028	-0.46	1		
F _M	0.129	-0.082	0.271	-0.175	0.121	0.239	-0.312	-0.151	-0.200	0.219	-0.06	-0.092	1	
F _V /F _M	0.034	0.784**	0.032	0.389	0.506*	0.187	0.569*	0.390	0.589*	0.068	-0.87**	0.71**	0.029	1

*: Significantly difference at 5% probability level. **: Significantly difference at 1 % probability level. EL: electrolyte leakage, RWC: relative water content, PH: plant height, LA: leaf area, DW: dry weight, FW: fresh weight, Chl: chlorophyll, Ant: anthocyanines.

کلروفیل کل و ارتفاع گیاه گردد. کاربرد سیتروکلین در غلظت دو میلی مولار نسبت به غلظت یک میلی مولار، تأثیر بهتری بر افزایش محتوای کلروفیل کل، نسبت کلروفیل آ/ب، محتوای کلروفیل آ، مقدار آنتوسیانین‌ها و محتوی نسبی آب داشت. از آنجایی که مطالعات بسیار زیادی تأثیر مثبت بسیاری از الیسیستورهای متابولیکی را در بهبود عملکرد فیزیولوژیکی و متابولیکی گیاهان دارویی را تایید کرده‌اند، بنابراین کاربرد سیتروکلین به عنوان یک محرک متابولیکی در غلظت‌های پایین (در حد چند میلی مولار) و در مقیاس وسیع جهت بهبود بازده اسانس و شاخص‌های رشد گیاهان دارویی می‌تواند توصیه شود.

نتیجه‌گیری کلی

تنش کم آبی یکی از فاکتورهای مهم اثرگذار بر کیفیت و کمیت اسانس معطر زوفا است. نتایج نشان داد تنش کم آبی مقدار اسانس را کاهش می‌دهد. در بحث گیاهان دارویی اسانس‌دار آنچه که مهم است عملکرد نهایی اسانس آن‌ها است که از دو فاکتور تأثیر می‌گیرد: ۱- میزان تولید ماده گیاهی ۲- درصد یا بازده اسانس. نتایج نشان داد سیتروکلین در غلظت دو میلی مولار تأثیر بهتری بر جلوگیری از کاهش بازده اسانس (با افزایش ۱۵ درصدی در برداشت اول و ۳۰ درصدی در برداشت دوم) داشت. همچنین تنش کم آبی شدید توانست سبب کاهش معنادار بازده اسانس، وزن تر، سطح برگ، محتوی

REFERENCES

- Ahmadi, H., Sarcheshmeh, M. A. A., Morshedloo, M. R., & Shokrpour, M. (2020). Effects of exogenous application of citrulline on prolonged water stress damages in hyssop (*Hyssopus officinalis* L.): Antioxidant activity, biochemical indices, and essential oils profile. *Food Chemistry*, 333, 127433.
- Allen, R. G., Pereira, L. S., Raes, D., & Smith, M. (1998). Crop evapotranspiration-guidelines for computing crop water requirements-FAO Irrigation and drainage paper 56. *Fao, Rome*, 300(9), D05109.
- Arnon, D. I. (1949). Copper enzymes in isolated chloroplasts in *Beta vulgaris*. *Plant Physiology*, 24(1), 1.
- Askari, E. & Ehsanzadeh, P. (2015). Osmoregulation-mediated differential responses of field-grown fennel genotypes to drought. *Industrial Crops and Products*, 76, 494-508.
- Babalar, M., Askari, M.A., Naderi, R., Kafi, M., Yazdani, H., Ahmadi, A., Zolfaghari, M., Salehi, F., Goodarzi, M.A., Panahi, H., Shahlay, G. & Memartadbiri, M. (2009). Zeoponics and phosphorous nutrition from Iranian apatite. *Final Report Research and Applied Project of Presidency*. 50 pp.
- Baghbani-Arani, A., Modarres-Sanavy, S. A. M., Mashhadi-Akbar-Boojar, M. & Mokhtassi-Bidgoli, A. (2017). Towards improving the agronomic performance, chlorophyll fluorescence parameters and pigments in fenugreek using zeolite and vermicompost under deficit water stress. *Industrial Crops and Products*, 109, 346-357.
- Baghizadeh, A., Mahleghah, G., Mahmood, H. M. R., & Hossein, M. (2009). Evaluation of interaction effect of drought stress with ascorbate and salicylic acid on some of physiological and biochemical parameters in okra (*Hibiscus esculentus* L.). *Research Journal of Biological Science*, 4, 380-387.
- Biglouie, M.H., Assimi, M.H. & Akbarzadeh, A. (2010). Effect of water stress at different stages on quantity and quality traits of virginia (flue cured) tobacco type. *Plant Soil Environment*, 56 (2), 67-75.
- Darvizheh, H., Zahedi, M., Abbaszadeh, B., & Razmjoo, J. (2019). Changes in some antioxidant enzymes and physiological indices of purple coneflower (*Echinacea purpurea* L.) in response to water deficit and foliar application of salicylic acid and spermine under field condition. *Scientia Horticulturae*, 247, 390-399.
- Daşgan, H.Y., Kuşvuran, S. & Abak, K. (2009). The relationship between citrulline accumulation and salt tolerance during the vegetative growth of melon (*Cucumis melo* L.), *Plant Environment Science*, 55 (2), 51-57.
- Dutta, T., Neelapu, N. R., Wani, S. H. & Challa, S. (2018). Compatible solute engineering of crop plants for improved tolerance toward abiotic stresses. In: S. H. Wani (Ed.), *Biochemical, physiological and molecular avenues for combating abiotic stress tolerance in plants*. (pp. 221-254). Academic Press.
- Ghassemi, S., Ghassemi-Golezani, K., & Salmasi, S. Z. (2019). Changes in antioxidant enzymes activities and physiological traits of ajowan in response to water stress and hormonal application. *Scientia Horticulturae*, 246, 957-964.
- Gupta, D. K., Palma, J. M. & Corpas, F. J. (2018). *Antioxidants and antioxidant enzymes in higher plants*. Springer International Publishing.
- Hildebrandt, T. M., Nesi, A. N., Araújo, W. L. & Braun, H. P. (2015). Amino acid catabolism in plants. *Molecular Plant*, 8(11), 1563-1579.
- Hosseinzadeh, S. R., Amiri, H. & Ismaili, A. (2018). Evaluation of photosynthesis, physiological, and biochemical responses of chickpea (*Cicer arietinum* L. cv. Pirouz) under water deficit stress and use of vermicompost fertilizer. *Journal of Integrative Agriculture*, 17(11), 2426-2437.
- Iqbal, N., Nazar, R. & Khan, N. A. (2015). *Osmolytes and plants acclimation to changing environment: Emerging omics technologies*. Springer.
- Jaleel, C. A., Manivannan, P., Lakshmanan, G. M. A., Gomathinayagam, M. & Panneerselvam, R. (2008). Alterations in morphological parameters and photosynthetic pigment responses of *Catharanthus roseus* under soil water deficits. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 61(2), 298-303.
- Judžentienė, A. (2016). Hyssop (*Hyssopus officinalis* L.) Oils. In: V. R. Preedy (Ed.), *Essential oils in food preservation, flavor and safety*. (pp. 470-480). Academic Press.
- Kalaji, H. M., Jajoo, A., Oukarroum, A., Brestic, M., Zivcak, M., Samborska, I. A. & Ladle, R. J. (2016). Chlorophyll a fluorescence as a tool to monitor physiological status of plants under abiotic stress conditions. *Acta Physiologiae Plantarum*, 38(4), 102.
- Khazaie, H. R., Nadjafi, F. & Bannayan, M. (2008). Effect of irrigation frequency and planting density on herbage biomass and oil production of thyme (*Thymus vulgaris*) and hyssop (*Hyssopus officinalis*). *Industrial Crops and Products*, 27(3), 315-321.

21. Khorasaninejad, S., Alizadeh Ahmadabadi, A., & Hemmati, K. (2018). The effect of humic acid on leaf morphophysiological and phytochemical properties of *Echinacea purpurea* L. under water deficit stress. *Scientia Horticulturae*, 239, 314-323.
22. Kulak, M., Ozkan, A., & Bindak, R. (2019). A bibliometric analysis of the essential oil-bearing plants exposed to the water stress: How long way we have come and how much further? *Scientia Horticulturae*, 246, 418-436.
23. Kusvuran, S., Dasgan, H. Y. & Abak, K. (2013). Citrulline is an important biochemical indicator in tolerance to saline and drought stresses in melon. *The Scientific World Journal*, 2013, 1-8.
24. Madani, B., Mirshekari, A. & Imahori, Y. (2019). Physiological responses to stress. In: E. M. Yahia & A. Carrillo-Lopez (Eds). *Postharvest physiology and biochemistry of fruits and vegetables*. (pp. 405-422). Woodhead Publishing.
25. Mohammadi, H., Amirikia, F., Ghorbanpour, M., Fatehi, F. & Hashempour, H. (2019). Salicylic acid induced changes in physiological traits and essential oil constituents in different ecotypes of *Thymus kotschyanus* and *Thymus vulgaris* under well-watered and water stress conditions. *Industrial Crops and Products*, 129, 561-574.
26. Moosavi, S. G. R., Ramazani, S. H. R., Hemayati, S. S. & Gholizade, H. (2017). Effect of drought stress on root yield and some morpho-physiological traits in different genotypes of sugar beet (*Beta vulgaris* L.). *Journal of Crop Science and Biotechnology*, 20 (3), 167-174.
27. *Polish pharmacopoeia*, VII. (2006). PTFarm. Warsaw, Poland.
28. Sharifi, P. (2017). The Effect of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR), salicylic acid and drought stress on growth indices, the chlorophyll and essential oil of hyssop (*Hyssopus officinalis*). *Biosciences Biotechnology Research Asia*, 14 (3). 1033-1042.
29. Sullivan, C.Y. & Ross, W.M., (1979). Selecting for drought and heat resistance in grain sorghum In: H. Mussell & RC Staples (Ed), *Stress Physiology in Crop Plant*. (pp.263–281.). John Wiley & Sons, New York.
30. Venditti, A., Bianco, A., Frezza, C., Conti, F., Bini, L.M., Giuliani, C., Bramucci, M., Quassinti, L., Damiano, S., Lupidi, G. & Beghelli, D. (2015). Essential oil composition, polar compounds, glandular trichomes and biological activity of *Hyssopus officinalis* subsp. *aristatus* (Godr.) Nyman from central Italy. *Industrial Crops and Products*, 77, 353-363.
31. Wagner, G.J. (1979). Content and vacuole/extra vacuole distribution of neutral sugars free amino acids, and anthocyanins in protoplast. *Plant Physiology*, 64, 88-93.
32. Xu, Ch. & Leskovar, D.I. (2015). Effects of *A. nodosum* seaweed extracts on spinach growth, physiology and nutrition value under drought stress. *Scientia Horticulturea*, 183, 39–47.
33. Yadav, R.K., Sangwan, R.S., Sabir, F., Srivastava, A.K. & Sangwan, N.S. (2014). Effect of prolonged water stress on secondary metabolites, peltate glandular trichomes, and pathway gene expression in *Artemisia annua* L. *Plant Physiology and Biochemistry*, 74, 70-83.
34. Yokota, A., Kawasaki, S., Iwano, M., Nakamura, C., Miyake, C. & Akashi, K. (2002). Citrulline and DRIP-1 protein (ArgE homologue) in drought tolerance of wild watermelon. *Annals of Botany*, 89 (7), 825-832
35. Zali, A. G., & Ehsanzadeh, P. (2018). Exogenous proline improves osmoregulation, physiological functions, essential oil, and seed yield of fennel. *Industrial Crops and Products*, 111, 133-140.