Iranian Journal of Horticultural Science
Vol 51, No 2, Summer 2020 (273-286)
DOI: 10.22059/ijhs.2018.265743.1511

علوم باغبانی ایران
دورۀ ۵۱، شمارۀ ۲، تابستان ۱۳۹۹ (ص ۲۸۶-۲۷۳)

تأثیر سولفات آمونیوم بر شاخص‌های رشد، عملکرد و خصوصیات فیتوشیمیایی مرزه تابستانه رقم ساترن (*Satureja hortensis* L. cv. Saturn)

مصباح بابالار[1*]، سعیده محتشمی[2]، لیلا تبریزی[3]، وحید روشن[4] و حسین محمدی[5]
۱، ۳ و ۵. استاد، استادیار و دانش‌آموخته کارشناسی ارشد، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج
۲. استادیار، دانشکده کشاورزی، دانشگاه جهرم
٤. استادیار، مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی فارس، بخش منابع طبیعی
(تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/٦/۲۵ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۹/۱۸)

چکیده

جهت ارزیابی تأثیر سطوح مختلف سولفات آمونیوم بر شاخص‌های رشد و فیتوشیمیایی گیاه مرزه تابستانه رقم ساترن (*Satureja hortensis* L. cv. Saturn)، آزمایشی بر پایه طرح بلوک‌های کامل تصادفی با ۵ تیمار و ۳ تکرار به اجرا درآمد. تیمارها شامل پنج سطح مختلف سولفات آمونیوم (شاهد (عدم مصرف)، ٤۰، ٦۰، ۸۰ و ۱۰۰ کیلوگرم در هکتار) بود که به‌صورت سرک در مرحله گلدهی کامل اعمال گردید. بوته‌های مربوط به هر تیمار برداشت شدند و صفات مورد بررسی شامل صفات مورفولوژیک (ارتفاع گیاه، تعداد شاخه‌های جانبی، عرض بوته، قطر ساقه، طول میانگره‌ها)، عملکرد ماده خشک، فعالیت آنتی‌اکسیدانی، میزان ترکیبات فنلی، میزان رزمارینیک اسید و کارواکرول اندازه‌گیری شد. با افزایش سطوح مختلف سولفات آمونیوم، ارتفاع گیاه، تعداد شاخه جانبی، عرض بوته، قطر ساقه، طول میانگره و عملکرد ماده خشک و میزان ترکیبات فنلی افزایش معنی‌داری پیدا کرد. بیشترین میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی در تیمار ٤۰ کیلوگرم مشاهده شد و با افزایش کاربرد سولفات آمونیوم کاهش یافت. بیشترین میزان رزمارینیک اسید (۱۰/۹۳ میلی‌گرم در گرم وزن خشک) در تیمار ۸۰ کیلوگرم سولفات آمونیوم بود و کمترین میزان (٦/۸۵ میلی‌گرم در گرم وزن خشک) در تیمار شاهد اندازه‌گیری شد. بالاترین میزان کارواکرول (٦/۹۲ میلی‌گرم در گرم وزن خشک) در تیمار ۸۰ کیلوگرم سولفات آمونیوم به‌دست آمد و بعد از آن تیمارهای ٤۰، ٦۰ و ۱۰۰ کیلوگرم در یک سطح قرار داشتند و کمترین میزان (۵/۵ میلی‌گرم) مربوط به تیمار شاهد بود. با توجه به نتایج به‌دست آمده، تیمار ۸۰ کیلوگرم در هکتار سولفات آمونیوم علاوه بر افزایش شاخص‌های رشد و عملکرد، موجب افزایش میزان کارواکرول و رزمارینیک اسید گردید.

واژه‌های کلیدی: آنتی‌اکسیدان، تغذیه، عملکرد، فلاونوئید، فنل، مرزه.

The effect of ammonium sulfate on growth indices, morphological and phytochemical characteristics of summer savory (*Satureja hortensis* L. cv. Saturn)

Mesbah Babalar[1*], Saeideh Mohtashami[2], Leila Tabrizi[3], Vahid Rowshan[4] and Hossein Mohammadi[5]
1, 3, 5. Professor, Assistant Professor and Former M. Sc. Student, University College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran
2. Assistant Professor, Faculty of Agriculture, Jahrom University, Jahrom, Iran
4. Assistant Professor, Department of Natural Resources, Fars Agricultural and Natural Resources Research and Education Center, Iran
(Received: Sep. 16, 2018- Accepted: Dec. 09, 2018)

ABSTRACT

In order to evaluate, the effect of different levels of ammonium sulfate on morphological and phytochemical characteristics of summer savory, an experiment based on randomized complete block design (RCBD) with five treatments and three replications on Karaj climate conditions was conducted. The treatment including five levels of ammonium sulfate consist of: control (without fertilizer), 40, 60, 80 and 100 kg/ha of ammonium sulfate that as split application was applied. At full flowering stage, the plant samples of all treatments were harvested and desired factors such as morphological characteristics (plant height, lateral shoot number, plant diameter and stem diameter), biomass, Antioxidant activity, polyphenolic compounds, rosmarinic acid and carvacrol contents were measured. With increasing levels of ammonium sulfate, plant height, number of lateral shoots, plant diameter, stem diameter, internode length and dry matter yield were significantly increased. The highest antioxidant activity was observed in 40 kg ammonium sulfate treatment and increasing in ammonium sulphate concentration was decreased antioxidant activity. The maximum content of rosmarinic acid (10.93 mg per g dry weight) related to 80 kg ammonium sulfate treatment and the lowest content (6.85 mg per g dry weight) was measured in control. The highest amount of carvacrol (6.92 mg per g dry weight) was obtained in 80 kg of ammonium sulfate treatment, followed by 40, 60 and 100 kg treatments on the same level and the minimum content (5.05 mg) in control were detected. According to the results, the treatment of 80 kg/ha of ammonium sulfate, in addition to increasing growth and yield factors, inhansed the amount of carvacrol and rosmarinic acid.

Keywords: Antioxidant, fertility, flavonoid, phenol, *Satureja hortensis*, yield.

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

مقدمه

مرزه یکساله یا مرزه تابستانه (*Satureja hortensis*) یکی از مهمترین گیاهان متعلق به تیره نعناعیان (Lamiaceae) است که بیش از ۳۰ گونه آن در شرق مدیترانه می‌رویند (Hadian *et al*., 2008). این گیاه یکی از قدیمی‌ترین گیاهانی است که به عنوان سبزی و گیاه دارویی و ادویه‌ای مورد استفاده بشر بوده و به‌صورت خشک شده به عنوان یکی از مطبوع ترین ادویه‌ها معرفی شده است (Omidbaigi, 2005). به‌طور کلی قسمت‌های هوایی گیاه مرزه که معمولاً در زمان گلدهی چیده می‌شود، دارای اثرات درمانی همچون تسهیل‌کننده عمل هضم، مقوی معده، مدر، بادشکن و به‌طور خفیف دارای اثرات قابض، رفع اسهال و ضد کرم می‌باشد. از اسانس مرزه در صنایع کنسروسازی و نوشابه‌سازی استفاده می‌شود. اسانس این گیاه خاصیت ضد میکروبی داشته و مانع از رشد برخی از باکتری‌ها می‌شود (Hajhashemi *et al*., 2000; Sefidkon *et al*., 2007).

با توجه به رشد سریع تقاضا برای گیاهان دارویی و داروهای گیاهی در جهان، کشت این گیاهان به‌طور قابل توجهی افزایش یافته است (Yazdani *et al*., 2004). کاربرد صحیح عناصر غذایی در طول دوره رشد گیاه نه تنها نقش عمده‌ای در افزایش عملکرد دارد بلکه در کمیت و کیفیت مواد مؤثره آن‌ها نیز تأثیرگذار است؛ اما جزئیات این همبستگی کاملاً مشخص نیست و مطالعات فیزیولوژی و بیوشیمیایی دقیقی برای تعیین نحوه تأثیر این مواد بر تولید متابولیت‌های خاص لازم است. در واقع مناسب‌ترین میزان مصرف کود مقداری خواهد بود که علاوه بر افزایش عملکرد اثر منفی بر متابولیت‌های ثانوی نداشته باشد (Bernath, 2008).

تحقیقات نشان داده است که مواد تشکیل‌دهنده اسانس تحت تأثیر ژنوتیپ، مرحله رشد، شرایط محیطی، آبیاری و تغذیه‌ای می‌باشد (Ghani *et al*., 2009 a, b; Maerere *et al*., 2001; Omidbaigi *et al*., 2003; Sefidkon *et al*., 2003). نیتروژن به‌طور مستقیم یا غیرمستقیم بر رشد گیاه تأثیر دارد، با این وجود رفتارهای فیزیولوژیک گیاهان نسبت به منابع نیتروژن کاملاً متفاوت بوده و به توانایی آن‌ها در جذب و تثبیت آن بستگی دارد (Shafea *et al*., 2011).

تأثیر کودهای ارگانیک و بیوارگانیک بر فعالیت آنتی‌اکسیدانی، میزان ترکیبات فنلی، فلاونوئیدها و ویتامین ث دو رقم رازیانه نشان‌دهنده بیشترین میزان این ترکیبات در همه پارامترهای اندازه‌گیری‌شده در تیمار ۵۰ درصد عناصر اصلی نیتروژن، فسفر و پتاسیم (NPK) به همراه ۵۰ درصد کود ارگانیک و بیوارگانیک در مقایسه با تیمار شاهد بود (Salama *et al*., 2015). در تحقیق انجام گرفته در رابطه با تأثیر کودهای غیرارگانیک بر اجزای اسانس و فعالیت آنتی‌اکسیدانی اسانس دو گونه آویشن اندمیک (*Thymus leptobotrys and T. maroccanus*) منطقه ماروکان، افزایش میزان کارواکرول و فعالیت آنتی‌اکسیدانی در هر دو گونه در اثر کاربرد کودهای پایه (نیتروژن-فسفر-پتاسیم)، نسبت به گیاهانی که تغذیه نشده بودند، در پی داشت (Alaoui Jamali *et al*., 2014) که این می‌تواند مربوط به نقش مهم عناصر ماکرو در بیوسنتز بعضی از ترپنوئیدها باشد (Sell, 2003). در اکثر گیاهان کشت‌شده، رشد و میزان ترکیبات فعال زیستی تحت تأثیر ترکیبی از ژنتیک و فاکتورهای محیطی (آب و هوا، خاک، مواد غذایی و آب) قرار می گیرند که بعضی از آن‌ها می توانند توسط عملیات کشاورزی تغییر یابند (Fennell *et al*., 2004).

تأثیر سولفور و سولفات آمونیوم بر گیاه بادرشبی نشان داد، بیشترین عملکرد اسانس مربوط به بیشترین میزان کاربرد سولفات آمونیوم (۲۰۰ کیلوگرم نیتروژن در هکتار) بود، در حالی که کمترین میزان کاربرد کود بعد از شاهد، میزان نرال، ژرانیال استات و ژرانیول را افزایش داد (Aziz *et al*., 2010). طی مطالعه‌ای کاربرد سولفات آمونیوم موجب افزایش عملکرد پیکر رویشی، زیست‌توده برگ تر و عملکرد اسانس در گیاه ریحان شد، درحالی‌که بر نسبت برگ به ساقه، ارتفاع گیاه و تعداد شاخه جانبی بی‌تأثیر بود (Sifola & Barbieri, 2006). کاربرد کود نیتروژن در گیاه بادرنجبویه، عملکرد اسانس، عملکرد سرشاخه گلدار و عملکرد ماده خشک را نسبت به شاهد افزایش داد (Abbaszadeh, 2005). در یک تحقیق مزرعه‌ای بر روی مرزه که با استفاده از چهار سطح کود نیتروژن (۰، ۵۰، ۱۰۰ و ۱۵۰ کیلوگرم در هکتار) در شرایط آب و هوایی کرج انجام شد، مشخص شد که با افزایش میزان نیتروژن تا ۱۰۰ کیلوگرم در هکتار،

عملکرد ماده تر و خشک افزایش می‌یابد (Babalar *et al*., 2010). در این خصوص Anwar *et al*. (2005) بر روی گیاه ریحان به این نتیجه رسیدند که مصرف ۱۰۰ کیلوگرم کود نیتروژن در هکتار باعث افزایش عملکرد سرشاخه‌ها، تعداد برگ‌ها، رنگدانه برگ‌ها، نسبت برگ به ساقه و شاخص سطح برگ می‌شود. Sifola & Barbieri (2006) بیان کردند که کاربرد نیتروژن تا ۳۰۰ کیلوگرم در هکتار باعث افزایش عملکرد اندام هوایی و وزن تر برگ‌های سه رقم ریحان شد (Sifola & Barbieri, 2006). بررسی تأثیر نیتروژن بر آویشن باغی (*Thymus vulgaris* L.) مشخص کرد که استفاده از این عنصر باعث افزایش رشد رویشی و عملکرد اندام هوایی گیاه می‌گردد (Baranauskiene *et al*., 2003).

با توجه به اهمیت بالای تغذیه در عملکرد و کیفیت مواد مؤثره گیاهان دارویی و نظر به اینکه تاکنون تحقیقات بسیار کمی در رابطه با گیاه مرزه انجام شده است. همچنین ازآنجاکه سولفات آمونیوم یک کود اسیدزا و مناسب خاک‌های قلیایی ایران بوده و موجب جذب بهتر سایر عناصر غذایی می‌گردد؛ لذا پژوهش حاضر با هدف تأثیر سطوح مختلف سولفات آمونیوم بر شاخص-های رشد و فیتوشیمیایی مرزه تابستانه در شرایط آب و هوایی کرج انجام شد.

مواد و روش‌ها

اجرای این طرح در قطعه زمینی واقع در هشت دستگاه مربوط به گروه مهندسی علوم باغبانی و فضای سبز پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران (شهر کرج) انجام شد. آزمایش در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی با سه تکرار اجرا شد. بذرهای این رقم اصلاح شده (که از کشور مجارستان تهیه شده بودند)، در ردیف‌های منظم کشت شدند و در نهایت در مرحله ۶-۴ برگی بوته‌ها تنک شدند و تراکم بوته‌ها با فواصل ۳۰×۲۰ سانتی‌متر به‌صورت یکنواخت اعمال شد. حدود سه هفته پس از کاشت، سطوح مختلف کود سولفات آمونیوم شامل شاهد (عدم مصرف) ۴۰، ۶۰، ۸۰ و ۱۰۰ کیلوگرم در هکتار اعمال گردید. اساس انتخاب سطوح تغذیه ای با توجه به نتایج تجزیه خاک مندرج در جدول ۱ صورت پذیرفت. مشخصات فیزیکی و شیمیایی خاک محل آزمایش بر اساس روش‌های استاندارد تعیین گردید. بافت خاک به‌روش هیدرومتری (Bouyoucos, 1962)، قابلیت هدایت الکتریکی و pH (Haluschak, 2006)، درصد ماده آلی (Walkley & Black, 1934)، نیتروژن کل (Bremner, 1996)، فسفر قابل جذب گیاه (Olsen, 1954)، پتاسیم (استات آمونیوم نرمال)، اندازه‌گیری ظرفیت تبادل کاتیونی (Sumner and Miller, 1996)، درصد کربنات کلسیم معادل (Loepper, 1984)، غلظت قابل جذب عناصر کم مصرف آهن، منگنز، روی و مس به‌روش عصاره گیری با DTPA و با دستگاه جذب اتمی شیمادزو ۱ مدل ۶۷۰ اندازه‌گیری شدند (Lindsay & Norvell, 1978). کلیه عملیات داشت شامل آبیاری، حذف علف‌های هرز، سله‌شکنی و ... به‌صورت یکنواخت برای کلیه تیمارها انجام شد. در مرحله گل‌دهی کامل ارتفاع گیاه، نسبت طول به عرض برگ، قطر ساقه، عرض بوته، تعداد شاخه جانبی، نسبت برگ به ساقه، نسبت گل به بیومس، نسبت برگ به بیومس، عملکرد ماده خشک، طول میانگره‌ها، فعالیت آنتی‌اکسیدان‌ها، میزان ترکیبات فنلی، میزان فلاون و فلاونول، میزان فلاونوئیدها، میزان کارواکرول و رزمارینیک اسید موجود در عصاره اندازه‌گیری شد. به منظور اندازه‌گیری صفات بیوشیمیایی، نمونه‌های گیاهی برداشت شدند و پس از حذف ساقه‌های ضخیم و زاید، نمونه‌ها در دمای محیط (۳۰±۲ °C) خشک شدند و بقیه مراحل آزمایش به‌صورت زیر دنبال گردید.

روش‌های اندازه‌گیری صفات بیوشیمیایی

عصاره‌گیری جهت اندازه‌گیری مواد مؤثره

عصاره‌گیری از نمونه‌ها جهت اندازه‌گیری سایر فاکتورهای بیوشیمیایی به‌صورت زیر انجام شد. عصاره توسط حلال متانولی به نسبت ۵ به ۱ (حجمی- وزنی) با استفاده از حلال متانول ۷۰ درصد انجام شد. برای تمامی تیمارها میزان یک گرم نمونه خشک توزین گردید و به لوله فالکون انتقال یافتند سپس میزان ۵ میلی‌لیتر حلال به آن‌ها اضافه شد و مدت ۲۴ ساعت روی شیکر با ۲۰۰ دور در دقیقه (rpm) نگهداری و سپس به‌مدت ۱۵ دقیقه داخل سانتریفیوژ با ۶۰۰۰ دور قرار گرفتند و سپس قسمت روشناور صاف گردید و به عنوان عصاره جهت انجام اندازه‌گیری‌های بعدی در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند (Wojdylo *et al*., 2007).

جدول ۱. برخی از ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی خاک مورد آزمایش

Table 1. Some physico-chemical properties of the soil of experimental field

Soil texture	Saturation percentage	EC (ds/m)	pH	Organic matter (%)	Soil Particles		
					Sand %	Silt %	Clay %
Loamy	43.11	4.2	7.87	3.07	36	40	24
$CaCO_3$ (%)	Fe (mg/kg)	Mn (mg/kg)	Cu (mg/kg)	Zn (mg/kg)	Total N (%)	Available K (ppm)	Available P (ppm)
10.33	6	17.4	1.52	3	0.31	1164.9	65.64

اندازه‌گیری میزان فلاون ها و فلاونول ها

میزان فلاون‌ها و فلاونول‌ها به‌روش Popova *et al.* (2004) با اندکی تغییر اندازه‌گیری شد و نتایج به‌صورت میلی‌گرم کوئرستین در ۱۰۰ گرم وزن خشک بیان گردید. یک میلی‌لیتر از عصاره تهیه شده با یک میلی‌لیتر کلرید آلومینیوم ۲ درصد مخلوط و سپس این محلول توسط متانول به حجم ۲/۵ میلی‌لیتر رسید، بعد از گذشت ۳۰ دقیقه میزان جذب در طول موج ۴۲۵ نانومتر قرائت گردید. همچنین برای رسم منحنی استاندارد از غلظت‌های مختلف (صفر تا ۴۰۰ پی‌پی‌ام) کوئرستین استفاده شد.

اندازه‌گیری میزان فلاونوئیدها

اندازه‌گیری میزان فلاونوئیدها به‌روش Menichini *et al.* (2009) انجام شد. بدین ترتیب که ابتدا یک میلی‌لیتر از عصاره هر نمونه برداشته و سپس ۳۰۰ میکرولیتر نیتریت سدیم ۵٪ به آن اضافه شد، پس از ۵ دقیقه از اضافه کردن نیتریت سدیم، ۶۰۰ میکرولیتر کلرید آلومینیوم ۱۰٪ اضافه و پس از گذشت ۶ دقیقه از زمان اضافه کردن کلرید آلومینیوم، دو میلی‌لیتر سود یک نرمال اضافه شد، در نهایت میزان جذب نور در طول موج ۵۱۰ نانومتر قرائت گردید. تبدیل داده‌های حاصل از جذب به غلظت‌های مختلف کوئرستین با رسم منحنی استاندارد کوئرستین (غلظت‌های صفر تا ۴۰۰ پی‌پی‌ام) انجام و نتایج بر اساس میلی‌گرم کوئرستین در گرم وزن خشک بیان شد.

اندازه‌گیری ترکیبات فنلی

اندازه‌گیری مقدار ترکیبات فنلی براساس روش فولین (Folin-Ciocalteu) اندازه‌گیری شد. بدین منظور ۱۰۰ میکرولیتر از عصاره هر نمونه با ۲۰۰ میکرولیتر فولین ۵۰ درصد مخلوط و ۲۰۰۰ میکرولیتر آب مقطر به محلول فوق اضافه شد. پس از ۳ دقیقه، ۱۰۰۰ میکرولیتر کربنات سدیم ۲۰ درصد به محلول اضافه و بعد از کمی هم زدن نمونه‌ها یک ساعت در شرایط اتاق و در تاریکی نگهداری شدند، سپس جذب نمونه‌ها در طول موج ۷۶۵ نانومتر انجام گرفت. تبدیل داده‌های حاصل از جذب به غلظت‌های مختلف گالیک اسید با رسم منحنی استاندارد گالیک اسید (غلظت‌های صفر تا ۲۰۰ پی‌پی‌ام) انجام و داده‌ها به‌صورت میلی‌گرم گالیک اسید در گرم وزن خشک بیان شد (Wojdylo *et al.*, 2007).

تعیین میزان فعالیت آنتی اکسیدانی با استفاده از آزمون DPPH

تعیین فعالیت آنتی‌اکسیدانی با استفاده از آزمون دی‌پی‌پی‌اچ (DPPH) و با استفاده از روش Oke *et al.* (2009) با اندکی تغییر انجام شد. اندازه گیری ظرفیت جاروب کردن رادیکال‌های آزاد بوسیله دستگاه اسپکتروفتومتری بر پایه کاهش رادیکال‌های آزاد انجام شد. پنجاه ماکرولیتر از عصاره‌های مذکور به پنج میلی‌لیتر محلول DPPH (با غلظت ۰/۰۰۴ درصد) اضافه شد. در محلول شاهد (بلانک) به جای عصاره، ۵۰ ماکرولیتر متانول اضافه شد. محلول‌ها به‌مدت ۱۰ ثانیه به شدت تکان داده شدند و سپس به‌مدت ۳۰ دقیقه جهت واکنش در دمای اتاق و در محیط تاریک نگهداری شدند و سپس در طول موج ۵۱۷ نانومتر قرائت گردیدند. درصد فعالیت آنتی‌اکسیدان‌ها (AOA) با استفاده از فرمول زیر محاسبه شدند:

$$\text{درصد فعالیت آنتی‌اکسیدان‌ها (\%AOA)} = \frac{\text{(عدد جذب نمونه- عدد جذب شاهد)}}{\text{عدد جذب شاهد}} \times ۱۰۰$$

استخراج و اندازه‌گیری پلی فنل ها (رزمارینیک اسید و کارواکرول) با استفاده از دستگاه HPLC

عصاره‌گیری جهت اندازه‌گیری رزمارینیک اسید و کارواکرول

ابتدا نمونه‌های گیاهی خشک‌شده را با آسیاب پودر

گردیده و سپس از الک عبور داده شد و به اندازه ۰/۲ گرم توزین شد و داخل میکروتیوب ریخته شد. در مرحله بعد اضافه کردن حلال (۸۵ درصد متانول+ ۱۵ درصد استیک اسید) به مقدار ۱۰ برابر نمونه (دو میلی‌لیتر حلال) انجام شد و دمیدن گاز نیتروژن به درون میکروتیوب‌ها جهت جلوگیری از اکسیده‌شدن ترکیبات فنلی صورت گرفت. میکروتیوب‌ها با پوشش فویل پوشانده شدند و درون فریزر و در تاریکی (ترکیبات پلی‌فنلی به نور حساس هستند) به‌مدت ۲۴ ساعت قرار گرفتند. در مرحله بعد میکروتیوب‌های حاوی عصاره همراه با فویل درون دستگاه اولتراسونیک (Ultrasonic) به‌مدت ۱۵ دقیقه در دمای پایین و در تاریکی قرار گرفتند تا ترکیبات فنلی به‌صورت کامل از بافت گیاه جدا شود و وارد حلال شود. در این مرحله نمونه‌ها جهت جدا کردن فاز مایع از جامد، از اولتراسونیک خارج و پوشش فویل آن حذف شد و در دستگاه سانتریفیوژ یخچال‌دار با دمای صفر درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۲۰ دقیقه با سرعت ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه قرار گرفت. فاز رویی را برداشته و به درون میکروتیوب جدید انتقال داده شد و به آن ان-هگزان (n-Hexane) (هم حجم فاز رویی) اضافه شد. نمونه‌ها به‌مدت ۱۰ تا ۱۵ ثانیه ورتکس (Vortex) شدند و مجددا سانتریفیوژ کردن نمونه به‌مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه در دمای صفر درجه سانتی‌گراد انجام شد (ان-هگزان یک حلال غیر قطبی است که ترکیبات غیرقطبی مانند کلروفیل‌ها، پروتئین‌ها و چربی‌های موجود در نمونه که غیرقطبی هستند را در خود حل می کند و از ترکیبات پلی‌فنلی جدا می‌کند). در این مرحله یک محلول دو فازه تشکیل شد که فاز رویی شامل ترکیبات مزاحم هگزانی و فاز زیری پلی‌فنل‌ها بودند. سپس با سرنگ، پلی‌فنل قسمت زیرین را کشیده و توسط صافی سرسرنگی ناخالصی‌ها کاملاً از آن گرفته شد و سپس به ظروف شیشه‌ای مخصوص دستگاه HPLC انتقال یافت و جهت تزریق به دستگاه آماده گردید (Justesen *et al*., 1998).

شناسایی و اندازه‌گیری میزان رزمارینیک اسید با استفاده از دستگاه HPLC

برای جداسازی و اندازه‌گیری میزان پلی‌فنل‌ها از دستگاه HPLC مدل Agilent Technologies-1200 series استفاده شد. ستون C_{18} با طول ۱۵۰ میلی‌متر و قطر داخلی ۴/۶ میلی‌متر و قطر ذرات پنج میکرومتر، آشکارساز (Diode Array Detector) در طول موج‌های ۳۲۰ و ۲۸۰ نانومتر و دمای آون ۳۰° سانتی‌گراد استفاده شد. برنامه شستشوی گرادیان، با سرعت شستشوی یک میلی‌لیتر بر دقیقه و حجم تزریق ۲۰ میکرولیتر انتخاب گردید. فاز متحرک گرادیان متانول و اسید فرمیک یک درصد انتخاب شد. برنامه زمانی و درصد حلال‌ها به‌صورت زیر برنامه‌ریزی شد.

جدول ۲. برنامه زمانی شستشوی گرادیان دستگاه کروماتوگرافی مایع با کارآیی بالا

Table 2. Gradient washing schedule of HPLC

Time	Methanol ratio	Formic acid ratio (one percent)
0	10	90
10	25	75
20	60	40
30	70	30

جهت شناسایی میزان رزمارینیک اسید نمونه‌ها، مقدار ۲۰ میکرولیتر از عصاره هر نمونه برداشته شد و به دستگاه تزریق گردید. جهت شناسایی و محاسبه درصد نسبی این ترکیب، نمونه‌های استاندارد رزمارینیک اسید (گرید HPLC با خلوص بالای ۹۹ درصد) در غلظت‌های مناسب (صفر تا ۱۰۰۰۰ پی‌پی‌ام) ساخته و به دستگاه تزریق شد و غلظت رزمارینیک اسید موجود در هر نمونه بر اساس منحنی استاندارد محاسبه گردید. از مقایسه زمان بازداری (Retention Time) استاندارد با پیک مربوط به کروماتوگرام نمونه (آنالیز کیفی) و جایگذاری سطح زیر منحنی (Peak area) هر نمونه در منحنی استاندارد، آنالیز کمی انجام گرفت. ظهور پیک مربوطه در زمان حدود ۱۹/۱۶ دقیقه و در طول موج ۲۸۰ نانومتر صورت پذیرفت.

شناسایی و محاسبه میزان کارواکرول با استفاده از دستگاه HPLC

جهت شناسایی میزان کارواکرول موجود در نمونه‌ها کاملاً مشابه به‌روش شرح داده‌شده در ارتباط با رزمارینیک اسید انجام شد. غلظت کارواکرول موجود

در هر نمونه بر اساس منحنی استاندارد رسم شده (غلظت صفر تا ۵۰۰۰) محاسبه گردید. ظهور پیک مربوطه در زمان حدود ۲۸/۴۹ دقیقه و در طول موج ۲۸۰ نانومتر صورت پذیرفت.

آنالیز آماری داده‌ها

تجزیه و تحلیل آماری و رسم گراف‌ها توسط نرم‌افزارهای MINITAB, Jamp 8 و EXCEL انجام شد.

نتایج و بحث

شاخص‌های رشد

ارتفاع گیاه، تعداد شاخه‌های جانبی، عرض بوته و قطر ساقه

تأثیر تیمارها بر تعداد شاخه‌های جانبی در سطح پنج درصد و سایر صفات در سطح یک درصد معنی‌دار گردید (جدول ۳). به‌طوری‌که بیشترین میزان ارتفاع گیاه (۶۸ سانتی‌متر) در تیمار ۱۰۰ کیلوگرم سولفات آمونیوم اندازه‌گیری شد که با تیمارهای ۸۰ و ۶۰ کیلوگرم تفاوت معنی‌داری نداشت و کمترین میزان (۵۹/۸۰ سانتی‌متر) مربوط به تیمار شاهد بود که با تیمار ۴۰ کیلوگرم تفاوت معنی‌داری نداشت (جدول ۵). بیشترین تعداد شاخه‌های جانبی (۲۲/۴۰) مربوط به تیمار ۸۰ کیلوگرم و بعد از آن تیمار ۱۰۰ کیلوگرم سولفات آمونیوم بود و کمترین میزان (۱۸/۳۳) مربوط به تیمار شاهد بود. کمترین میزان عرض بوته‌ها (۲۹/۴۷ سانتی‌متر) مربوط به تیمار شاهد بود و با افزایش میزان سولفات آمونیوم عرض بوته‌ها افزایش یافت و بیشترین میزان (۳۹/۸۰ سانتی‌متر) مربوط به تیمار ۱۰۰ کیلوگرم سولفات آمونیوم بود. بالاترین میزان قطر ساقه (۱۱/۷۵ میلی‌متر) مربوط به تیمار ۱۰۰ کیلوگرم سولفات آمونیوم بود و بین سایر تیمارها از نظر آماری تفاوت معنی‌داری وجود نداشت (جدول۵).

فاصله میانگره‌ها، نسبت طول به عرض برگ

تأثیر تیمارها بر فاصله میانگره‌ها در سطح یک درصد معنی‌دار شد در حالی که نسبت طول به عرض برگ تحت تأثیر تیمارها قرار نگرفت (جدول ۳). کمترین میزان فاصله میانگره (۲۶/۳۷ میلی‌متر) مربوط به تیمار ۱۰۰ کیلوگرم بود و سایر تیمارها در یک گروه قرار داشتند (جدول ۵).

شاخص‌های عملکرد

تأثیر تیمارها بر عملکرد ماده خشک در سطح یک درصد معنی‌دار گردید (جدول ۳). درحالی‌که سایر صفات مانند نسبت برگ به ساقه، نسبت گل به زیست‌توده و نسبت برگ به زیست‌توده تحت تأثیر تیمارها قرار نگرفتند (جدول ۳). کمترین میزان عملکرد ماده خشک (۱۹/۴۲ گرم) در تیمار شاهد مشاهده شد و با افزایش میزان سولفات آمونیوم مقدار زیست‌توده افزایش یافت و بیشترین میزان (۴۹/۱۷ گرم) در تیمار ۱۰۰ کیلوگرم سولفات آمونیوم شناسایی شد (شکل ۱).

جدول ۳. نتایج تجزیه واریانس اثر سولفات آمونیوم بر شاخص‌های رشد و عملکرد مرزه

Table 3. Results of variance analysis of ammonium sulfate on growth characteristics and yield of *S. hortensis*

Source of variation	df	Mean square									
		Plant height	lateral shoot number	Leaf length to width ratio	Internodes length	Stem diameter	Plant width	Dry matter yield	Leaf to shoot ratio	Flower to biomass ratio	Leaf to biomass ratio
Treatment	4	29.72**	11.60*	0.59ns	15.54**	5.53**	51.36**	380.42**	0.001ns	0.002ns	0.0003ns
Block	2	19.63	5.16	0.13	17.36	1.01	14.88	14.45	0.0009	0.005	0.001

*، ** و ns: به ترتیب تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال ۵ و ۱ درصد و نبود تفاوت معنی‌دار.

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

جدول ۴. نتایج تجزیه واریانس اثر سولفات آمونیوم بر فاکتورهای بیوشیمیایی مرزه

Table 4. Analysis of variance of ammonium sulfate on biochemical parameters in *S. hortensis*

Source of variation	df	Mean square					
		Flavonoids	Flavons and Flavonols	Antioxidant activity	Polyphenolic compounds	Rosemaric Acid	Carvacrol
Treatment	4	280.56**	11**	56.80**	35.14**	7.22**	23.42**
Block	2	19.44	1.67	5.86	8.25	1.75	21.93

*، ** و ns:: به ترتیب تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال ۵ و ۱ درصد و نبود تفاوت معنی‌دار.

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

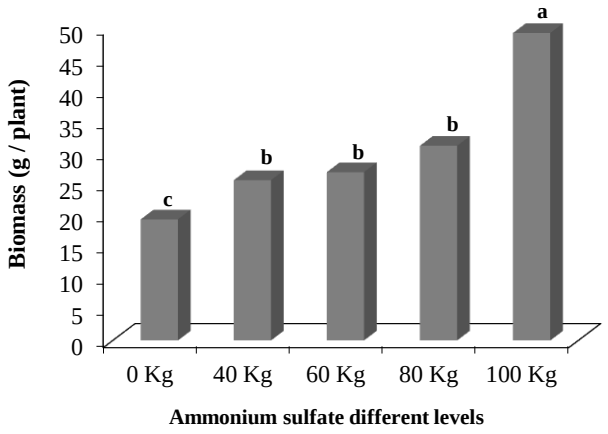
جدول ۵. مقایسه میانگین اثر سولفات آمونیوم بر شاخص‌های رشد مرزه رقم ساترن

Table 5. Mean comparison effect of ammonium sulphate on growth characteristics of *S. hortensis* cv. Saturn

Treatments	Plant height (cm)	Number of lateral branches	Plant width(cm)	Stem diameter (mm)	Internodes length (mm)
Control	59.80b	18.33b	29.47c	8.28b	29.81ab
40 Kg	61.67b	19.13ab	34.93abc	8.76b	31.79a
60 Kg	64.80ab	18.60b	31.73bc	9.05b	31.56a
80 Kg	64.47ab	22.40a	37.20b	9.18b	31.42a
100 Kg	68a	22.07ab	39.80a	11.75a	26.37b

میانگین ها با حروف مشابه تفاوت معنی داری در سطح ۵ درصد بر اساس آزمون توکی ندارند.

Means with similar letter in %5 level of Tukey test are not significant.



شکل ۱. مقایسه میانگین اثر سولفات آمونیوم بر میزان زیست‌توده مرزه رقم ساترن

Figure 1. Mean comparison effect of ammonium sulphate on biomass of *S. hortensis* cv. Saturn

در این زمینه اظهار شده است که نقش نیتروژن در افزایش ماده خشک و افزایش طول دوره رشد می‌باشد. نیتروژن با افزایش تقسیم و افزایش تورژسانس سلول‌های مریستمی سبب افزایش رشد رویشی و شاخه‌دهی در گیاهان می‌شود (Haghparast Tanha, 1992). همچنین زمانی که مقدار کافی نیتروژن در خاک موجود باشد، میزان فتوسنتز افزایش می‌یابد و موجب می‌شود گیاه رشد سریعی داشته و زیست‌توده قابل توجهی تولید نماید (Baranauskiene *et al*., 2003). البته کمبود نیتروژن مانع ساخته شدن پارانشیم و اسکلرانشیم شده و در نتیجه گیاه خاصیت ارتجاعی خود را از دست داده و در اثر کاهش این خاصیت، طول رگبرگ‌ها و قطر برگ‌ها افزایش یافته و بر تعداد روزنه‌ها افزوده می‌شود و در نهایت ارتفاع گیاه کاهش می‌یابد (Haghparast Tanha, 1992). بعلاوه در شرایط کمبود نیتروژن بدلیل کاهش مقدار کلروفیل‌ها و فعالیت روبیسکو، رشد و نمو بازداشته شده و عملکرد گیاه کاهش می‌یابد (Dordas & Sioulas, 2008). با توجه به تحقیقات انجام شده می توان چنین استنباط کرد که ارتفاع بوته یک صفت ژنتیکی می‌باشد و تحت تأثیر محیط نیز قرار می‌گیرد و در این ارتباط مدیریت‌های زراعی از جمله کاربرد مواد غذایی در خاک، تراکم کاشت و تاریخ کاشت از عوامل عمده تأثیرگذار بر آن می‌باشد (Zare *et al*., 2013). با کاربرد کود نیتروژنی ارتفاع بوته افزایش می‌یابد که دلیل این امر را به افزایش طول میانگره و افزایش شاخ و برگ در گیاه ارتباط می‌دهند (Moghaddam *et al*., 1997). بنابراین منطقی به‌نظر می‌رسد که نیتروژن به‌طور مستقیم یا غیر مستقیم در بزرگ شدن و تقسیم سلول‌های جدید و تولید بافت‌هایی که به نوبه خود مسئول افزایش ویژگی‌های رشد می‌باشند دخالت دارد (Singh *et al*., 2016).

صفات بیوشیمیایی

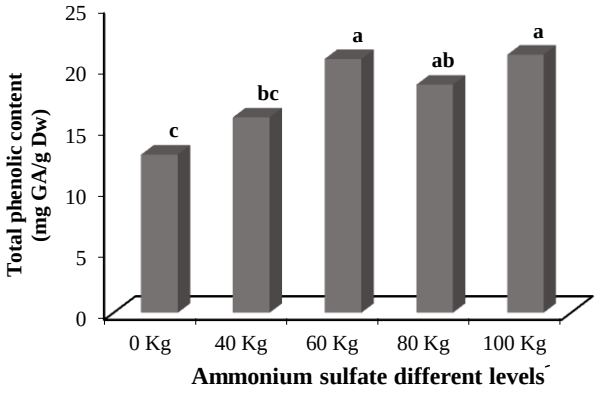
ترکیبات فنلی و فعالیت آنتی‌اکسیدانی

تأثیر تیمارها بر ترکیبات فنلی و فعالیت آنتی‌اکسیدانی

در سطح یک درصد معنی‌دار گردید (جدول ۴). بالاترین میزان ترکیبات فنلی (۲۱/۰۶ میلی‌گرم گالیک اسید در گرم وزن خشک) مربوط به تیمار ۱۰۰ کیلوگرم سولفات آمونیوم و بعد از آن تیمار ۶۰ کیلوگرم سولفات آمونیوم بود که تفاوت معنی‌داری با تیمار ۸۰ کیلوگرم سولفات آمونیوم نداشت و کمترین میزان (۱۲/۹۳ میلی‌گرم گالیک اسید در گرم وزن خشک) مربوط به تیمار شاهد بود (شکل ۲). بالاترین میزان فعالیت آنتی اکسیدانی (۸۶/۱۷ درصد) مربوط به تیمار ۴۰ کیلوگرم سولفات آمونیوم و بعد از آن تیمار شاهد بود و با افزایش میزان سولفات آمونیوم کاهش در فعالیت آنتی‌اکسیدانی مشاهده گردید و کمترین میزان (۷۴/۱۹ درصد) در تیمار ۱۰۰ کیلوگرم سولفات آمونیوم مشاهده شد (شکل ۳).

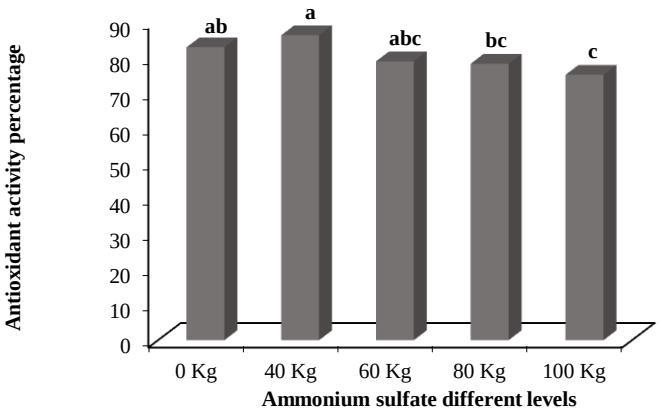
میزان فلاون و فلاونول و فلاونوئیدها

این صفات نیز تحت تأثیر تیمارهای کود سولفات آمونیوم قرار گرفتند (در سطح یک درصد) (جدول ۴). بالاترین میزان فلاون و فلاونول (۲۴/۸۲ میلی‌گرم کوئرستین بر گرم وزن خشک) در تیمار ۶۰ کیلوگرم و بعد از آن مربوط به تیمارهای ۸۰ و ۱۰۰ کیلوگرم سولفات آمونیوم بود. در حالی که کمترین میزان (۱۹/۸۲ میلی‌گرم کوئرستین بر گرم وزن خشک) مربوط به تیمار شاهد بود که با تیمار ۴۰ کیلوگرم سولفات آمونیوم تفاوت معنی‌داری نداشت (شکل ۴). کمترین میزان فلاونوئیدها به‌ترتیب مربوط به تیمارهای شاهد و ۴۰ کیلوگرم سولفات آمونیوم بود، درحالی‌که بیشترین میزان (۴۴/۹۳ میلی‌گرم کوئرستین بر گرم وزن خشک) مربوط به تیمار ۱۰۰ کیلوگرم و بعد از آن ۶۰ کیلوگرم سولفات آمونیوم بود (شکل ۵).



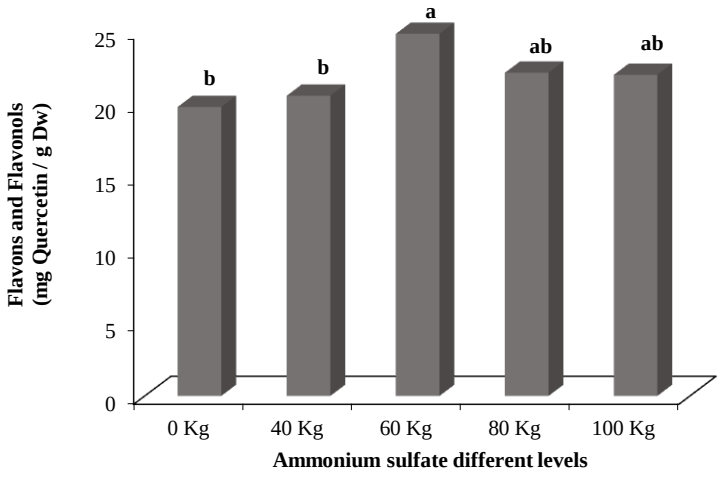
شکل ۲. مقایسه میانگین اثر سولفات آمونیوم بر میزان ترکیبات فنلی مرزه رقم ساترن

Figure 2. Mean comparison effect of ammonium sulphate on total phenolic content of *S. hortensis* cv. Saturn



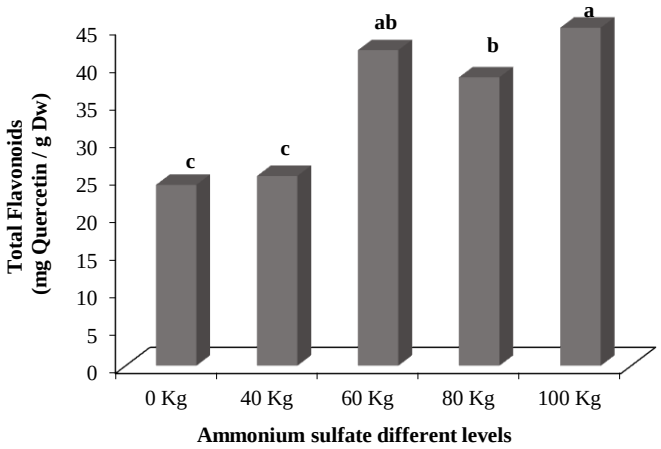
شکل ۳. مقایسه میانگین اثر سولفات آمونیوم بر فعالیت آنتی‌اکسیدانی مرزه رقم ساترن

Figure 3. Mean comparison effect of ammonium sulphate on the antioxidant activity of *S. hortensis* cv. Saturn



شکل ۴. مقایسه میانگین اثر سولفات آمونیوم بر میزان فلاون و فلاونول مرزه رقم ساترن

Figure 4. Mean comparison effect of ammonium sulphate on flavons and flavonols content in *S. hortensis* cv. Saturn



شکل ۵. مقایسه میانگین اثر سولفات آمونیوم بر میزان فلاونوئیدها در مرزه رقم ساترن

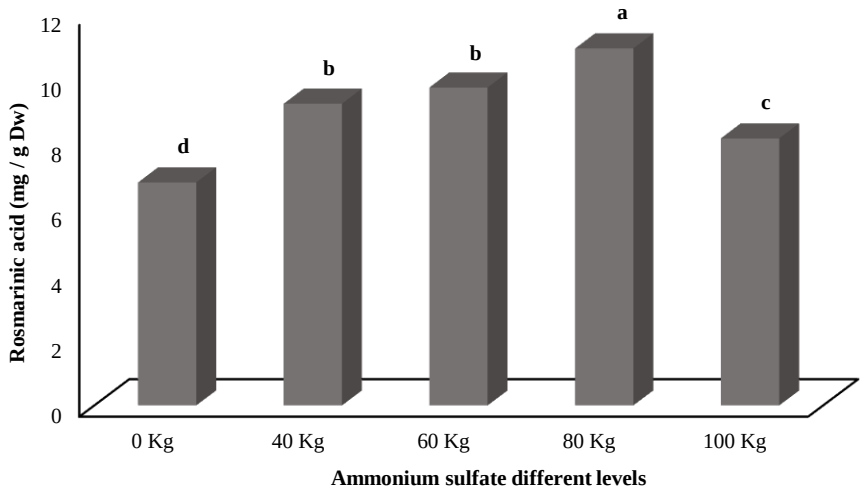
Figure 5. Mean comparison effect of ammonium sulphate on flavonoids content in *S. hortensis* cv. Saturn

رزمارینیک اسید، کارواکرول

میزان رزمارینیک اسید و کارواکرول در سطح یک درصد تحت تأثیر تیمارهای تغذیه‌ای سولفات آمونیوم قرار گرفت (جدول ۴). بیشترین میزان رزمارینیک اسید (۱۰/۹۳ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک) در تیمار ۸۰ کیلوگرم سولفات آمونیوم اندازه‌گیری شد و کمترین میزان (۶/۸۵ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک) در تیمار شاهد بود. روند تغییرات رزمارینیک اسید از شاهد تا سطح ۸۰ کیلوگرم سولفات آمونیوم روند افزایشی بوده و با افزایش سطح سولفات آمونیوم به ۱۰۰ کیلوگرم میزان رزمارینیک اسید کاهش یافت (شکل ۶).

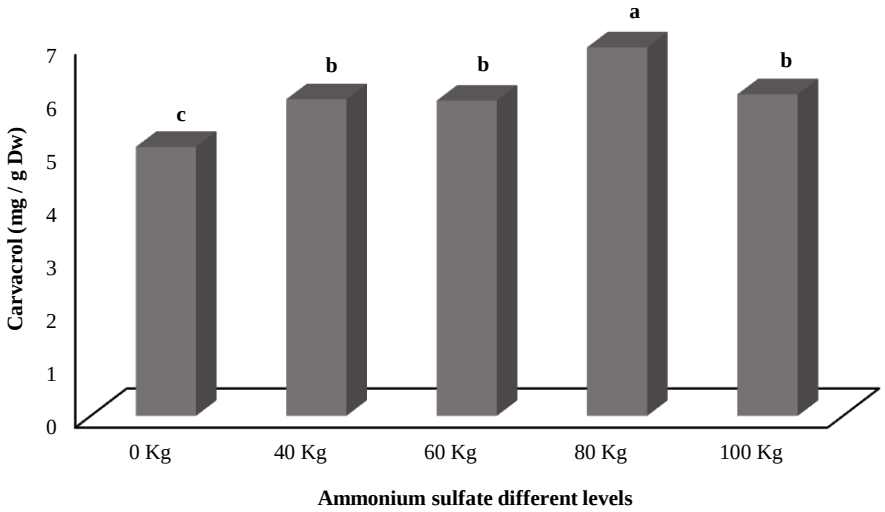
بالاترین میزان کارواکرول (۶/۹۲ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک) در تیمار ۸۰ کیلوگرم سولفات آمونیوم اندازه‌گیری شد و بعد از آن تیمارهای ۴۰، ۶۰ و ۱۰۰ کیلوگرم در یک سطح قرار داشتند. در حالی که کمترین میزان (۵/۰۵ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک) مربوط به تیمار شاهد بود (شکل ۷).

در این تحقیق، کاربرد مقادیر بیشتر سولفات آمونیوم، بر میزان ترکیبات فنلی، فلاونوئیدها، فلاون‌ها و فلاونول‌ها، رزمارینیک اسید و کارواکرول تأثیر مثبت داشت به‌طوری که با افزایش کود، میزان ترکیبات ذکر شده افزایش یافت. ترکیبات فنلی از نظر شیمیایی گروه بزرگ و متنوعی هستند که از اسیدهای فنلی ساده تا پلیمرهای بسیار بزرگ و پیچیده مانند تانن‌ها و لیگنین‌ها را شامل می‌شوند (Winkel-Shirly, 2002; Lila, 2004).



شکل ۶. مقایسه میانگین اثر سولفات آمونیوم بر میزان رزمارینیک اسید مرزه رقم ساترن

Figure 6. Mean comparison effect of ammonium sulphate on rosmarinic acid of *S. hortensis* cv. Saturn



شکل ۷. مقایسه میانگین اثر سولفات آمونیوم بر میزان کارواکرول مرزه رقم ساترن

Figure 7. Mean comparison effect of ammonium sulphate on carvacrol of *S. hortensis* cv. Saturn

همچنین فلاونوئیدها، فلاون و فلاونول، رزمارینیک اسید و کارواکرول زیر مجموعه‌ای از ترکیبات فنلی می‌باشند. بنابراین منطقی به‌نظر می‌رسد که با افزایش فلاونوئیدها، فلاون و فلاونول، رزمارینیک اسید و کارواکرول، میزان ترکیبات فنلی افزایش یابد. این بیانگر ارتباط مثبت بین این ترکیبات می‌باشد.

در تحقیق انجام‌گرفته توسط Alaoui Jamali *et al*. (2014) افزایش میزان کارواکرول و فعالیت آنتی‌اکسیدانی در گیاه آویشن در اثر کاربرد کودهای NPK، نسبت به گیاهانی که تغذیه نشده بودند، مشاهده گردید که این می‌تواند مربوط به نقش مهم مواد غذایی ماکرو در بیوسنتز بعضی از ترپنوئیدها باشد (Sell, 2003). تحقیقات نشان داده است که با افزایش کود نیتروژن، غلظت لوتئین و کاروتن در گیاه جعفری (Christin *et al*., 2005) افزایش یافت. در حالی که در گل داوودی کود نیتروژنی بالا، موجب کاهش فلاونوئیدها و فعالیت آنتی‌اکسیدانی گل‌ها می‌شود (Liu *et al*., 2010). گزارش‌ها نشان می‌دهد که در دسترس بودن بالای مواد غذایی منجر به افزایش در رشد و توسعه گیاه، اما کاهش در تخصیص منابع تولید متابولیت‌های ثانوی می‌شود

(Worthington, 2001; Tarozzi *et al*., 2006). Nguyen *et al.* (2010) بیان کردند که هنگامی که مواد غذایی قابل دسترس از جمله نیتروژن در محدودیت باشد، میزان ترکیبات فنلی، رزمارینیک اسید، کافئیک اسید و فعالیت آنتی‌اکسیدان‌ها در گیاه ریحان کاهش می‌یابد (Nguyen *et al*., 2010). این نتایج ممکن است با استفاده از چارچوب تعادل رشد-تمایز (Growth-Differentiation Balance (GDB)) که بر اصل مبادله فیزیولوژیکی (Physiological trade-off)، بین رشد گیاه و تولید متابولیت‌های ثانوی وجود دارد، پایه گذاری شود (Herms & Mattson, 1992). نیتروژن یک ریز مغذی ضروری خاک می‌باشد که در مقادیر نسبتا زیادی توسط گیاهان برای رشد مناسب و همچنین تشکیل اسیدهای آمینه، آنزیم و پروتئین مورد نیاز است (Mahler, 2008). هنگامی که شرایط محیطی خوب باشد و سطوح نیتروژن کافی باشد، تئوری GDB بیان می‌کند که رشد گیاه با تولید پروتئین‌های فتوسنتزی دریافت کننده منابع اولیه، مناسب خواهد بود. هنگامی که شرایط محیطی فقیر باشد و در دسترس بودن یک ماده غذایی ضروری مثل نیتروژن در محدودیت باشد، GDB پیشنهاد می‌کند که تخصیص رشد برای یک گیاه کاهش خواهد یافت، درحالی‌که تولید متابولیت‌های ثانوی ممکن است افزایش یابد (Herms & Mattson, 1992). در چارچوب GDB، فرضیه تعادل نسبت کربن به مواد غذایی (Carbon/nutrient balance CNB hypothesis) به‌طور مشخص‌تری اثرات تغذیه در تخصیص منابع گیاهی را نشان می‌دهد (Bryant, 1983). تئوری CNB بیان می‌کند که تحت شرایط کمبود مواد غذایی، گیاهان تولید ترکیبات مبتنی بر کربن، مخصوصا متابولیت‌های ثانوی را افزایش می‌دهند. بر اساس این فرضیه انتظار می‌رود که سطح نیتروژن کم منجر به افزایش غلظت متابولیت‌های کربنی مانند ترکیبات پلی فنل شود (Nguyen *et al*., 2010). اگرچه نشان داده شده است که سطوح کودهای نیتروژن، فسفر، پتاسیم و کلسیم متابولیت‌های ثانوی را در برخی از گیاهان تحت تأثیر قرار می‌دهد (Kraus, 2004; Muzika & Pregitzer, 1992; Fanasca *et al*., 2006; Sousa *et al*., 2008; Flores *et al*., 2004)، مطالعاتی نیز وجود دارد که نشان می‌دهند که در دسترس بودن مواد غذایی، تولید متابولیت‌های ثانوی از جمله ترکیبات فنلی را تحت تأثیر قرار نمی‌دهد یا تأثیر کمی دارد و در توافق با فرضیه CNB نمی‌باشد (Chapin *et al*., 1986; Rousi *et al*., 1987; Morgen *et al*., 2006). در اکثریت گیاهان کشت شده، رشد و میزان ترکیبات فعال زیستی تحت تأثیر ترکیبی از ژنتیک و فاکتورهای محیطی (آب و هوا، خاک، مواد غذایی و آب) قرار می‌گیرند که بعضی از آن‌ها می توانند توسط عملیات کشاورزی دست‌کاری شوند (Fennell *et al*., 2004). در این تحقیق، در رابطه با ترکیبات فنلی، فلاون‌ها و فلاونول‌ها، فلاونوئیدها، رزمارینیک اسید و کارواکرول می‌توان گفت که در توافق با فرضیه CNB می‌باشد. اما فعالیت آنتی‌اکسیدان‌ها در تضاد با فرضیه مذکور می‌باشد و با نتایج تحقیقات محققین دیگری چون Chapin *et al.* (1986)، Rousi *et al.* (1987) و Morgen *et al.* (2006) مطابق است. این تفاوت در نتایج محققین را می‌توان به تفاوت در نوع و مقدار کود نیتروژن، نوع اندام حاوی ماده مؤثره، روش‌های مختلف اندازه‌گیری متابولیت‌های ثانوی، روش‌های مختلف عصاره‌گیری، نوع خاک و شرایط اقلیمی منطقه نسبت داد.

نتیجه‌گیری کلی

با توجه به تأثیر مثبت سولفات آمونیوم در اغلب ویژگی‌های رشد و مواد مؤثره، مخصوصا در سطوح بالاتر آن (۸۰ و ۱۰۰ کیلوگرم در هکتار) و همچنین با توجه به این‌که شاخص کیفی در گیاه مرزه میزان کارواکرول و رزمارینیک اسید می‌باشد و میزان این ترکیبات در تیمار ۸۰ کیلوگرم سولفات آمونیوم بیشترین مقدار بوده است، لذا به نظر می‌رسد کاربرد ۸۰ کیلوگرم سولفات آمونیوم می‌تواند باعث بهبود رشد و افزایش مواد مؤثره این گیاه شود.

سپاسگزاری

این تحقیق در قالب طرح پژوهشی ۷۱۰۳۸۷۰۳۶ با استفاده از اعتبارات پژوهشی دانشگاه تهران انجام شده است. از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه، جهت تأمین برخی از هزینه‌های این پژوهش، تشکر و قدردانی می‌گردد.

REFERENCES

1. Abbaszadeh, B. (2005). *Effect of nitrogen and its utilization methods on the lemon balm essential oil*. M.A. Thesis. Islamic Azad University of Karaj. (in Farsi)
2. Alaoui Jamali, C., Kasrati, A., Bekkouche, Kh. Hassani, L., Wohlmuth, H., Leach, D. & Abbad, A. (2014). Cultivation and the application of inorganic fertilizer modifies essential oil composition in two Moroccan species of *Thymus*. *Industrial Crops and Products*, 62, 113-118.
3. Anwar, M., Patra, D. D., Chand, S., Alpesh, K., Naqvi, A. A. & Khanuja, S. P. S. (2005). Effects of organic manures and inorganic fertilizer on growth herb and oil yield, nutrient accumulation and oil quality of French basil. Commun. *Soil Science and Plant Analysis*, 36, 1737-1746.
4. Aziz E.E., El-Danasoury M. M. & Craker L. E. (2010). Impact of sulphur and ammonium sulphate on dragonhead plants grown in newly reclaimed soil. *Journal of Herbs, Spices & Medicinal Plants*, 16(2), 126-135.
5. Babalar, M., Mumivand, H., Hadian, J. & Fakhr Tabatabaei, S. M. (2010). Effects of nitrogen and calcium carbonate on growth, rosmarinic acid content and yield of *Satureja hortensis* L. *Journal of Agricultural Science*, 2(3), 92-98.
6. Baranauskiene, R., Venskutonis, P. R., Viskelis, P. & Dambrauskiene, E. (2003). Influence of nitrogen fertilizers on the yield and composition of thyme (*Thymus vulgaris*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 7751-7758.
7. Bernath, J. (2008). Production ecology of secondary plant productions. In: L.E. Craker and J.E. Simon (eds) Herbs, Spices, and Medicinal Plants: *Recent Advances in Botany, Horticulture and Pharmacoligy*, Vol.1. Oryx Press, Phoenix, Arizona.
8. Bouyoucos, C. J. (1962). Hydrometer method improved for making particle size analysis of soil. *Agronomy Journal*, 54, 464-465.
9. Bremner, J. M. (1996). Nitrogen total. P. 1085-1122. In Sparks, D.L. *et al*., *Method of soil analysis*. Published by: Soil Science Society of America, Inc. American Society of Agronomy, Inc. Madison, Wisconsin, USA.
10. Bryant, J. P., Chapin, III, F. S. & Klein, D. R. (1983). Carbon/nutrient balance of boreal plants in relation to vertebrate herbivory. *Oikos*, 40, 357-368.
11. Chapin III, F. S., Shaver, G. R. & Kedrowski, R. A. (1986). Environmental controls over carbon, nitrogen, and phosphorus fractions in *Eriophorum vaginatum* in Alaskan tussock tundra. *Journal of Ecology*, 74,167-195.
12. Christin, H. C., Dean, A. K. & David, E. K. (2005). Nitrogen concentration affects nutrient and carotenoid accumulation in parsley. *Journal of Plant Nutrition*, 28, 285-297.
13. Dadkhah, A., Amini Dehghi, M. & Kafi, M. (2012). Effect of Different Levels of Nitrogen and Phosphorus Fertilizers on Quantity and Quality Yeild of *Matricaria recutita*. *Iranian Journal of Field Crops Research*, 10 (2), 321-326. (in Farsi)
14. Dadvand Sarab, M., Naghdi Badi, H., Nasri, M., Makkizadeh, M. & Omidi, H. (2008). Changes in Essential Oil Content and Yield of Basil in Response to Different Levels of Nitrogen and Plant Density. *Journal of Medicinal Plants*. 3 (27), 60-70. (in Farsi)
15. Dordas, C. A. & Sioulas, C. (2008). Safflower yield, chlrophyll content, photosynthesis, and water use efficiency response to nitrogen fertilization under rainfed conditions. *Industrial Crops and Products*, 27,75-85.
16. Fanasca, S., Colla, G., Maiani, G., Venneria, E., Rouphael, Y., Azzini, E. & Saccardo, F. (2006). Changes in antioxidant content of tomato fruits in response to cultivar and nutrient solution composition. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 4319-4325.
17. Fennell, C. W., Light, M. E., Sparg, S. G., Stafford, G. I. & Van Staden, J. (2004). Assessing African medicinal plants for efficacy and safety: agricultural and storage practices. *Journal of Ethnopharmacology*, 95, 113-121.
18. Flores, P., Navarro, J. M., Garrido, C., Rubio, J. S. & Martinez, V. (2004). Influence of Ca^{2+}, K^{+} and NO_3^{-} fertilization on nutritional quality of pepper. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 84, 569-574.
19. Ghani, A., Azizi, M., Pahlavanpour, A. & Hassanzadeh-Khayyat, M. (2009a). Comparative study on the essential oil content and composition of *Achillea eriophora* DC. in field and wild conditions. *Journal of Medicinal Plants*, 8(2), 120-128. (in Farsi)
20. Ghani, A., Saharkhiz, M. J., Hassanzadeh, M. & Massada, K. (2009b). Changes in the Essential Oil Content and Chemical Compositions of *Echinophora platyloba* DC. During Three Different Growth and Developmental Stages. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 12 (2), 162-171.
21. Hadian, J., Tabatabaei, S. M. F., Naghavi, M. R., Jamzad, Z. & Ramak-Masoumi, R. (2008). Genetic diversity of Iranian accessions of *Satureja hortensis* L. based on horticultural traits and RAPD markers. *Scientia Horticulturae*, 115, 196-202.

22. Haghparast Tanha, M. (1992). *Plant nutrition and metabolism*. Rasht, Islamic Azad University Press, 194 p. (in Farsi)
23. Hajhashemi, V., Sadraei, H., Ghannadi, A. R. & Mohseni, S. (2000). Antispasmodic and antidiarrhoeal affect of *Satureja hortensis* L. essential oil. *Journal Ethnopharmacology*, 71, 1-2.
24. Haluschak, P. (2006). Laboratory methods of soil analysis. Canada-Manitoba soil survey, 3-133.
25. Herms, D. A. & Mattson, W. J. (1992). The dilemma of plants: to grow or defend. *Quarterly Review of Biology*, 67, 283-335.
26. Justesen, U., Knuthsen, P. & Leth, T. (1998). Quantitative analysis of flavonols, flavones and flavanons in fruits, vegetables and beverages by HPLC with photodiode array and mass spectrometric detection. *Journal of Chromatography*, 799, 101-110.
27. Kraus, T. E. C., Zasoski, R. J. & Dahlgren, R. A. (2004). Fertility and pH effects on polyphenol and condensed tannin concentrations in foliage and roots. *Plant and Soil*, 262, 95-109.
28. Lila, M. A. (2004). Anthocyanins and Human Health: An *In Vitro* Investigative Approach. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 5, 306- 313.
29. Lindsay, W. & Norvell, W. A. (1978). Development of a DTPA soil test for zinc, iron, manganese, and copper. *Soil Science Society of America Journal*, 42(3), 421-428.
30. Liu, D., Liu, W., Zhu, D., Geng, M., Zhou, W. & Yang, T. (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.
31. Loeppert, R. H., Hallmark C. T. & Koshy M. M. (1984). Routine procedure for rapid determination of soil carbonates. *Soil Science Society of America Journal*, 48(5), 1030-1033.
32. Losak, T. & Richter, R. (2004). Split nitrogen doses and their efficiency in poppy (*Papaver somniferum* L.) nutrition. *Plant Soil and Environment*, 50(11), 484-488.
33. Maerere, A. P., Kimbi, G. G. & Nonga, D. L. M. (2001). Comparative effectiveness of animal manures on soil chemical properties, yield and root growth of Amaranthus (*Amaranthus cruentus* L.). *African Journal of Science and Technology*, 1(4), 14-21.
34. Mahler, R. L. (2008). *Nutrients plants require for growth, University of Idaho College of Agricultural and Life Sciences*. accessed May 6, 2008, http://info.ag.uidaho.edu/pdf/CIS/CIS1124.pdf
35. Menichini, F., Tundis, R., Bonesi, M., Loizzo, M. R., Conforti, F., Statti, G., Di Cindi, B., Houghton, P. J. & Menichini, F. (2009). The influence of fruit ripening on the phytochemical content and biological activity of *Capsicum chinense* Jacq. Habanero. *Food Chemistry*, 114, 553-560.
36. Moghaddam, M., Ehdaie, B. & Waines, J. D. G. (1997). Genetic variation and inter relationships of agronomic characters in landraces of bread wheat from south eastern Iran. *Euphytica*, 95, 361-369.
37. Morgen, L. M., Olsson, M. E. & Gertsson, U. E. (2006). Quercetin content in field-cured onions (*Allium cepa* L.): effects of cultivar, lifting time, and nitrogen fertilizer level. *Journal of Agricalture and Food Chemistry*, 54, 6185-6191.
38. Muzika, R. M. & Pregitzer, K. S. (1992). Effect of nitrogen fertilization on leaf phenolic production of grand fir seedlings. *Trees*, 6, 241-244.
39. Nguyen, Ph., Kwee, E., & Niemeyer, E. (2010). Potassium rate alters the antioxidant capacity and phenolic concentration of basil (*Ocimum basilicum* L.) leaves. *Food Chemistry*, 123, 1235-1241.
40. Oke, F., Aslim, B., Ozturk, S. & Altundag, S. (2009). Essential oil composition, antimicrobial and antioxidant activities of *Satureja cuneifolia* Ten. *Food Chemistry*, 112, 874-879.
41. Olsen, S., Cole, C., Watanabe, F. & Dean, L. (1954). *Estimation of available phosphorus in soils by extraction with sodium bicarbonate*. USDA Circular Nr 939, US Gov.Print. Office, Washington, D.C.
42. Omidbaigi, R. (2005). *Production and processing of medicinal plants*. Volume 2, *Behnashr Publication*, 438p. (in Farsi)
43. Omidbaigi, R., Hadjiakhoondi, A. & Saharkhiz, M. J. (2003). Changes in content and chemical composition of *Pimpinella anisum* oil at various harvest times. *Jornal of Essential Oil Bearing Plants*, 6 (1), 46-50.
44. Popova, M., Bankova, V., Butovska, D., Petkov, V., Nikolova-Damyanova, B., Sabatini, A. G., Marcazzan, G. L. & Bogdanov, S. (2004). Validated methods for the quantification of biologically active constituents of poplar-type propolis. *Phytochemistry Analysis*. 15, 235-240.
45. Rousi, M., Häggman, J. & Bryant, J. P. (1987). The effect of bark phenols upon mountain hare barking of winter-dormant Scots pine. *Holarctic Ecology*, 10, 60-64.
46. Safi-Khani, F., Heidari Sharif Abad, H., Siadat, S. A., Sharifi, Ashorabadi, E., seyednejad, S. M. & Abaszadeh, B. (2006). Drought effects on yield and morphological traits of *Dracocephalum moldavica* L. *Iranian Journal ol Medicinal and Aromatic Plants*, 36(2), 183-190. (in Farsi)
47. Salama, Z. A., El Baz, F. K., Gaafar, A. A. & Fathy Zaki, M. (2015). Antioxidant activities of phenolics, flavonoids and vitamin C in two cultivars of fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.) in responses to organic and bio-organic fertilizers. *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences*, 14, 91-99.

48. Sefidkon, F., Kalvandi, R. & Mirza, M. (2003). Chemical variation of the essential oil of *Nepeta heliotropifolia* in different stage of plant growth. *Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants Research*, 19 (3), 255-267. (in Farsi)
49. Sefidkon, F., Sadeghzadeh, L., Teimouri, M., Asgari F. & Ahmadi, Sh. (2007). Antimicrobial effects of the essential oils of two *Satureja* species (*S. Khuzistanica* Jamzad and *S. bachtiarica* Bunge) in two harvesting time. *Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants*, 23(2), 174-182. (in Farsi)
50. Sell, C. S. (2003). *A Fragrant Introduction to Terpenoid Chemistry*. The Royal Society of Chemistry, Thomas Graham House, Scientific Park, Milton Road, Cambridge, UK, pp. 410.
51. Shafea, L., Safari, M., Emam, Y. & Mohammadi Nejad, Gh. (2011). Effect of Nitrogen and Zinc Fertilizers on Leaf Zinc and Chlorophyll Contents, Grain Yield and Chemical Composition of Two Maize (*Zea mays* L.) Hybrids. *Seed and Plant Production Journal*, 27(2), 235-246. (in Farsi)
52. Sifola, M. I. & Barbieri, G. (2006). Growth, yield and essential oil content of three cultivars of basil grown under different levels of nitrogen in the field. *Scientia Horticulture*, 108, 408-413.
53. Singh, M., Masroor, M., Khan, A. & Naeem, M. (2016). Effect of nitrogen on growth, nutrient assimilation, essential oil content, yield and quality attributes in *Zingiber officinale* Rosc. *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences*, 15(2), 171-178.
54. Sousa, C., Pereira, D. M., Pereira, J. A., Bento, A., Rodrigues, M. A., Dopico-García, S., Valentão, P., Lopes, G., Ferreres, F., Seabra, R. M. & Andrade, P. B. (2008). Multivariate analysis of tronchuda cabbage (*Brassica oleracea* L. var. costata DC) phenolics: influence of fertilizers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 2231-2239.
55. Sumner, M.E. & Miller, W. P. (1996). *Cation exchange capacity, and exchange coefficients*. In: D.L. Sparks (ed.) Methods of soil analysis. Part 2: Chemical properties (3rd ed.). ASA, SSSA, CSSA, Madison, WI.
56. Tarozzi, A., Hrelia, S., Angeloni, C., Morroni, F., Biagi, P., Guardigli, M., Cantelli-Forti, G. & Hrelia, P. (2006). Antioxidant effectiveness of organically and non-organically grown red oranges in cell culture systems. *European Journal of Nutrition*, 45, 152-158.
57. Walkley, A. & Black, I. A. (1934). An examination of the Degtjareff method for determining soil organic matter, and a proposed modification of the chromic acid titration method. *Soil Science*, 37, 29-38.
58. Winkel-Shirly, B. (2002). Biosynthesis of flavonoids and effects on stress. *Current Opinion in Plant Biology*, 5, 218-223.
59. Wojdylo, A., Oszmianski, J. & Czemerys, R. (2007). Antioxidant activity and phenolic compound in 32 selected herbs. *Food Chemistry*, 1005, 940-949.
60. Worthington, V. (2001). Nutritional quality of organic versus conventional fruits, vegetables, and grains. *Journal of Alternative and Complementary Medicine*, 7, 161-173.
61. Yazdani, D., Shahnazi, S. & Seyfi, H. (2004). *Medicinal plant cultivation*. *Medicinal Plants Central Research Publication*. 169p. (in Farsi)
62. Zare, Sh., Sirousmehr, A., Ghanbari, A. & Tabatabaei, J. (2013). Changes in essential oil and some quantitative properties of summer savory (*Satureja hortensis* L.) under the influence of different levels of nitrogen fertilizer and compost solid waste. *Journal of Agricultural Research*, 11 (1), 191-199. (in Farsi)