بررسی اثر محلول پاشی کیتوزان بر کمیت و کیفیت اسانس گیاه دارویی *Hyssopus officinalis* L. subsp. *angustifolius* Bieb. تحت رژیم‌های مختلف آبیاری

سیدمحمد علوی سامانی[۱]، عبداله قاسمی پیربلوطی[۲*]، فاطمه ملک‌پور[۳]

[۱]دانشجوی دکتری، گروه گیاهان دارویی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران

[۲]استاد، مرکز تحقیقات گیاهان دارویی، واحد شهرقدس، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

[۳]استادیار، گروه زیست‌شناسی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران

تاریخ دریافت: ۹۹/۱۰/۲۰ ؛ تاریخ پذیرش: ۰۰/۳/۲

چکیده

کیتوزان پلی ساکارید گلوسامین مشتق شده از کیتین است که به‌عنوان بیوالیسیتور برای بهبود بیوسنتز متابولیت های ثانویه از آن استفاده می شود. برای بررسی اثر الیسیتور کیتوزان بر کمیت و کیفیت اسانس گیاه دارویی گیاه زوفا *Hyssopus officinalis* L. subsp. *angustifolius* Bieb. از تیره نعناعیان تحت شرایط مختلف رطوبتی در مرکز تحقیقات گیاهان دارویی دانشگاه آزاد اسلامی شهرکرد در سال زراعی ۱۳۹۷-۱۳۹۶، آزمایشی به صورت دو عامله در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی در چهار تکرار مورد بررسی قرار گرفت. فاکتورهای آزمایش شامل غلظت های مختلف کیتوزان در ۳ سطح صفر و ۰/۲۵ و ۰/۵۰ گرم در لیتر و رژیم‌های آبیاری با فواصل ۴، ۶ و ۱۰ روزه بودند. اسانس سرشاخه‌های گل‌دار گیاه با دستگاه کلونجر، به روش تقطیر با آب استخراج و توسط دستگاه GC/MS مورد آنالیز فیتوشیمیایی قرار گرفت. مهمترین ترکیبات اسانس زوفا در این تحقیق *ترانس* - پینوکامفون ، سیس- پینوکامفون، بتا-پینن، میرتنول و آلفا-پینن بودند. نتایج نشان داد که اثر غلظت‌های مختلف کیتوزان و رژیم‌های آبیاری بر میزان عملکرد اسانس زوفا معنی‌دار ($P<0.01$) بود. غلظت‌های مختلف محلول پاشی کیتوزان اثر معنی‌داری ($P< 0.01$) بر میزان ترکیبات مهم اسانس از جمله *ترانس* -پینوکامفون، سیس- پینوکامفون و میرتنول داشت. هم‌چنین رژیم‌های مختلف آبیاری اثر معنی داری بر میزان ترکیبات از جمله آلفاتوجن، دلتا-کارن، *ترانس* -پینوکامفون، سیس-پینوکامفون ($P<0.01$) و سابینن، آلفا-پینن و بتا-پینن ($P<0.05$) داشت. نتایج نشان می دهد بالاترین میزان عملکرد اسانس و ترکیب سیس- پینوکامفون، به عنوان مهم‌ترین ترکیب اسانس زوفا، از کیتوزان ۰/۵ گرم در لیتر و آبیاری ۱۰ روز یک‌بار به دست آمده است. احتمالاً چنین به نظر می رسد که افزایش فواصل دوره آبیاری و استفاده از محلول‌پاشی کیتوزان می‌تواند در افزایش عملکرد و ویژگی‌های کمی و کیفی اسانس گیاه دارویی زوفا موثر باشد.

واژه‌های کلیدی: اسانس، ترانس-پینوکامفون، زوفا، سیس-پینوکامفون.،کیتوزان.

*نویسنده مسئول: ghasemi955@yahoo.com

مقدمه

زوفا با نام علمی *Hyssopus officinalis* L. گیاهی چند ساله و متعلق به خانواده نعناعیان است که از شرق مدیترانه تا آسیای میانه انتشار دارد و در کشورهای مرکزی و جنوب اروپا از جمله روسیه، اسپانیا، فرانسه، یوگوسلاوی، هلند، مجارستان و ایتالیا کشت می‌شود. استفاده از آن در طب سنتی به عنوان بادشکن، نیروبخش، ضدعفونی کننده، خلط آور و ضد سرفه، رفع ناراحتی‌های عصبی و افسردگی و درمان سرماخوردگی سابقه طولانی دارد (Fathiazad et al., 2011; Ghassemi Pirbalouti et al., 2013; Said-Al et al., 2015). در صنایع غذایی از آن به عنوان چاشنی برای طعم دار کردن نوشیدنی‌ها و فرآورده‌های گوشتی استفاده می‌شود (Ghasemi Pirbalouti et al., 2019). علاوه بر آن در صنایع آرایشی و بهداشتی هم کاربرد فراوان دارد (Said-Al et al., 2015; Srivastava et al., 2018). گونه مهم زوفا در ایران با نام علمی *Hyssopus officinalis* L. subsp. (Bieb.) *angustifolius* در برخی از نقاط ایران روییده و کشت می‌شود که اندام‌های هوایی آن در طب سنتی برای درمان آسم، برونشیت، زخم‌ها و به‌عنوان بادشکن و ضدعفونی کننده استفاده می شود (Ghasemi Pirbalouti et al., 2019). دمنوش تهیه شده از زوفا برای درمان اختلالات عصبی و دندان درد مؤثر است. عصاره برگ‌ها دارای فعالیت ضدمیکروبی، ضد اسپاسم و ضد ویروسی قوی در برابر HIV است (Said-Al et al., 2015). در مورد شناسایی ترکیبات شیمیایی زوفا، خواص ضد میکروبی و فعالیت آنتی اکسیدانی آن پژوهش‌های زیادی صورت گرفته و در بیشتر تحقیقات *سیس* - پینوکامفون، *ترانس* - پینوکامفون، *ایزو*- پینوکامفون و بتا- پینن به عنوان ترکیبات غالب گزارش شده است (Srivastava et al., 2018; Pradhan et al., 2017; Tavakoli and Aghajani, 2016; Zawiślak, 2013; Ahmadi et al., 2021).

خواص ضد قارچی و ضد باکتریایی به وجود پینوکامفون، ایزو-پینوکامفن و بتا-پینن نسبت داده می‌شود. فعالیت ضد ویروسی آن ممکن است مربوط به وجود ترکیباتی مثل کافییک اسید، تانن‌ها و ترکیبات ناشناخته با وزن مولکولی بالا باشد. مقدار زیاد اسیدهای فنلی موجود در عصاره‌های فنلی آن ممکن است عامل فعالیت آنتی اکسیدانی آن باشد. علاوه بر این گیاه تازه زوفا حاوی مقدار زیادی ویتامین C است (Srivastava et al., 2018; Said-Al et al., 2015).

در گیاهان دارویی و معطر، بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه مانند اسانس تحت تأثیر عوامل وراثتی یا ژنتیکی (ژنوتیپ، رقم، شیمیوتیپ، زیر گونه و مرحله فنولوژیکی)، عوامل محیطی (جغرافیایی، اکولوژیکی، اقلیمی، ادافیکی و مدیریتی از زراعت تا فرآیندهای پس از برداشت) و اثرات متقابل آن‌ها می‌باشد (Ghasemi Pirbalouti and Craker, 2015; Bakhtiar et al., 2021; Moghaddam and Ghasemi Pirbalouti, 2017; Saebi et al., 2021). از بین عوامل بوم‌شناسی، تنش‌های محیطی زنده و غیر زنده به ویژه تنش خشکی در بیوسنتز ترکیبات ثانویه نقش بسیار مهمی دارد (Babaei et al., 2021; Khosh Eqbal et al., 2020; Ahmadi et al., 2021). در همین راستا، نتایج پژوهش‌های مختلف نشان می‌دهد که تنش کم آبیاری و یا تنش خشکی کیفیت و کمیت مواد موثره در گیاهان دارویی و معطر را تحت تأثیر قرار می دهد و مشخص شده است که در اغلب گیاهان دارویی و معطر ماده موثره نظیر اسانس با القای تنش خشکی از نظر کمیت ارتقا می‌یابد (Ghasemi Pirbalouti et al., 2015; Malekpoor et al., 2017; Babaei et al., 2021; Ahmadi et al., 2021; Khosh Eqbal et al., 2020).

از طرف دیگر استفاده از القاکننده‌ها (الیسیتورها) یکی از روش‌های مدیریتی است که می‌توانند تغییرات فیزیولوژیکی را در گیاهان القا می‌کنند در همین راستا، الیسیتورهای زیستی نقش موثری در افزایش کمیت و کیفیت مواد موثره گیاهان دارویی و معطر داشته‌اند (Emami Bistgani et al., 2017; Goudarzian et al., 2020). کیتوزان یک نوع پلی ساکارید به عنوان یک القا کننده زیستی در بیوسنتز ترکیبات ثانویه در گونه‌های متعددی در گیاهان دارویی و معطر تایید شده است (Goudarzian et al., 2020; Emami Bistgani et al., 2017; Ghassemi Pirbalouti et al., 2017). برای مثال نتایج مطالعه‌ای مشخص کرد که محلول پاشی کیتوزان سبب ارتقای مواد موثره فنلی در کتان *Linum album* L. شده است (Esmaeilzadeh Bahabadi et al., 2012).

با توجه به این‌که تا به حال مطالعه چندانی در ایران در زمینه اثر فراوانی آبیاری و محلول‌پاشی کیتوزان بر ترکیبات فیتوشیمیایی گیاه زوفا صورت نگرفته است. تحقیق حاضر به منظور بررسی اثر فراوانی آبیاری و محلول پاشی الیسیتور کیتوزان بر کمیت و کیفیت مواد موثره و عملکرد اسانس زوفا انجام شد.

مواد و روش‌ها

منطقه مورد مطالعه: این تحقیق در سال زراعی ۱۳۹۸-۱۳۹۷ در مرکز تحقیقات گیاهان دارویی، رحمتیه، دانشگاه آزاد اسلامی شهرکرد اجرا گردید. مزرعه دارای عرض جغرافیایی ۳۲ درجه و ۲۰ دقیقه، طول جغرافیایی ۵۰ درجه و ۵۱ دقیقه و ارتفاع ۲۰۷۰ متر از سطح دریا می‌باشد. آب و هوای منطقه مورد مطالعه سرد، نسبتاً خشک و نیمه مرطوب با تابستان معتدل بر اساس روش آب و هواشناسی امبرگر و زمستان خیلی سرد بر اساس روش آب و هواشناسی کریمی می‌باشد (IRIMO, 2012). برخی ویژگی‌های اقلیمی در جدول ۱ آمده است.

جدول ۱: خصوصیات اقلیمی ایستگاه هواشناسی شهرستان شهرکرد در سال مورد آزمایش

مجموع بارندگی سالیانه (میلی‌متر)	متوسط رطوبت نسبی (درصد)	حداقل مطلق دما (درجه سانتی گراد)	حداکثرمطلق دما	میانگین دمای روزانه
۳۱۹	۴۶	-۳۲	۴۲	۱۱/۸

خصوصیات ادافیکی (خاک‌شناسی) و آب منطقه مورد مطالعه: به‌منظور ارزیابی مهمترین ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی خاک منطقه مورد مطالعه، نمونه‌های تصادفی خاک (۳۰-۰ سانتی‌متر) با تکرار برداشته شد و به آزمایشگاه خاک‌شناسی منتقل- گردید. هم‌چنین آب مورد استفاده برای آبیاری نیز به مرکز تحقیقات انتقال داده شد و مورد سنجش قرار گرفت. نتایج آزمون‌ها در جدول ۲ و ۳ آمده است.

کاشت گیاه: برای انجام این تحقیق، نشاءهای زوفا از مرکز تحقیقات کشاورزی اصفهان تهیه گردید. زمین مورد نظر در پاییز شخم زده شده و سپس در بهار پس از مساعد شدن شرایط آب و هوایی کرت‌ها با فاصله ۱/۵ متر از هم‌دیگر آماده و سپس هر کدام از کرت‌ها به سه قسمت مساوی به عرض حدود ۲ متر با فاصله ۰/۵ متر از هم دیگر مجزا و منقسم و آماده به کشت شدند. جهت انجام کار عمود بر شیب زمین بود.

طرح آزمایش و تیمارها: آزمایش دو عامله در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی با دو عامل شامل محلول‌پاشی کیتوزان (۳ سطح) و رژیم آبیاری (سه سطح) در چهار تکرار انجام شد. تیمارهای مورد استفاده محلول پاشی کیتوزان در سه سطح صفر C_0، ۰/۲۵ C_1 و ۰/۵ C_2 (گرم در لیتر) و سه رژیم آبیاری شامل: I_1: دور آبیاری ۴ روز یکبار، I_2: دور آبیاری ۶ روز یک‌بار، I_3 : دور آبیاری ۱۰ روز یک‌بار بر روی گیاه دارویی زوفا انجام شد. ابتدا پودر کیتوزان در استیک اسید ۵ درصد حل شده و سپس در آب مقطر با غلظت‌های مختلف حل شد. در تیمار شاهد صرفاً حلال (اسید استیک) و آب بر روی برگ‌ها محلول پاشی شد. جهت اعمال تیمار محلول پاشی کیتوزان حدود دو ماه بعد از استقرار و نشاءها ورشد رویشی بوته‌های زوفا در سه مرحله قبل از گلدهی، شروع گلدهی و ۵۰٪ گلدهی محلول پاشی بر روی شاخ و برگ صورت گرفت.

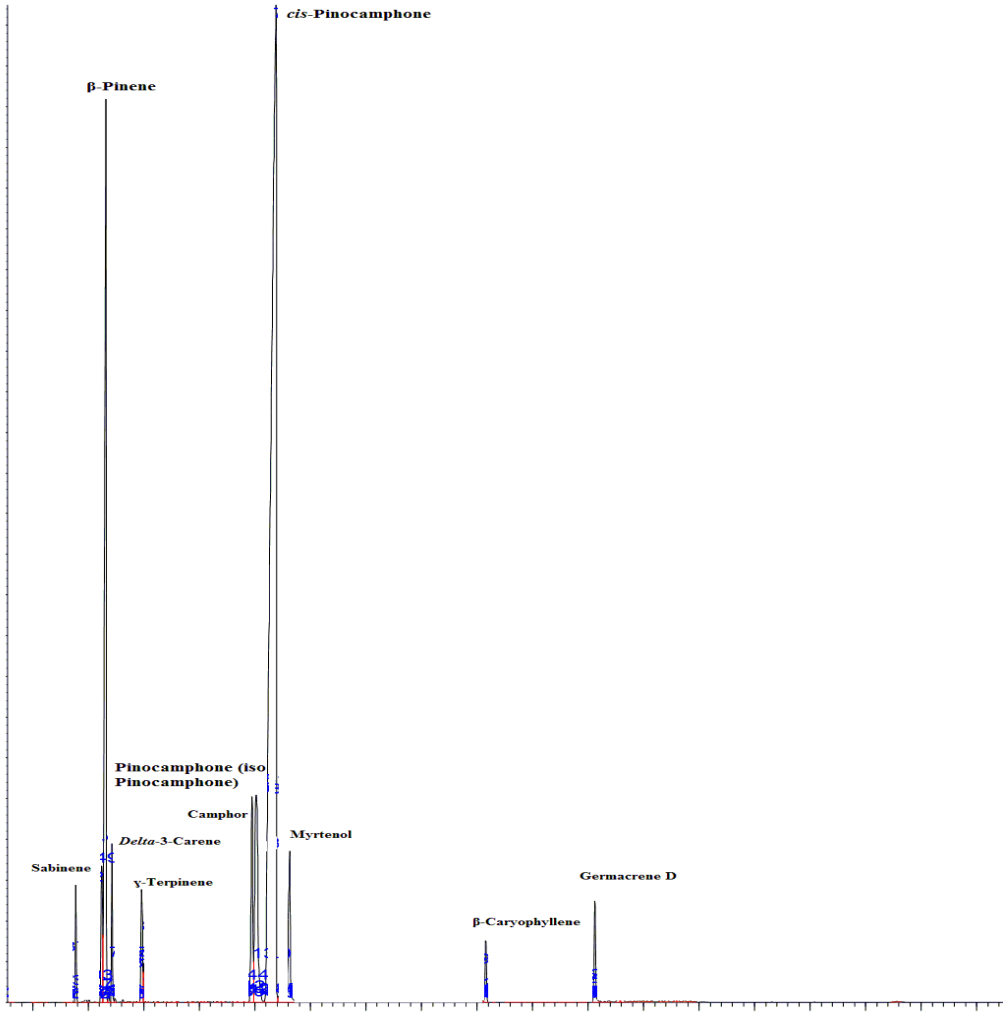
اسانس‌گیری: از هر واحد آزمایشی یک نمونه ۱۰۰ گرمی اندام‌های هوایی گیاهان خشک شده برداشت شد و به روش تقطیر به کمک کلونجر اسانس گیری انجام شد (British Pharmacopoeia, 1988). حجم اسانس به‌دست آمده به دقت یادداشت شد و در ظرف‌های مخصوص تا زمان تجزیه در یخچال نگهداری شد.

تجزیه فیتوشیمیایی اسانس: ترکیبات اسانس زوفا با دستگاه GC مدل Agilent 7890 A و نوع ستون 5% HP-5 MS (طول ستون ۳۰m، قطر داخلی ستون µm ۰/۲۵، قطر بیرونی ستون mm ۰/۲۵) انجام شد. گاز هلیوم با سرعت ۰/۸ میلی لیتر در دقیقه جریان داشت. دمای اولیه ستون ۶۰ درجه سانتی‌گراد و دمای نهایی ستون ۲۸۰ درجه سانتی‌گراد بود. برنامه‌ریزی دمایی به صورت ۴ درجه سانتی‌گراد در دقیقه برنامه‌ریزی شد. نسبت جداسازی به صورت اسپیلت به نسبت ۱ به ۱۰۰ تنظیم شد. دمای تزریق کننده ۳۰۰ درجه سانتی‌گراد بود. میزان ۰/۱ میکرولیتر اسانس به دستگاه تزریق شد. تجزیه MS توسط دستگاه Agilent 5975 C انجام شد. انرژی یونیزاسیون در طیف‌سنج جرمی ۷۰ الکترون ولت انتخاب شد. طیف جرمی از m/z ۵۰-۵۵۰ بود. شاخص‌های بازداری (IR) برای تمام اجزا با استفاده از یک‌سری هومولوگ از *ان* – الکان‌ها (C_5 - C_{25}) که در شرایط مشابه نمونه‌ها تزریق شدند، محاسبه گردید. شناسایی طیف‌ها به کمک شاخص بازداری آن‌ها و مقایسه آن با شاخص های موجود در کتب مرجع (Adams, 2007) صورت گرفت.

تجزیه آماری: داده‌ها با استفاده از نرم افزار آماری SPSS تجزیه شدند. مقایسه میانگین‌ها به روش دانکن ($P \leq 0.05$) انجام شد و نمودارها به کمک Excel 2013 رسم شدند.

نتایج

عملکرد اسانس: اسانس به‌دست آمده از روش تقطیر با آب گیاه زوفا تحت تیمارهای مختلف کیتوزان و رژیم های مختلف آبیاری، مایع شفاف و زردرنگ بود. نتایج نشان داد که اثرات غلظت‌های مختلف کیتوزان و رژیم‌های آبیاری بر میزان عملکرد اسانس زوفا معنی‌دار ($P<0.01$) بود (جدول ۵). بالاترین میزان عملکرد اسانس مربوط به تیمار C_3 و I_3 می‌باشد (جدول ۵) . **میزان و نوع ترکیبات شیمیایی اسانس**: ترکیبات شیمیایی اسانس توسط GC و GC/MS شناسایی گردید. مهمترین ترکیبات اسانس زوفا در این تحقیق *ترانس*-پینوکامفون، سیس-پینوکامفون و میرتنول، بتا- پینن، آلفا- توجن، آلفا-پینن، سابینن، دلتا-۳- کارن و کامفور بودند (جدول ۴ و شکل ۱).



شکل ۱- کروماتوگرام یا TIC اسانس گیاه زوفا تحت تیمار رژیم ابیاری × محلول پاشی کیتوزان

مهمترین رده ترکیبات اسانس از نوع مونوترپن‌های اکسیژنه هستند. نتایج تجزیه واریانس مندرج در جدول ۴ حاکی از آن است که غلظت‌های مختلف کیتوزان اثرات معنی داری بر میزان برخی ترکیبات مهم اسانس زوفا از جمله *ترانس*-پینوکامفون، سیس- پینوکامفون و میرتنول ($P < 0.01$) در مقایسه با شاهد داشته است. هم‌چنین رژیم‌های مختلف آبیاری اثرات معنی‌داری بر میزان برخی ترکیبات از جمله آلفا-توجن، دلتا-کارن، *ترانس*-پینوکامفون، سیس- پینوکامفون ($P< 0.01$) و سابینن، آلفاپینن و بتاپینن ($P< 0.05$) داشت. در همین راستا، بیشترین میزان درصد ترکیب اصلی اسانس، سیس-پینوکامفون، از کیتوزان ۰/۵ گرم در لیتر و آبیاری ۱۰ روز یک‌بار در مقایسه با شرایط شاهد یا آبیاری نرمال (بدون تنش) به دست آمده است.

جدول ۲: خصوصیات خاک‌شناسی مزرعه تحقیقاتی دانشگاه آزاد اسلامی شهرکرد (محل تحقیق)

بافت خاک	رس (درصد)	سیلت (درصد)	شن (درصد)	E.C (dS/m)	pH	O.C %	T.N.V %	Total % N	P	K	Zn	Mn	Fe	Cu	B
									(mg/kg)						
رس-لومی	۳۲/۵	۳۸	۲۹/۵	۱/۱۴۳	۷/۹۶	۰/۱۱۷	۲۳/۵	۰/۰۱۱	۶/۵	۲۱۴	۰/۴۸	۹/۲۵	۳/۸۲	۰/۹۶	۱/۲۷

جدول ۳: خصوصیات آب آبیاری مزرعه تحقیقاتی دانشگاه آزاد اسلامی شهرکرد

pH	E.C (µs/cm)	TDS (mg/lit)	Na^+	K^+	Ca^{2+}	Mg^{2+}	Cl^-	HCO_3^-	CO_3^{2-}	SO_4^{2-}	Cd	Fe	Cu	Mn	Zn	NO_3^-
										(meq/lit)						
۸/۱۱	۳۸۷	۲۴۷/۹۳	۰/۷۶۳	۰/۰۱۶	۲/۲۸	۱/۴۳	۰/۹۱	۳/۴۲	۰/۲۱	۰/۰۰۱	۰	۰/۰۰۹	۰/۰۰۱	۰/۰۰۱	۰/۰۰۱	۲۳/۶۷

جدول ٤. تجزیه واریانس عملکرد اسانس و ترکیبات مهم شیمیایی اسانس زوفا

منابع تغییر (S.O.V)	درجه آزادی	میانگین مربعات (M.S)								
		عملکرد اسانس	آلفا-توجن	آلفا-پینن	سابینن	دلتا-کارن	بتا-پینن	سیس-پینوکامفون	کامفور	ترانس-پینوکامفون	میرتنول
محلول‌پاشی کیتوزان	۲	۴۴۳۷۷۱/۴**	۰/۰۳۷ns	۰/۰۰۲ ns	۱/۱۴ ns	۰/۷۱۶ ns	۶/۰۸ ns	۱۰۰/۷۳ **	۰/۰۸۸ ns	۴۸/۹۰ **	۸/۲۹ **
رژیم آبیاری	۲	۴۰۵۴۱۶/۴**	۰/۱۶۴ **	۰/۲۷۵*	۱/۸۷ *	۱/۳۶ **	۳۸/۲۲*	۲۲/۷**	۰/۰۶۰ ns	۵۳۵/۵۵ **	۰/۰۱۶ ns
کیتوزان × آبیاری	۴	۱۳۵۹۴/۱۹ ns	۰/۰۰۹ ns	۰/۰۶۲ ns	۰/۵۸۵ns	۰/۰۷۷ ns	۲/۵۶ ns	۱۷/۱۳ ns	۰/۰۲۰ns	۰/۲۸۵ **	۰/۱۲۷ ns
خطا	-	-	۰/۰۲۵	۰/۰۷۴	۰/۶۳۵	۰/۲۴	۱۰/۲۷	۷/۰۹	۰/۰۴۴	۲/۱۸	۰/۸۷

Ns: عدم اختلاف معنی دار، *: اختلاف معنی دار در سطح ۵ درصد، **: اختلاف معنی دار در سطح ۱ درصد

جدول ۵: مقایسه میانگین اثرات ساده محلول‌پاشی کیتوزان، رژیم‌های آبیاری و اثرات متقابل آن‌ها بر عملکرد اسانس و ترکیبات شیمیایی اسانس زوفا

تیمارها	عملکرد اسانس (mL/100 g)	آلفا-توجن (درصد)	آلفا-پینن (درصد)	سابینن (درصد)	دلتا-کارن (درصد)	بتا-پینن (درصد)	سیس- پینوکامفون (درصد)	کامفور (درصد)	*ترانس*- پینوکامفون(درصد)	میرتنول (درصد)
سطوح کیتوزان										
شاهد (C1)	۰/۹۲	۰/۳۷۰۸	۱/۰۷۵	۲/۱۸۱	۱/۷۱	۱۵/۵۷	۳۷/۹۱	۰/۹۴۵	۱۷/۰۴	۳/۱۲
کیتوزان ۰/۲۵ میلی گرم در لیتر (C2)	۱/۱۲	۰/۴۴۵۸	۱/۰۹۷	۲/۷۱۳	۲/۰۷	۱۴/۸۲	۴۰/۵۹	۰/۸۳۴	۱۸/۷۵	۴/۳۱
کیتوزان ۰/۵۰ میلی گرم در لیتر (C3)	۱/۳۱	۰/۴۷۹۲	۱/۰۷۳	۲/۷۱۶	۲/۱۷	۱۶/۲۵	۴۳/۷۰	۱/۰۰۳	۲۱/۰۸	۴/۷۲
ANOVA	*P<0.01*	*n.s*	*n.s*	*n.s*	*n.s*	*n.s*	*P<0.01*	*n.s*	*P<0.01*	*P<0.01*
رژیم‌های آبیاری										
۴ روز (I1)	۰/۹۶	۰/۳۰۶۷	۰/۹۰۷	۲/۱۳۹	۱/۶۲	۱۷/۱۱	۳۶/۴۵	۰/۹۰۸	۱۱/۷۶	۴/۰۹
۶ روز (I2)	۱/۰۸	۰/۴۵۰۸	۱/۱۶۰	۲/۵۴۱	۲/۰۵	۱۵/۹۳	۴۰/۷۰	۱/۰۰۶	۲۰/۱۳	۴/۰۲
۱۰ روز (I3)	۱/۳۲	۰/۵۳۸۳	۱/۱۷۸	۲/۹۳۰	۲/۲۸	۱۳/۶۰	۴۵/۰۵	۰/۸۶۸	۲۴/۹۶	۴/۰۴
ANOVA	*P<0.01*	*P<0.01*	*P<0.05*	*P<0.05*	*P<0.01*	*P<0.05*	*P<0.01*	*n.s*	*P<0.01*	*n.s*
اثرات متقابل کیتوزان × آبیاری										
I1×C1	۰/۸۱	۰/۱۸۵	۰/۸۶۳	۱/۳۷	۱/۱۸	۱۷/۱۰	۳۳/۵۹	۰/۹۰۵	۹/۷۹	۳/۴۰
I2×C1	۰/۸۱	۰/۴۲۰	۱/۳۰	۲/۳۴	۱/۹۳	۱۵/۶۱	۳۹/۵۳	۱/۰۳	۱۸/۰۵	۳/۰۰
I3×C1	۱/۱۳	۰/۵۰۸	۱/۰۶	۲/۸۲	۲/۰۰	۱۴/۰۰	۴۰/۶۱	۰/۸۹۵	۲۳/۲۹	۲/۹۷
I1×C2	۰/۹۵	۰/۳۳۵	۰/۹۰۰	۲/۷۳	۱/۸۱	۱۶/۸۴	۳۷/۷۸	۰/۸۵۰	۱۱/۴۱	۴/۲۳
I2×C2	۱/۱۰	۰/۴۶۰	۱/۱۵	۲/۴۱	۲/۰۶	۱۵/۸۰	۳۹/۸۳	۰/۹۶۰	۱۹/۹۷	۴/۳۲
I3×C2	۱/۳۲	۰/۵۴۳	۱/۲۳	۲/۹۹	۲/۳۳	۱۱/۸۵	۴۴/۱۵	۰/۶۹۳	۲۴/۸۵	۴/۳۹
I1×C3	۱/۱۱	۰/۴۰۰	۰/۹۶۰	۲/۳۰	۱/۸۶	۱۷/۴۰	۳۷/۹۹	۰/۹۶۸	۱۴/۰۷	۴/۶۶
I2×C3	۱/۳۲	۰/۴۷۳	۱/۰۲	۲/۸۷	۲/۱۶	۱۶/۳۹	۴۲/۷۳	۱/۰۲۳	۲۲/۳۷	۴/۷۶
I3×C3	۱/۴۹	۰/۵۶۵	۱/۲۳	۲/۹۷	۲/۵۰	۱۴/۹۷	۴۷/۳۸	۱/۰۱۷	۲۶/۷۵	۴/۷۵
ANOVA		*n.s*	*n.s*	*n.s*	*n.s*	*n.s*	*n.s*	*n.s*	*P<0.01*	*n.s*

ns: عدم اختلاف معنی‌دار

بحث

نتایج بررسی عملکرد اسانس و ترکیبات فیتوشیمیایی اسانس گیاه زوفا کشت شده در شرایط آب و هوایی شهرکرد با نتایج تحقیقات قبلی روی همین زیر گونه *H. officinalis* L. subsp. (Bieb.) *angustifolius* بیانگر مطابقت نتایج این مطالعه با نتایج ارزیابی سایر پژوهشگران (Aghaei et al., 2019; Ghasemi Pirbalouti et al., Khosh Eghbal et al., 2020) است؛ به‌طوری‌که ایشان نیز گزارش کردند میزان کمیت اسانس بین ۱ تا حدود ۱/۵ درصد حجم به وزن است و هم‌چنین ترکیبات عمده و مهم نظیر *ترانس*-پینوکامفون، سیس- پینوکامفون شناسایی شده در آزمایش ما در اکثر نتایج فیتوشیمیایی تحقیقات پیشین (Aghaei et al., 2019; Ghasemi Pirbalouti et al., 2019; Khosh Eghbal et al., 2020; Ahmadi et al., 2021; Saebi et al., 2021; Jangi et al., 2021) مشابهت دارد. نمونه زوفا *H. officinalis* کشت شده از مصر و لهستان نیز سیس - پینوکامفون، *ترانس*- پینوکامفون و بتا- پینن به عنوان ترکیبات غالب زوفا گزارش کردند (Said-Al et al., 2015; Zawislak, 2013). در برخی پژوهش‌ها ترکیبات متفاوتی به عنوان ترکیب غالب گزارش شده است، به عنوان مثال: میرتنیل استات توسط فتحی آزاد از شمال ایران (Fathiazad et al., 2011) تیمول و بیزابولول توسط دهقان زاده از استان فارس (Dehghanzadeh et al., 2012) گزارش شده است.

تولید متابولیت‌های ثانویه و مواد موثره مانند اسانس تحت تأثیر عوامل ژنتیکی، شرایط اکولوژیکی، خاکی، مدیریتی (فرآیندهای کاشت تا برداشت و پس از برداشت) و اثرات متقابل آن‌ها است (Bakhtiar et al., 2021; Babaei et al., 2021; Khosh Eqbal et al., 2020). نتایج تحقیق حاضر حاکی از آن است که میزان اسانس به دست آمده از روش تقطیر با آب در گیاه زوفا تحت رژیم های مختلف آبیاری معنی دار بود. نتایج به دست آمده در این مطالعه برای عملکرد اسانس نشان می‌دهد که با افزایش فواصل آبیاری و احتمال تنش خشکی عملکرد اسانس افزایش یافته است. به طور مشابه در تحقیق ملک پور و همکاران (Malekpoor et al., 2017) مشخص شد که تنش کم آبی باعث افزایش میزان اسانس در گیاه ریحان بنفش (*Ocimum basilicum*) شد. هم‌چنین در مطالعه دیگری (Momeni et al., 2020)، کمبود آب سبب افزایش عملکرد اسانس در گیاه آویشن زوفایی (*Thymbra spicata* L.) شد. بابایی و همکاران (Babaei et al., 2021) نیز گزارش نمودند که اسانس گل جعفری مکزیکی (*Tagetes minuta* L.) تحت شرایط تنش خشکی ملایم افزایش می یابد. به طور کلی، تنش خشکی با تحریک سنتز متابولیت‌های ثانویه از طریق مسیرهای متابولیکی در گیاهان دارویی و معطر، که برخی از آن‌ها ناشناخته هستند، سبب تغییرات میزان کمی و کیفی متابولیت‌های ثانویه می‌شود (Babaei et al., 2021; Emami Bistgani et al., 2017; Ahmadi et al., 2021).

نتایج به دست آمده از تجزیه واریانس اثرات سطوح مختلف کیتوزان بر عملکرد اسانس زوفا نشان داد که کیتوزان اثر معنی دار بر میزان عملکرد اسانس داشت. نتایج مقایسه میانگین نشان داد که با افزایش سطح کیتوزان عملکرد اسانس نیز افزایش می‌یابد و بالاترین عملکرد اسانس حدود ۱/۳ درصد حجم به وزن از تیمار ۰/۵ گرم در لیتر کیتوزان به دست آمد. گروهی از پژوهشگران نیز گزارش کردند که محلول پاشی کیتوزان سبب ارتقای مواد موثره در آویشن دنایی شد (Emami Bistgani et al., 2017). کاربرد کیتوزان به عنوان مولکول‌های سیگنال و یک محرک گیاهی می تواند سبب تحریک مسیرهای بیوسنتزی و ترکیبات ثانویه در گیاهان گردد (Emami Bistgani et al., 2017; Sheikha et al., 2009). به‌طور احتمال، القا

کننده‌هایی هم‌چون کیتوزان منجر به فعال شدن ژن‌های جدید شده که آنزیم‌ها و مسیرهای متابولیکی را برای تولید متابولیت‌های ثانویه تحریک می‌کنند (Emami Bistgani et al., 2017).

نتایج تحقیق حاضر نشان می‌دهد که اثرات رژیم‌های مختلف آبیاری بر میزان درصد *ترانس*- پینوکامفون، *سیس*- پینوکامفون و بتا-پینن به‌عنوان ترکیبات اصلی اسانس معنی‌دار بود. غلظت *ترانس*- پینوکامفون و *سیس*- پینوکامفون در آبیاری‌های ده روزه نسبت به چهار و شش روز به‌طور معنی‌داری افزایش داشت در حالی که میزان بتا-پینن کاهش یافت. در پژوهشی توسط احمدی و همکاران (Ahmadi et al., 2021) مشخص شد که اثر تنش خشکی ملایم بر گیاه زوفا تحت محلول‌پاشی سیترونیل ۲ میلی‌مولار بالاترین عملکرد ایزوپینوکامفون با ۴۷ درصد در اسانس زوفا به دست آمد. در بررسی که توسط خوش اقبال و همکاران (Khosh Eqbal et al., 2020) انجام گرفت، درصد *سیس*- پینوکامفن در تنش خشکی شدید نسبت به شاهد به‌طور معنی‌داری کاهش پیدا کرد، ولی بتا-پینن در هر دو سطح تنش نسبت به شاهد افزایش قابل توجه داشت و افزایش آن در تنش خشکی ملایم بیشتر بود. تنش خشکی با اختلال در فتوسنتز و تنفس، درصد و ترکیب شیمیایی اسانس را تحت تأثیر قرار می‌دهد (Pradhan et al., 2017). در مطالعه ای مشابه (Malekpoor et al., 2017) مشخص شد که تنش خشکی اثر افزایش و معنی داری بر روی میزان متیل چاویکول به عنوان یکی از ترکیبات مهم اسانس در ریحان بنفش داشته است. نتایج تحقیقات دیگر (Alavi-Samani et al., 2015) حاکی از آن بود که تنش خشکی در حد ملایم و متوسط توانسته است میزان برخی ترکیبات موثره و مهم نظیر تیمول یک ترکیب فنلی را در گیاه دارویی آویشن دنایی افزایش دهد.

نتایج این مطالعه نشان داد که غلظت‌های مختلف کیتوزان اثرات معنی داری بر میزان برخی ترکیبات مهم اسانس زوفا از جمله *ترانس* - پینوکامفون، *سیس*- پینوکامفون و میرتنول داشته است (جدول ۴). به طور مشابه، محلول پاشی کیتوزان با تحریک آنزیم‌های بیوسنتزی از قبیل فنیل آلانین آمونیالیاز و چالکون سنتتاز سبب ارتقای پلی فنل در گیاه پونه (*Mentha pulegium* L.) شد (Heng et al., 2012). در همین راستا، کیتوزان سبب بهبود ترکیبات فلاونوئیدی در آویشن دنایی گردید (Emami Bistgani et al., 2017). نتایج بررسی‌ها نشان داد که کیتوزان سبب ارتقای معنی داری در مشتقات فنیل‌پروپانوئیدی در نارگیل شد (Chakraborty et al., 2009).

الیسیتورها ابتدا توسط گیرنده‌های گیاهی فعال می‌شوند و سبب فعال‌سازی فاکتورهای نظیر کانال‌های یونی، پروتئین‌های متصل‌شونده به GTP و پروتئین کینازها می گردند. در ادامه فرستادن پیام محرک به داخل سلول و به راه افتادن واکنش‌های فرودست متنوع باعث بیان اولیه ژن‌های دفاعی، تولید اتیلن و جاسمونات، بیان نهایی ژن‌های دفاعی و در نهایت تولید ترکیبات ثانویه برای تقویت سیستم دفاعی مؤثر و کارآمد می‌شود (Mishra et al., 2012). ترکیبات سیگنالی و حدواسطهای بین محرک تا پاسخ‌های دفاعی، مشخص شده‌اند، این که چه‌طور و چگونه این انتقال سیگنال انجام می‌شود و یا این که چگونه ژن‌های دفاعی و متابولیسم ثانویه را فعال می‌کند هنوز مبهم است، به طوری کلی نتایج به دست آمده مبین این مسئله است که استفاده از کیتوزان سبب ارتقا و تولید برخی از ترکیبات موثره می‌شود که از نقطه نظر صنعتی و داروسازی قابل‌توجه است.

نتیجه‌گیری نهایی

مطابق با نتایج تحقیق حاضر، رژیم‌های مختلف آبیاری و سطوح مختلف کیتوزان بر عملکرد و درصد اجزای تشکیل دهنده آن مؤثر بود. ترکیبات غالب در هر سه سطح آبیاری و سه سطح کیتوزان سیس پینوکامفون و کامفون بود. عملکرد اسانس زوفا و ترکیبات مذکور در آبیاری‌های با فاصله ۱۰ روز و استفاده از کیتوزان ۰/۵۰ به طور معنی داری افزایش یافتند. می توان چنین نتیجه گرفت که برخی الیسیتورها از جمله کیتوزان و رژیم‌های رطوبتی قادرند تولید موثره دارویی را تحت تأثیر قرار دهند. بنابراین می‌توان از اثرات مثبت کیتوزان به‌عنوان یک محرک زیستی کارآمد جهت بهبود بیوسنتز ماده مؤثره و دیگر متابولیت‌های ثانویه تحت رژیم‌های مختلف رطوبتی در تولید گیاهان دارویی بهره برد.

References

1. Adams, R.P. 2007. Identification of essential oil components by gas chromatography / quadrupole mass spectroscopy. Allured Publishing Corporation, CarolStream, IL, USA.
2. Aghaei, K., Ghasemi Pirbalouti, A., Mousavi, A., Badi, H.N. and Mehnatkesh, A. 2019. Effects of foliar spraying of L-phenylalanine and application of bio-fertilizers on growth, yield, and essential oil of hyssop [*Hyssopus officinalis* L. subsp. *angustifolius* (Bieb.)]. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, 21: 101318.
3. Ahmadi, H., Babalar, M., Sarcheshmeh, M.A.A., Morshedloo, M.R. and 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.
4. Alavi-Samani, S.M., Kachouei, M.A. and Ghasemi Pirbalouti, A. 2015. Growth, yield, chemical composition, and antioxidant activity of essential oils from two Thyme species under foliar application of jasmonic acid and water deficit conditions. Horticulture, Environment and Biotechnology, 56(4): 411-420.
5. Babaei, K., Moghaddam, M., Farhadi, N. and Ghasemi Pirbalouti, A. 2021. Morphological, physiological and phytochemical responses of Mexican marigold (*Tagetes minuta* L.) to drought stress. Scientia Horticulturae, 284: 110116.
6. Bakhtiar, A., Khaghani, S., Ghasemi Pirbalouti, A., Gomarian, M. and Chavoshi, S. 2021. Essential oil variation among different populations of *Ziziphora tenuior* L. cultivated at semiarid climate. Journal Essential Oil Research, 33: 385-393.
7. Dehghanzadeh, N., Ketabchi, S. and Alizadeh, A. 2012. Essential oil composition and antibacterial activity of *Hyssopus officinalis* L. grown in Iran. Asian Journal of Experimental Biological Sciences, 3(4): 767-771.
8. Emami Bistgani, Z., Siadat, S.A., Bakhshandeh, A., Ghasemi Pirbalouti, A. and Hashemi, M. 2017. Interactive effects of drought stress and chitosan application on physiological characteristics and essential oil yield of *Thymus daenensis* Celak. The Crop Journals, 5(5): 407- 415.
9. Esmaeilzadeh Bahabadi, S., Sharifi, M., Safaie, N. and Behmanesh, M. 2012. Enhancement of lignin and phenylpropanoid compounds production by chitosan in *Linum album* cell culthure. Journal of Plant Biology, 11: 13-26 (In Persian).
10. Fathiazad, F., Mazandarani, M. and Hamedeyazdan, S. 2011. Phytochemical analysis and antioxidant activity of *Hyssopus officinalis L.* from Iran. Advanced Pharmaceutical Bulletin, 1(2): 63-67.
11. Ghasemi Pirbalouti, A. and Craker, L.E. 2015. Diversity in chemical compositions of essential oil of Myrtle leaves from various natural habitats in south and southwest Iran. Journal of Forestry Research, 26(4): 971-981.

12. Ghasemi Pirbalouti, A. and Imaniyan-Fard, M. 2016. Variation on biological activity and phytochemical characteristics of gum tragacanth exudate from *Astragalus gossypinus* and *A. parrowianus*. Acta Scientiarum Polonorum-Hortorum Cultus, 15(3): 141-152.
13. Ghasemi Pirbalouti, A., Ghahfarokhi, B., Ghahfarokhi, S.A.M. and Malekpoor, F. 2015. Chemical composition of essential oils from the aerial parts and underground parts of Iranian valerian collected from different natural habitats. Industrial Crops and Products, 63: 147-151.
14. Ghassemi Pirbalouti, A., Gorgij, A. and Rahimmalek, M. 2013. Phytochemical response of hyssop (*Hyssopus officinalis* L.) to foliar application of jasmonic acid. Journal of Herbal Drugs, 4(1): 7-14.
15. Ghassemi Pirbalouti, A., Malekpoor, F., Salimi, A., Golparvar, A. and Hamedi, B. 2017. Effects of foliar of the application chitosan and reduced irrigation on essential oil yield, total phenol content and antioxidant activity of extracts from green and purple basil. Acta Scientlarum. Polonorum Hortorum Cultus, 16(6): 177–186.
16. Ghasemi Pirbalouti, A., Mohamadpoor, H., Bajalan, I. and Malekpoor, F., 2019. Chemical compositions and antioxidant activity of essential oils from inflorescences of two landraces of hyssop [*Hyssopus officinalis* L. subsp. *angustifolius* (Bieb.)] cultivated in Southwestern, Iran. Journal of Essential Oil Bearing Plants 22: 1074-1081.
17. Goudarzian, A., Ghasemi Pirbalouti, A. and Hossaynzadeh, M., 2020. Menthol, balance of menthol/menthone, and essential oil contents of Mentha× Piperita L. under foliar-applied chitosan and inoculation of arbuscular mycorrhizal fungi. Journal of Essential Oil Bearing Plants, 23(5): 1012-1021.
18. Heng, Y., Xavier, C., Lars, F., Chritensen, P. and Kai, G. 2012. Chitosan oligosaccharides promote the content of polyphenol in Greek Oregano (*Origanum vulgare* ssp. Hirtum). Journal of Agriculture and Food Chemistry, 60: 136-143.
19. IRIMO. 2012. (Islamic Republic of Iran Meteorological Organization). Climatology methods. www.irimo.ir.
20. Jangi, F., Ebadi, M.T. and Ayyari, M. 2021. Qualitative changes in hyssop (*Hyssopus officinalis* L.) as affected by cold plasma, packaging method and storage duration. Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants, 22: 100289.
21. Khosh Eqbal, F., Ghasemi Pirbalouti, A., Enteshari, S. and Davarpanah, S.J. 2020. Qualitative and quantitative effects of drought stress on essential oil compositions of hyssop (*Hyssopus officinalis* L.). Journal of Plant Research (Iranian Journal of Biology), 33(2): 292-303. (in Persian).
22. Malekpoor, F., Ghasemi Pirbalouti, A., Salimi, A. and Momtaz, H. 2017. Effects of chitosan on gene expression of chavicol-O-methyl transferase and phenylpropanoid components of *Ocimum basilicum* (purple cultivar) under water deficit. Journal of Iranian Biology Society, 30: 391-401. (in Persian).
23. Mishra, A.K., Sharma K. and Misra R.S. 2012. Elicitor recognition, signal transduction and induced resistance in plants, Journal of Plant Interactions, 7(2): 95-120.
24. Moghaddam, M. and Ghasemi Pirbalouti, A. 2017. Agro-morphological and phytochemical diversity of Iranian *Cuminum cyminum* accessions. Industrial Crops and Products, 99: 205-213.
25. Momeni, M., Ghasemi Pirbalouti, A., Mousavi, A. and Badi, H.N. 2020. Effect of foliar applications of salicylic acid and chitosan on the essential oil of *Thymbra spicata* L. under different soil moisture conditions. Journal of Essential Oil Bearing Plants, 23(5): 1142-1153.
26. Pradhan, J., Sahoo, S.K., Lalotra, S. and Sarma, R.S. 2017. Positive impact of abiotic stress on medicinal and aromatic plants. International Journal of Plant Sciences, 12 (2): 309-313.
27. Saebi, A., Minaei, S., Mahdavian, A.R. and Ebadi, M.T. 2021. Quantity and quality of hyssop (*Hyssopus officinalis* L.) affected by precision harvesting. International Journal of

Horticultural Science and Technology, 8(3): 271-284.
28. Said-Al, H.A.H., Abbas, Z.K., Sabra, A.S. and Tkachenko, K.G. 2015. Essential oil composition of *Hyssopus officinalis*. International Journal of Plant Science and Ecology, 1(2): 49-53.
29. Sheikha, S.A.A.K. and AL-Malki, F.M. 2009. Growth and chlorophyll responses of Bean plants to the chitosan applications. European Journal of Scientific Research, 50:124-134.
30. Srivastava, A., Awasthi, K., Kumar, B., Misra, A. and Srivastava, S. 2018. Pharmacognostic and pharmacological evaluation of *Hyssopus officinalis* L. (Lamiacea) collected from Kashmir Himalayas, India. Pharmacognosy Journal, 10 (4): 690-693.
31. Tavakoli, M. and Aghajani, Z. 2016. The effects of drought stress on the components of the essential oil of Hyssopus. Journal of applied Environmental and Biological Sciences, 6(2): 31-36.
32. Zawiślak, G. 2013. Morphology and composition of essential oil in *Hyssopus officinalis* and chemical composition of its essential oil. Modern Phytomorphology, 4: 93–95.

Effect of foliar application of chitosan on the quantity and quality of *Hyssopus officinalis* L. subsp. *angustifolius* Bieb. essential oil under different irrigation regimes

Alavi Samani, S.[1], Ghasemi Pirbalouti, A.[2*], Malekpoor, F.[3]

[1]PhD student, Department of Medicinal Plants, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran

[2]Professor, Medicinal Plants Research Center, Islamic Azad University, Qods City Branch, Tehran, Iran

[3]Assistant Professor, Department of Biology, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran

Received: 9-1-2021; Accepted: 23-5-2021

Abstract

Chitosan is a chitin-derived glosamine polysaccharide used as a bioelicitor to improve the biosynthesis of secondary metabolites. To investigate the effect of chitosan elicitor on the quantity and quality of essential oil of *Hyssopus officinalis* L. subsp. *angustifolius* Bieb. under different irrigation regimes, a factorial experiment was conducted in the Research Center for Medicinal Plants, I.A.U., Shahrekord in the crop year 2017-2018 in a RCBD with four replications. Experimental factors included different concentrations of chitosan at three levels of 0, 0.25 and 0.50 g/L and irrigation regimes including 4, 6, and 10-day intervals. The essential oil of the flowering branches of the plant was extracted by hydro-distillation using Clevinger apparatus and phytochemically analyzed by GC/MS. The main compounds of the hyssop essential oil were *trans*-pinocampone, *cis*-pinocampone, β-pinene, myrtenol, α-thujene, α-pinene, sabinene, *delta*-3-carcene and camphor. The results showed that the effect of different concentrations of chitosan and irrigation regimes on the yield of essential oil was significant (P <0.01). Different concentrations of chitosan had a significant effect (P <0.01) on the amount of some compounds essential such as *trans*-pinocampone, *cis*-pinocampone and myrtenol. In addition, different irrigation regimes had a significant effect on the amount of some compounds such as *trans*-pinocampone and *cis*-pinocampone (P <0.01) and sabinene, α-pinene and β-pinene (P <0.05). The results indicated that the maximum essential oil yield and pinocampone, as the most important consituent of hyssop is obtained from chitosan at 0.5 g/L and irrigation once every 10 days. It seems that chitosan foliar application and increasing the intervals of irrigation period can be effective in increasing the yield and quantitative and qualitative properties of hyssop essential oil.

***Keywords*:** Essential oil, *trans*-pinocampone, *Hyssop*, *cis*-pinocampone, Chitosan.

*Corresponding author; ghasemi955@yahoo.com