


Research Article

Plant Prod., 2022, 44(4), 573-586
http://plantproduction.scu.ac.ir//


ISSN (P): 2588-543X
ISSN (E): 2588-5979

Investigating the Effect of Plant Density on Biochemical Characteristics and Essential Oil in Wild Thyme (*Thymbra spicata* L.)

Fatemeh Malek Maleki¹, Nosratollah Abbasi^{2*}, Esmail Sharifi Ashoorabadi³,
Mohammad Javad Zare⁴, Mehrshad Barary⁵

- 1- Ph.D. Graduate of Crop Ecology, Department of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, Ilam University, Ilam, Iran
- 2- ***Corresponding Author:** Assistant Professor, Department of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, Ilam University, Ilam, Iran (n.abbasi@ilam.ac.ir)
- 3- Associate Prof., Medicinal Plants Research Division, Research Institute of Forests and Rangelands/ Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Tehran, Iran
- 4- Associate Professor, Department of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, Ilam University, Iran
- 5- Assistant Professor, Department of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, Ilam University, Iran

Citation: MalekMaleki, F., Abbasi, N., Sharifi Ashoorabadi, E., Zare, M. J., & Barary, M. (2022). Investigating the effect of plant density on biochemical characteristics and essential oil in wild thyme (*Thymbra spicata* L.) picasso. *Plant Productions*, 44(4), 573-586.

 10.22055/ppd.2020.30250.1789

Received: 28 July 2019

Accepted: 23 September 2020

Abstract

Introduction

Among all major genera and species in the mint family, different types of organic compounds or metabolites such as phenolic compounds, flavonoids, anthocyanins, ascorbates, and carotenoids with antioxidant, antimicrobial, and anti-inflammatory effects are produced by means of metabolic processes. Research studies in this field have established that planting distance can have a significant effect on essential oil yield as well as the quantity and quality of secondary metabolites in medicinal plants. The main purpose of spacing between plants is also to provide a suitable mix of environmental factors (i.e. water, climate, light, and soil) to achieve optimum quality performance.

Materials and Methods

The present study was conducted using a factorial experiment based on randomized complete block design (RCBD) with three replications at Ilam University Research Farm, Iran, during 2016-2017. Planting density treatments at three levels (i.e., 20, 14, and 10 plants per m²) were determined based on changes in plant spacing on rows (i.e., three distances of 20, 30, and 45 cm). Two ecotypes were accordingly included: Malekshahi and Sumar. The characteristics measured



were photosynthetic pigments (chlorophyll a/b, total chlorophyll, and carotenoid), total phenol and flavonoid content, anthocyanin, as well as essential oil content and yield.

Results and Discussion


The results of this experiment revealed that the amount of antioxidant compound, photosynthetic pigments (i.e., chlorophyll a/b, total chlorophyll, and carotenoid), anthocyanin, and essential oil yield had been significantly affected by ecotype and plant density. Therefore, the highest amounts of total phenol (91.64 mg GAE/g DW) and flavonoid (5.20 mg QUE/ g DW) were observed at 20 and 30 cm row spacing. Total phenol and flavonoid also decreased by 7.2% and 12% as plant density was reduced. Moreover, row spacing of 30 cm increased the amount of chlorophyll a/b by 14 to 16% and carotenoid by 10%. The highest amount of anthocyanin (2.5 µg/g FW) was noticed at 20 cm row spacing. In the same vein, the highest yield of the essential oil was spotted at 20 cm row spacing (91.38 kg/ha) and for Malekshahi ecotype (87.5 kg/ha). Compared with the Sumar ecotype, the Malikshahi had higher content of photosynthetic pigments, total phenol and flavonoid, carotenoid, anthocyanin, as well as essential oil yield content and yield. Growth, quantity, and quality of medicinal plants are controlled by genetic processes as well as environmental and agronomic factors such as plant density. As plant density is enhanced to an optimum level, competition increases for absorption of water, nutrients, and quantity and quality of light received by leaves due to branching density and moderated penetration into canopy. As a result, the rate of cell division and leaf area development reduces and the content of photosynthetic pigments is diminished following the destruction of chloroplast structure and inhibition of biosynthesis of new chlorophylls. On the other hand, secondary metabolites such as phenolic compounds, flavonoids, and anthocyanin develop in the plant in response to environmental conditions in order to protect it against environmental stresses through suppressing oxygen free radicals. In line with the results of the related literature, it was observed that the content of photosynthetic pigments had diminished after increasing the density to 20 plants per m², but the content of carotenoid, anthocyanin, total phenol and flavonoid, as well as the essential oil yield had improved in the wild thyme (*Thymbra spicata* L.).

Conclusion

The results revealed that the leaves of the plant have good amounts of essential oils, phenolic compounds, and flavonoids. Since the highest percentage and yield of essential oil, phenol, flavonoids, and anthocyanins were observed in the treatment of density of 20 plants per square meter and Malikshahi ecotype, this level of density and Malikshahi ecotype is introduced for production and review in breeding programs.

Keywords: Anthocyanin, Carotenoids, Chlorophyll, Flavonoids, Total phenol

بررسی تأثیر تراکم بوته بر برخی خصوصیات بیوشیمیایی و اسانس گیاه دارویی زوفایی (*Thymbra Spicata*)

فاطمه ملک ملکی^۱، نصرت‌اله عباسی^{۲*} , ابراهیم شریفی عاشورآبادی^۳، محمد جواد زارع^۴،
مهرشاد براری^۵

۱- دانش آموخته دکتری اکولوژی گیاهان زراعی، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی دانشگاه ایلام، ایلام، ایران

۲- *نویسنده مسئول: استادیار، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ایلام، ایلام، ایران (n.abbasi@ilam.ac.ir)

۳- دانشیار، بخش تحقیقات گیاهان دارویی، مؤسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران

۴- دانشیار، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ایلام، ایلام، ایران

۵- استادیار، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ایلام، ایلام، ایران

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۰۵/۰۶

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۰۷/۰۲

چکیده

جهت بررسی تغییرات برخی از خصوصیات فیزیولوژیکی و فیتوشیمیایی برگ و سرشاخه دو اکوتیپ از گیاه دارویی زوفایی (*Thymbra spicata*) در پاسخ به تغییر تراکم بوته، آزمایشی به صورت فاکتوریل بر پایه بلوک‌های کامل تصادفی در سه تکرار و در سال زراعی ۱۳۹۶-۱۳۹۵ در مزرعه تحقیقاتی دانشکده کشاورزی دانشگاه ایلام انجام شد. تیمارهای آزمایش شامل سه تراکم کشت (فاصله روی ردیف ۲۰، ۳۰ و ۴۵ سانتی‌متر) و دو اکوتیپ بومی گیاه زوفایی از ارتفاعات زاگرس ایلام (ملکشاهی و سومار) بودند. بر اساس نتایج حاصل از این آزمایش میزان ترکیبات آنتی‌اکسیدانتی، رنگیزه‌های فتوستتزی (a, b و کل)، کارتنوئید، آنتوسیانین، و درصد اسانس به صورت معنی‌دار؛ تحت تأثیر اکوتیپ و تراکم کاشت قرار گرفتند. به طوری که بیشترین میزان فنل و فلاونوئید کل به ترتیب (۹۱/۶۴ میلی‌گرم اسید گالیک در گرم وزن خشک) و (۵/۲۰ میلی‌گرم کوئرستین در گرم وزن خشک برگ) در فاصله روی ردیف ۲۰ و ۳۰ سانتی‌متر مشاهده شد و با کاهش تراکم بوته میزان فنل و فلاونوئید کل به ترتیب ۲/۲ و ۱۲ درصد کاهش یافتند. فاصله روی ردیف ۳۰ سانتی‌متر، موجب افزایش میزان کلروفیل a و b به میزان ۱۴ تا ۱۶ درصد و کارتنوئید به میزان ۱۰ درصد گردید. بیشترین میزان آنتوسیانین (۲/۵ میکروگرم بر گرم وزن تر) در فاصله روی ردیف ۲۰ سانتی‌متر مشاهده شد که با کاهش تراکم ۱۰ درصد کاهش نشان داد. بیشترین درصد و عملکرد اسانس در فاصله روی ردیف ۲۰ سانتی‌متر (۹۱/۳۸ کیلوگرم در هکتار) و اکوتیپ ملکشاهی (۸۷/۵ کیلوگرم در هکتار) مشاهده شد که با افزایش فاصله روی ردیف، درصد و عملکرد اسانس به ترتیب ۶ و ۱۳ درصد کاهش یافت. اکوتیپ ملکشاهی در مقایسه با اکوتیپ سومار از محتوای بیشتری از رنگیزه‌های فتوستتزی، فنل و فلاونوئید کل، کارتنوئید، آنتوسیانین و درصد و عملکرد اسانس برخوردار بود.

کلیدواژه‌ها: آنتوسیانین، فلاونوئید، فنل، کارتنوئید، کلروفیل

مقدمه

گیاه زوفایی (*Thymbra spicata* L.) گیاهی است چندساله از خانواده نعنائیان (Lamiaceae)، که بیشتر به صورت طبیعی در رویشگاه‌های استان ایلام در ارتفاعات ۴۲۰ تا ۱۱۶۰ متری، در نواحی خشک و آفتابی و در خاک‌هایی با بافت سبک شنی و در عمق سطحی می‌روید و با نام محلی ازبوئه (Azbuia)، شناخته می‌شود (Mozafarian, 1996; Ghasemi Pirbalouti et al., 2009). این گیاه علاوه بر ایران در نواحی جنوب شرقی آنتالیا و نواحی مدیترانه ترکیه نیز رویش داشته و با نام‌های گوناگونی همچون تیم (Thyme)، هربا تیم (Herba Thyme)، رد تیم (Red Thyme) نیز شناخته می‌شود (Kizil, 2010). در طب سنتی این گیاه به عنوان ضد عفونی کننده دستگاه تنفسی (به صورت دم کرده)، داروی نیروزا، برطرف کننده اسپاسم‌های ماهیچه‌ای، خلط آور، دفع کننده انگل‌ها و اشتها آور استفاده می‌شود (Toncer and Kizil, 2005). گیاه زوفایی منبعی غنی از فلاونوئیدها، ترپنوئیدها و ایزوپرنوئیدها همچون تیمول و کارواکول است. تاکنون ۷۵ ترکیب مختلف از اسانس این گیاه شناسایی شده است. اسانس زوفایی از ارزش بالای اقتصادی برخوردار بوده و در بسیاری از کشورها به صورت ماده اولیه به صنایع داروسازی تحویل داده می‌شود (Kizil et al., 2015; Toncer et al., 2016).

برگ‌های گیاهان خانواده نعنائیان دارای اسیدهای فنلی از قبیل کافئیک اسید و مشتقات دی تری مر و سابونین هستند که دارای فعالیت آنتی‌اکسیدانی بوده و در جلوگیری از اکسیداسیون چربی‌ها بسیار مؤثر می‌باشند (Kennedy et al., 2004; Dastmalchi et al., 2008). در نتایج تحقیقات گزارش شده که کارتنوئیدها، ترکیبات فنلی و فلاونوئیدها دارای اثرات آنتی‌اکسیدانی، ضد میکروبی و ضدالتهابی هستند. این ترکیبات به عنوان حذف کننده رادیکال‌های آزاد عمل کرده و از بدن در برابر بیماری‌هایی همچون آلزایمر، پارکینسون، هانتینگتون، پیری و سرطان محافظت کرده و عملکرد

کبد، عروق سرخرگ و شبکیه چشم را بهبود می‌بخشند (Bridgers et al., 2010; Seyedalipour et al., 2016). هم‌چنین گزارش شده است که با افزایش محتوای ترکیبات فنلی در گیاهان، خواص آنتی‌اکسیدانی آن‌ها نیز افزایش پیدا می‌کند (Delju et al., 2017).

رشد و نمو و کمیت و کیفیت مواد مؤثره گیاهان دارویی از جمله تجمع ماده خشک و بیوسنتز اسانس، به وسیله فرآیندهای ژنتیکی کنترل می‌شود ولی عوامل محیطی و زراعی نیز در این زمینه نقش مهمی دارند. در بین عوامل زراعی، تراکم بوته اثرات بسیار زیادی بر عملکرد محصول در گیاهان دارویی دارد (Koocheki and Sarmadnia, 2012). هدف از فاصله‌گذاری میان بوته‌ها آن است که ترکیبی مناسب از عوامل محیطی (آب، اقلیم، نور و خاک) برای حصول حداکثر عملکرد با کیفیت مطلوب تأمین شود (Douglas et al. 2002). در این راستا گزارش شده است که فاصله کاشت بر عملکرد اسانس، کمیت و کیفیت متابولیت‌های ثانویه و تولید ماده خشک در واحد سطح در گیاهان دارویی از جمله آویشن (*Thymus vulgaris* L.) و بادرشبو (*Dracocephalum moldavica* L.) تأثیر معنی‌داری داشته است (Naghdi Badi et al. 2002; Hussein et al. 2006; Al-Ramamneh, 2009). در بررسی تأثیر تراکم بوته (۶۰، ۸۰ و ۱۰۰ بوته در مترمربع) بر درصد اسانس گیاه رازیانه بیشترین درصد اسانس در تراکم ۶۰ بوته و بالاترین عملکرد آن در تراکم ۱۰۰ بوته در مترمربع مشاهده شد (Delfieh et al. 2017).

Nooshkam et al. (2016a) در بررسی عملکرد دارویی، اسانس و کارواکول دو گونه مرزه خوزستانی (*Satureja khuzistanica* Jamzad and *Satureja rechingeri* Jamzad) کشت شده در دو مکان متفاوت گزارش دادند که مکان و ژنوتیپ بر عملکرد اسانس تأثیر معنی‌داری داشتند. این تفاوت در تولید اسانس می‌تواند به دلیل وابستگی تولید اسانس در گیاه به عوامل ژنتیکی علاوه بر سازگاری با فاکتورهای محیطی باشد. در بررسی تأثیر تراکم بوته بر صفات مرفولوژیک و عملکرد کمی و

تصادفی با سه تکرار انجام گرفت. تیمار تراکم کاشت در سه سطح (۲۰، ۱۴ و ۱۰ بوته در مترمربع) بر اساس تغییر فاصله بوته روی ردیف کشت (سه فاصله ۲۰، ۳۰ و ۴۵ سانتی‌متر) تعیین گردید. اکوتیپ‌های مورد استفاده شامل دو اکوتیپ ملکشاهی و سومار بود. قبل از انجام آزمایش نسبت به آزمون خاک محل انجام آزمایش اقدام گردید که برخی از خصوصیات اندازه‌گیری شده فیزیکی و شیمیایی خاک در جدول (۱) آمده است.

بذور گیاه در تابستان سال ۱۳۹۵، با کمک کارشناسان اداره کل منابع طبیعی استان ایلام از رویشگاه‌های طبیعی جمع‌آوری و به آزمایشگاه گیاه‌شناسی دانشگاه ایلام منتقل گردید و به استناد کلیدهای گیاه‌شناسی و رده‌بندی فلور ایلام (Mozafarian, 1996)، شناسایی شد. هم‌چنین با نمونه هرباریومی مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان ایلام مطابقت داده شد. بذر گیاه تا زمان کاشت در محیط سرد و تاریک نگهداری شد، کاشت گیاه در گلخانه در دی‌ماه ۱۳۹۵ انجام شد. در فروردین ماه ۱۳۹۶ و هنگامی که ارتفاع نشاهای تولیدی به ۱۵ سانتی‌متر رسید کار انتقال نشاها به مزرعه تحقیقاتی دانشگاه ایلام صورت گرفت. کشت گیاه به صورت دستی در کرت‌هایی به مساحت ۴ مترمربع، در فواصل ۲۰، ۳۰ و ۴۵ سانتی‌متر روی ردیف صورت گرفت. فاصله بین ردیف‌های کشت در تمام تیمارها ثابت و ۵۰ سانتی‌متر در نظر گرفته شد.

کنترل علف‌های هرز در طول فصل رشد به صورت وجین دستی در سه مرحله به فاصله یک، دو و سه ماه پس از کاشت گیاه در مزرعه انجام گرفت. آبیاری کرت‌های آزمایش در فواصل ۷ روز یک‌بار به روش آبیاری کرتی انجام شد. صفات مورد اندازه‌گیری در این آزمایش شامل؛ میزان رنگیزه‌های فتوسنتزی، کارتنوئید، فنل‌ها، فلاونوئیدها، آنتوسیانین، درصد و عملکرد اسانس گیاه بودند.

کیفی چهار گونه آویشن در شرایط دیم دماوند گزارش شد که بین گونه‌های مورد بررسی از نظر عملکرد رویشی، درصد اسانس و عملکرد اسانس اختلاف معنی‌داری مشاهده شد به طوری که بالاترین عملکرد مربوط به گونه *Thymus kotschyanus* در فاصله کاشت ۲۵ سانتی‌متر بود (Taheri et al. 2013).

امروزه با افزایش رواج استفاده از اسانس گیاهان دارویی و ترکیبات آنتی‌اکسیدانی در بخش‌های صنایع دارویی و غذایی، انجام تحقیقات جهت شناسایی منابع گیاهی و یافتن ترکیبات و مشتقات آن‌ها بسیار حائز اهمیت است. ارزش دارویی و تجاری گیاه زوفایی سبب برداشت بی‌رویه و غیراصولی آن از رویشگاه‌های طبیعی استان ایلام شده است و با توجه به این که تاکنون گزارشی مبنی بر بررسی ترکیبات بیوشیمیایی گیاه زوفایی ارائه نشده است در این پژوهش سعی شد تا تأثیر تراکم کاشت که از عوامل مهم زراعی تأثیرگذار بر عملکرد تولیدی و اسانس گیاهان دارویی است بر روی محتوای فنل و فلاونوئید کل، آنتوسیانین، کارتنوئید و اسانس اکوتیپ‌های موجود گیاه در استان مورد بررسی قرار گیرد تا اکوتیپی که قابلیت کاشت و تولید عملکرد مناسبی دارد جهت به کارگیری در برنامه‌های کاشت و تولید گیاه معرفی شود.

مواد و روش‌ها

به منظور بررسی تغییرات برخی خصوصیات فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی دو اکوتیپ از گیاه دارویی زوفایی (*Thymbra spicata*) در پاسخ به تغییر تراکم کاشت، آزمایشی مزرعه‌ای در سال زراعی ۱۳۹۶-۱۳۹۵ در مزرعه آموزشی-تحقیقاتی دانشگاه ایلام انجام گرفت. منطقه محل آزمایش دارای عرض جغرافیایی ۳۳ درجه و ۳۷ دقیقه و طول جغرافیایی ۴۶ درجه و ۲۸ دقیقه با ۱۱۷۴ متر ارتفاع از سطح دریا بود. آزمایش در قالب فاکتوریل بر پایه بلوک‌های کامل

Table 1. Soil properties of the Field

Soil texture	Salinity (dS.m ⁻¹)	pH	O.C (%)	Clay (%)	Loam (%)	Sand (%)	Total N (%)	P ₂ O ₅ (ppm)	K ₂ O (ppm)
Silty loam	0.26	7.39	1.74	27	58	15	0.18	4.94	356.26

کربنات سدیم ۵ درصد به آن اضافه گردید. مخلوط حاصل به مدت یک ساعت در تاریکی نگهداری گردید. این عصاره برای سنجش فنل کل با استفاده از اسپکتروفتومتر (UV-Visible مدل Cary50) برحسب میلی گرم بر گرم وزن خشک استفاده شد (Ordone, 2006). میزان فلاونوئید کل بر اساس روش رنگ‌سنجی آلومینیوم کلراید و با استفاده از کوئرستین اندازه‌گیری شد (Chang et al., 2002).

تجزیه آماری داده‌های آزمایش با استفاده از نرم‌افزار SAS 9.2 انجام شد و برای مقایسه میانگین‌ها از آزمون حداقل اختلاف معنی‌دار LSD در سطح پنج درصد استفاده شد.

نتایج و بحث

رنگی‌های فتوستتزی

بر اساس جدول (۲)، اثرات اصلی تراکم کاشت و اکوتیپ و نیز اثر متقابل تراکم و اکوتیپ بر صفات کلروفیل a، b، کلروفیل کل و کارتنوئید در سطح یک و پنج درصد معنی‌دار بود. میزان کلروفیل a تحت تأثیر اثر متقابل تراکم کاشت قرار و اکوتیپ گرفت به طوری که بیشترین میزان آن (۹/۹۲ میلی گرم بر گرم وزن تر)، در تیمار تراکم ۱۴ بوته در مترمربع و اکوتیپ ملکشاهی حاصل گردید و با افزایش تراکم از ۱۴ به ۲۰ بوته در مترمربع از میزان آن ۱۶/۱۵ درصد کاسته شد. کمترین میزان این رنگی‌زده فتوستتزی (۵/۸۷ میلی گرم بر گرم وزن تر)، در تراکم ۲۰ بوته در مترمربع و اکوتیپ سومار مشاهده گردید (جدول ۳). همین روند نیز در میزان رنگی‌زده فتوستتزی کلروفیل b مشاهده گردید؛ به طوری که بیشترین میزان آن (۳/۳۵ میلی گرم بر گرم وزن تر)، در بین تیمارهای مورد بررسی در تراکم ۱۴ بوته در مترمربع و اکوتیپ ملکشاهی و کمترین میزان این رنگی‌زده فتوستتزی (۱/۹۷ میلی گرم بر گرم وزن تر)، در تیمار تراکم ۱۰ بوته در مترمربع و اکوتیپ سومار دیده شد (جدول ۳). بیشترین و کمترین مقدار کلروفیل کل (۱۳/۲ و ۷/۹۱ میلی گرم بر گرم وزن تر) به ترتیب در تیمار تراکم ۱۴ بوته در مترمربع در اکوتیپ ملکشاهی و تیمار تراکم ۲۰ بوته در مترمربع در

جهت استخراج اسانس، قسمت‌های سرشاخه گیاه در مرحله گلدهی جمع‌آوری و در سایه در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد، خشک گردید. اسانس‌گیری از سرشاخه‌های گلدار با استفاده از دستگاه کلونجر و به روش تقطیر با بخار آب انجام گرفت. به این منظور از ۵۰ گرم نمونه‌های خشک و آسیاب شده به همراه ۵۰۰ میلی لیتر آب مقطر استفاده شد. زمان لازم برای استخراج اسانس از هر نمونه، ۳ ساعت بود. سپس برحسب وزن خشک گیاه، درصد اسانس و از حاصل ضرب درصد اسانس در عملکرد خشک برگ عملکرد اسانس محاسبه گردید.

رنگی‌های فتوستتزی شامل کلروفیل a و b، کلروفیل کل و کارتنوئید با استفاده از روش لیچنتال (Lichtenthaler, 1987) اندازه‌گیری شد که بر اساس آن مقدار ۰/۲ گرم از برگ‌های تازه گیاه به همراه ۱۵ میلی لیتر استون ۸۰ درصد سائیده و پس از صاف کردن، جذب آن‌ها با اسپکتروفتومتر در طول موج‌های ۶۴۶/۸، ۶۶۳/۲۰ و ۴۷۰ نانومتر قرائت شد و در نهایت غلظت رنگی‌زده‌های فتوستتزی براساس رابطه زیر برحسب میلی گرم بر گرم وزن تر محاسبه گردید.

$$\text{Chl.a} = (12.25A_{663.2} - 2.79A_{646.8})$$

$$\text{Chl.b} = (21.21A_{646.8} - 5.1 A_{663.2})$$

$$\text{Chl.T} = \text{Chl.a} + \text{Chl.b}$$

$$\text{Car} = [(1000A_{470} - 1.8 \text{Chl.a} - 85.02 \text{Chl.b})/198]$$

در رابطه فوق Chl.a کلروفیل a، Chl.b کلروفیل b، Chl.T کلروفیل کل، Car میزان کارتنوئید و A میزان جذب در طول موج‌های مختلف است.

برای اندازه‌گیری غلظت آنتوسیانین برگ از روش وانگر (Wanger, 1979) استفاده شد. میزان ترکیبات فنلی بر اساس روش رنگ‌سنجی فولین-سیوکالتیو و برحسب منحنی استاندارد گالیک اسید در طول موج ۷۲۵ نانومتر اندازه‌گیری شد. برای این کار ابتدا ۰/۱ گرم از پودر برگ را در ۵ میلی لیتر اتانول ۹۵ درصد سائیده و به مدت ۲۴ ساعت در تاریکی نگهداری شد. سپس به یک میلی لیتر محلول رویی یک میلی لیتر اتانول ۹۵ درصد اضافه و با آب مقطر حجم محلول به پنج میلی لیتر رسانده شد. سپس ۰/۵ میلی لیتر معرف فولین ۱۰ درصد و یک میلی لیتر

Table 2. Analysis of variance of effect of density f some biochemical characteristic and essential oil of two ecotypes of *Thymbra spicata*

S.O.V	df	Chlorophyll a	Chlorophyll b	Total Chlorophyll	Carotenoids	Phenol	Flavonoid	Anthocyanin	Essential oil %	Essential oil yield
Replication	2	0.055	0.141	0.171	0.0011	648.39	1.26	8.03	0.055	31.51
Intra row space (A)	2	12.05**	0.0302 ^{ns}	9.36**	0.108 ^{ns}	492.66*	5.45*	6.34**	0.607**	1386.2**
Ecotype (B)	1	3.18*	1.41*	21.85**	0.297*	1456.6**	9.63*	3.87 ^{ns}	0.347*	1854.6**
A × B	2	5.16*	0.833*	11.35**	0.225*	256.13 ^{ns}	0.559 ^{ns}	5.67 ^{ns}	0.024 ^{ns}	16.17 ^{ns}
Error	6	0.529	0.092	1.20	0.040	91.70	1.59	4.84	0.246	62.95
C.V. (%)		9.62	12.19	10.82	10.90	11.50	27.24	10.17	7.27	10.25

*, ** and ns: significant at 5 and 1 % probability level, and no significant respectively.

Table 3. Mean comparison of the interaction of plant density and ecotype on photosynthetic Pigments and essential oil of *Thymbra spicata*

Treatment		Chlorophyll a	Chlorophyll b	Total Chlorophyll	Carotenoids
Intra row space	Ecotype	(mg/g FW)	(mg/g FW)	(mg/g FW)	(mg/g FW)
20 centimeters	Malekshahi	5.98 ^d	2.15 ^{bc}	10.74 ^{bc}	1.68 ^{bc}
	Sumar	5.87 ^d	2.33 ^{bc}	7.19 ^{cb}	1.67 ^{bc}
30 centimeters	Malekshahi	9.92 ^a	3.35 ^a	13.29 ^a	2.27 ^a
	Sumar	6.94 ^{cd}	2.56 ^b	9 ^{cd}	1.93 ^{ab}
45 centimeters	Malekshahi	8.49 ^b	2.6 ^b	11.38 ^{ab}	1.87 ^{bc}
	Sumar	8.15 ^{bc}	1.97 ^c	10.74 ^{bc}	1.56 ^c

Followed by the same letter(s) were not significantly different according to LSD (p<0.05) test.

کاشت می‌شود (Antoniotta et al., 2014). از سوی دیگر افزایش تراکم جمعیت گیاهی باعث قرار گرفتن بافت‌های گیاهی در سایه و تغییر در کمیت و کیفی نور دریافتی در برگ‌ها می‌شود که می‌تواند تأثیر شدیدی بر آنزیم‌های کنترل‌کننده رنگیزه‌های فتوسنتزی داشته باشد (Nikneghad and Emam, 2011). در تحقیق دیگری نیز گزارش شد که با افزایش تراکم بوته تا سطح بهینه، رقابت بین بوته‌ها بر سر منابع محیطی از جمله آب، باعث کاهش توسعه سلول‌ها و سطح برگ می‌شود که این امر باعث تجمع سلول‌های بیشتری در واحد سطح برگ و افزایش غلظت کلروفیل می‌گردد اما با افزایش تراکم از سطح بهینه، علی‌رغم افزایش وزن مخصوص برگ، غلظت کلروفیل کاهش می‌یابد (Nonami et al., 1997). افزایش غلظت رنگیزه‌های فتوسنتزی در تراکم ۱۴ بوته نسبت به ۱۰ بوته در مترمربع می‌تواند به این سبب باشد؛ اما با افزایش تراکم تا سطح ۲۰ بوته غلظت کلروفیل در برگ کاهش یافت که با نتایج تحقیقات ارائه شده همسو

اکوتیپ سومار مشاهده گردید (جدول ۳). بیشترین کارتنوئید (۲/۲۷ میلی‌گرم بر گرم وزن تر) در تراکم ۱۴ بوته در مترمربع و اکوتیپ ملشکاهی و کمترین میزان آن (۱/۵۶ میلی‌گرم بر گرم وزن تر) در تراکم ۱۰ بوته در مترمربع و اکوتیپ سومار مشاهده شد (جدول ۳). کلروفیل رنگدانه‌ای است که مسئولیت اصلی آن دریافت انرژی نور برای استفاده در فتوسنتز است. افزایش سطح تراکم بوته، باعث افزایش رقابت بر سر جذب آب و عناصر غذایی بین بوته‌ها می‌شود که به دنبال آن سرعت تقسیم سلولی، سطح برگ و رشد اندام‌های هوایی در گیاه و غلظت رنگیزه‌های فتوسنتزی به دلیل ممانعت از بیوسنتز کلروفیل‌های جدید و تخریب ساختمان کلروپلاست کاهش می‌یابد (Mafakheri et al., 2010; Saifuddin et al., 2010; Kumar et al., 2013). هم‌چنین گزارش شده است با افزایش تراکم بوته تعداد کلروپلاست و گرانا در برگ به صورت معنی‌داری کاهش می‌یابد که باعث کاهش غلظت رنگیزه‌های فتوسنتزی در تراکم بالای

بیوسنتز کاروتنوئیدها می شود. در تحقیقات دیگری نیز گزارش شده است که با افزایش تراکم بوته و ایجاد رقابت بر سر منابع محیطی، محتوای کاروتنوئیدها در برگ جهت حفاظت از بافت های فتوسنتزی به خصوص کلروفیل ها افزایش می یابد که نتیجه حاصل شده همسو با نتایج تحقیقات ارائه شده می باشد (Candan and Tarhan, 2003; Zhang and Li, 2003; Rostaei and Fallah, 2016).

فنل و فلاونوئید کل

بر اساس نتایج جدول (۲)، اثرات اصلی تراکم کاشت و اکوتیپ بر میزان فنل کل در سطح احتمال پنج و یک درصد و بر میزان فلاونوئید کل در سطح احتمال پنج درصد معنی دار گردید. میزان فنل کل تحت تأثیر تراکم بوته قرار گرفت به طوری که بیشترین میزان آن (۹۱/۶۴ میلی گرم اسید گالیک در گرم وزن خشک) در تراکم ۲۰ بوته در مترمربع مشاهده شد و با کاهش تراکم از ۲۰ به ۱۰ بوته در مترمربع، از میزان آن ۷/۲ درصد کاسته شد. در بین اکوتیپ های مورد بررسی نیز بیشترین میزان فنل کل (۹۲/۲ میلی گرم اسید گالیک در گرم وزن خشک) در اکوتیپ ملکشاهی مشاهده شد. بیشترین میزان فلاونوئید کل (۵/۲۰ میلی گرم کوئرستین در گرم وزن خشک برگ) در تراکم ۱۴ بوته در مترمربع مشاهده شد و با کاهش تراکم بوته از میزان آن ۱۲ درصد کاسته شد (جدول ۴). بین اکوتیپ های مورد بررسی نیز بیشترین میزان فلاونوئید کل (۵/۳۶ میلی گرم کوئرستین در گرم وزن خشک برگ) در اکوتیپ ملکشاهی مشاهده شد (جدول ۴).

می باشد. در تحقیقی بر روی گیاه کلزا گزارش شد، از بین تراکم های (۴۰، ۶۰ و ۸۰ بوته در مترمربع) بیشترین میزان کلروفیل a و b در تراکم ۴۰ بوته مشاهده شد و با افزایش تراکم مقدار آن ها کاهش یافت که دلیل آن را نفوذ کم نور در تراکم های بالا ذکر کردند (Nasiri et al., 2017). در بررسی تأثیر تراکم بوته بر خصوصیات فتوسنتزی در گیاه ریحان گزارش شد که با افزایش تراکم بوته محتوای کلروفیل برگ کاهش یافت (Zokaei et al., 2014). کاهش محتوای کلروفیل با افزایش تراکم در تحقیقات دیگری نیز گزارش شده است (Emadi et al., 2013; Ren et al., 2017).

کاروتنوئیدها رنگیزه های محافظتی هستند که علاوه بر دریافت نور، نقش مهمی در حفاظت از رنگیزه های فتوسنتزی در برابر اکسیداسیون نوری بر عهده دارند (Bajji et al., 2001). همان طور که توضیح داده شد افزایش تراکم بوته در کمیت و کیفیت نور دریافتی توسط برگ تغییراتی ایجاد می کند. کیفیت نور با رشد و توسعه گیاه ارتباط داشته و به نسبت نور قرمز به مادون قرمز اشاره دارد که حدود ۱/۱۵ می باشد (Raie et al., 2015). در شرایط سایه نسبت نور قرمز به قرمز دور افزایش می یابد در نتایج تحقیقات آمده است نور قرمز، بیوسنتز کاروتنوئید را تحریک و نور مادون قرمز آن را مهار می کند هم چنین در شرایط آفتاب کامل مقدار کاروتنوئید به دلیل حفاظت نوری از کلروفیل کاهش می یابد (Fahlen et al., 1999). سایه دهی تاج پوشش گیاهی در شرایط تراکم بهینه، باعث افزایش

Table 4. Mean comparison of the effect of plant density and ecotype on some biochemical characteristic and essential oil of two ecotypes of *Thymbra spicata*

	Treatment	Phenols (mg GAE/g DW)	Flavonoids (mg QUE/ g DW)	Anthocyanin (µg/g Fw)	Essential oil (%)	Essential oil yield (kg/ha)
Intra row space	20 centimeters	91.64 ^a	5.16 ^a	2.5 ^a	3.75 ^a	91.38 ^a
	30 centimeters	84.36 ^{ab}	5.20 ^a	2.2 ^b	3.54 ^a	79.48 ^b
	45 centimeters	73.63 ^b	3.53 ^b	1.8 ^c	3.12 ^b	61.20 ^c
Ecotype	Malekshahi	92.20 ^a	5.36 ^a	2.11 ^a	3.61 ^a	87.50 ^a
	Sumar	74.21 ^b	3.9 ^b	2.2 ^a	3.33 ^b	67.20 ^b

Followed by the same letter(s) were not significantly different according to LSD (p<0.05) test.

آنتوسیانین

نتایج جدول (۲) نشان داد که تأثیر تراکم بوته بر میزان آنتوسیانین در سطح یک درصد معنی دار است. میزان آنتوسیانین تحت تأثیر تیمار تراکم بوته قرار گرفت به طوری که بیشترین میزان آن (۲/۵ میکرو گرم بر گرم وزن تر) در تراکم ۲۰ بوته در مترمربع به دست آمد و با کاهش تراکم تا ۱۰ بوته در مترمربع از میزان آن ۱۰/۷ درصد کاسته شد (جدول ۴).

آنتوسیانین همانند کارتنوئید رنگیزه‌ای محافظ بوده که گزارش شده است تحت تأثیر فاکتورهای محدودکننده محیطی از قبیل دسترسی به آب، نور، مواد غذایی و دما در برگ گیاه تجمع می‌یابد و از گیاه در برابر اکسیداسیون نوری محافظت می‌کند (Wolf, 1963; Ghanati et al., 2010). تجمع این ترکیب به گیاه اجازه می‌دهد تا نسبت به تنش‌های محیطی در مقایسه با تغییرات مرفولوژیک و فیزیولوژیک به سرعت و بلافاصله پاسخ دهد (Watkinson et al., 2006). با افزایش تراکم بوته و رقابت بر سر جذب آب، گیاه با تنش رطوبتی مواجه می‌شود که تحت این شرایط با تولید کارتنوئیدها و آنتوسیانین‌ها از نقش حافظتی آنها در برابر اکسیداسیون نوری کلروفیل بهره می‌گیرد (Farooq et al., 2009). در بررسی تأثیر تراکم بوته (۲، ۴ و ۶ بوته در مترمربع) بر محتوای آنتوسیانین در گیاه چای ترش (*Hibiscus sabdariffa*) بیشترین میزان آن در تراکم ۴ بوته در مترمربع گزارش شد (Borjiabad, 2014).

درصد و عملکرد اسانس

بر اساس نتایج جدول (۲)، اثرات اصلی تراکم بوته و اکوتیپ بر صفت درصد اسانس در سطح احتمال یک و پنج درصد معنی دار شد. بر اساس جدول مقایسه میانگین داده‌های آزمایش، مشاهده شد که از بین تیمارهای تراکم، بیشترین درصد اسانس در تراکم ۲۰ بوته در مترمربع (۳/۷۵ درصد) بدست آمد به طوری که کاهش تراکم از میزان آن به طور معنی داری به مقدار ۶ درصد کاست. از بین دو اکوتیپ مورد بررسی نیز، اکوتیپ ملکشاهی (۳/۱۶ درصد) درصد اسانس بالاتری را نسبت

گیاهان ترکیبات فله‌ای را در پاسخ به ترکیبات پیام‌رسان که نقش دفاعی مهمی دارند تولید می‌کنند (Khanpour-Ardestani et al., 2014). در تحقیقی گزارش شد که افزایش تراکم بوته در واحد سطح به دلیل ایجاد رقابت بین بوته‌ها، به عنوان یک عامل تنش زا باعث فعال شدن سیستم دفاعی گیاه می‌گردد که در نتیجه آن متابولیت‌های ثانویه نظیر فنل، فلاونوئید و اسانس در گیاه تولید می‌شود (Habibzadeh and Asghari, 2018). در بررسی محتوای فنل در گیاهان هم خانواده زوفایی، مقدار فنول در آویشن (۱۵۸/۵-۲۴۵/۲۶)، مرزه (۱۴۰/۲-۳۸/۴)، نعناع (۱۸/۳-۲۸۴/۳)، رزماری (۵۱/۲-۱۷۸/۸)، بادرنجبویه (۲۹۹/۵-۵۴/۹)، ریحان (۲۸/۲-۲۹/۹) و مرزنجوش (۲۱/۸-۲۳۶) میلی گرم اسید گالیک در گرم وزن خشک برگ گزارش شد (Hossain et al., 2013; Ulewicz-Magulska and Wesolowski, 2019). در تحقیقی روی اثر تراکم بوته (۷، ۱۰ و ۱۶ بوته در مترمربع) بر محتوای فنل کل در گیاه دارویی سرخارگل (*Echinacea purpurea* L.) گزارش شد که بیشترین مقدار آن (۵۱/۱ میلی گرم گالیک اسید در گرم ماده خشک) در تراکم ۱۰ بوته در مترمربع حاصل شد (Asadi Sanam et al., 2018). در تحقیقی که به منظور بررسی محتوای فلاونوئیدهای مرزه (*Satureja hortensis* L.) تحت تأثیر سه فاصله روی ردیف (۱۵، ۳۰ و ۴۵ سانتی متر) انجام شده بود، بیشترین میزان فلاونوئید در فاصله روی ردیف ۱۵ سانتی متر مشاهده شد (El-Leithy et al., 2017). در بررسی تأثیر تراکم بوته (۱۵۰، ۲۰۰ و ۲۵۰ بوته در مترمربع) در گیاه دارویی ریحان (*Ocimum basilicum* L.)، کمترین میزان فنول در تراکم ۱۵۰ بوته مشاهده شد و با افزایش تراکم بوته میزان آن افزایش یافت (Badakhshan et al., 2018). هم‌چنین در بررسی خصوصیات فیتوشیمیایی گل گاوزبان ایرانی (*Echium amoenum* Fisch and Mey.) تحت تأثیر تراکم بوته (۳، ۵ و ۱۰ بوته در مترمربع)، بیشترین میزان فلاونوئید در تراکم ۵ بوته در مترمربع مشاهده شد (Amiri et al., 2017).

اسانس در واحد سطح به دلیل افزایش در شاخص سطح برگ، جذب تشعشع خورشیدی و درصد اسانس، افزایش یافت (Khazaie et al., 2008; Hekmati et al., 2012; Heidari et al., 2008). در بررسی تأثیر تراکم بوته بر اسانس و ترکیبات آن در گیاه مریم گلی (*Salvia officinalis*) گزارش شده است که با افزایش تراکم بوته در واحد سطح مقدار و درصد اسانس در گیاه افزایش یافت (Abu-Darwish et al., 2013). در گیاه زوفایی نیز بیشترین درصد و عملکرد اسانس تولیدی در بالاترین سطح تراکم بوته حاصل شد که با نتایج پژوهش‌های انجام شده مطابقت می‌کند.

هم راستا با نتایج پژوهش انجام شده، بررسی‌ها روی عملکرد اسانس گونه‌های گیاهانی نظیر نعناع (*Mentha longifolia* L. var *amphilema*), مرزه (*Satureja khuzistanica*) و اکوتیپ‌های آویشن دنیایی (*Thymus daenensis* Celak). نشان داد که بین گونه‌ها و اکوتیپ‌های مورد بررسی از نظر درصد و عملکرد اسانس اختلاف معنی‌داری وجود داشته است که با توجه به یکسان بودن شرایط و محیط آزمایش، این اختلاف نشان‌دهنده تأثیر تفاوت‌های ژنتیکی بین گونه‌ها بر عملکرد صفات مذکور است (Abbaszadeh et al., 2009; Aflakian et al., 2012; Nooshkam et al., 2016).

نتیجه‌گیری

لازمه استفاده مطلوب گیاه از عوامل محیطی همچون نور، آب، مواد غذایی و نیز جلوگیری از بروز رقابت شدید بر سر این منابع، بهینه بودن تعداد بوته در واحد سطح است. از سوی دیگر عملکرد اسانس در گیاه دارویی زوفایی تابعی از درصد اسانس و عملکرد برگ به‌عنوان اندام دارای اسانس است که هرگونه افزایش در این اجزا از طریق تعیین تراکم مطلوب بوته منجر به افزایش عملکرد اسانس تولیدی خواهد شد. نتایج پژوهش نشان داد که برگ گیاه دارای مقادیر مناسبی اسانس، ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی است. از آنجایی که بیشترین میزان درصد و عملکرد اسانس، میزان فنل،

به اکوتیپ سومار تولید کرد (جدول ۴). با توجه به نتایج جدول (۲)، هم‌چنین مشاهده شد اثرات اصلی تراکم بوته و اکوتیپ بر صفت عملکرد اسانس در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار شد. بیشترین و کمترین میزان عملکرد اسانس (۹۱/۳۸ و ۶۱/۲۰ کیلوگرم در هکتار) به ترتیب در تیمار تراکم ۲۰ و ۱۰ بوته در مترمربع به دست آمد به طوری که کاهش تراکم بوته از میزان آن به طور معنی‌داری به مقدار ۱۳ درصد کاست (جدول ۳). در بین اکوتیپ‌های مورد بررسی، اکوتیپ ملکشاهی با عملکرد اسانس ۸۷/۵ کیلوگرم در هکتار بر اکوتیپ سومار برتری داشت (جدول ۳).

تحقیقات نشان داده است که میزان اسانس و ترکیبات شیمیایی گیاه به وسیله عوامل مختلفی از جمله، فاکتورهای ژنتیکی، شرایط اکولوژیکی، آب و هوایی، زراعی و سن گیاه تحت تأثیر قرار می‌گیرد (Dudai, 2008; Akbarinia, 2013). شکل‌گیری سریع سیستم فتوسنتزکننده جهت جذب مؤثر نور شرط دستیابی به عملکرد بالا است. تراکم کاشت بر توزیع مناسب و بهتر نور در درون پوشش گیاهی و افزایش عملکرد در گیاهان دارویی مؤثر است. در گیاهان دارویی عملکرد اسانس به عملکرد ماده خشک تولیدی و بازده اسانس بستگی دارد (Rahmati et al., 2009). در نتایج تحقیقات آمده است که تا زمانی شرایط محیطی فراهم باشد گیاه کربن تثبیت شده را به مصرف رشد و تقسیم سلولی می‌رساند اما در صورت وقوع تنش، مخازن متابولیت‌های ثانویه تشکیل می‌شود و گیاه کربن را به تولید مواد دارویی اختصاص می‌دهد (Salarpour, 2015; Ghoraba and Farahbakhsh, 2015). در بررسی تأثیر تراکم بوته بر گیاهان زوفا (*Hyssopus officinalis*)، آویشن (*Thymus vulgaris*)، مرزه (*Satureja hortensis*)، مرزه سهندی (*Satureja sahendic*) و نعناع فلفلی (*Mentha piperita* L.) گزارش شد که با افزایش تراکم بوته در واحد سطح، به دلیل کاهش نفوذ نور به درون پوشش گیاهی، عملکرد تک بوته، کاهش یافت اما عملکرد

بهداشتی و غذایی دست یافت.

سپاس‌گزاری

نویسندگان این مقاله بر خود لازم می‌دانند از پشتیبانی‌های گروه زراعت دانشگاه ایلام و از دانشگاه ایلام به جهت حمایت مالی این پژوهش کمال تشکر و قدردانی را داشته باشند.

فلاونوئید و آنتوسیانین تولیدی در تیمار تراکم ۲۰ بوته در مترمربع و اکوتیپ ملکشاهی، مشاهده گردید این سطح از تراکم و اکوتیپ ملکشاهی جهت تولید و بررسی در برنامه‌های اصلاحی معرفی می‌گردد تا از طریق اهلی کردن خصوصیات گیاه بتوان به عملکرد قابل‌قبولی جهت تأمین نیازهای بخش دارویی، صنایع

References

- Abbaszadeh, B., Rezaei, M. B., Ardakani, M. R., & Baseri, R. (2009). Investigation of morphological traits and performance of flower heads of different species of mint collected from different regions. *Research in Agriculture*, 1(1), 40-49. [In Farsi]
- Abu-Darwish, M., Al-Ramamneh, E. A. D., Salamon, I., Abu-Dieyeh, Z., Al-Nawaiseh, M., & Albdour, T. (2013). Determination of essential oil bioactive components and rosmarinic acid of *Salvia officinalis* cultivated under different intra-row spacing. *Notulae Scientia Biologicae*, 5(2), 198-203.
- Aflakian, S., Zeinali, H., Maddah Arefy, H., Enteshary, Sh., & Kaveh, SH. (2012). Study of yield and yield components in 11 ecotype of *Thymus daenensis* Celak. *Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants*, 28(2), 187-197. [In Farsi]
- Akbarinia, A. (2013). Response of *Satureja sahendica* Bormn. To nitrogen and plant density. *Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants*, 29(2), 260-268. [In Farsi]
- Al-Ramamneh, E. D. (2009). Plant Growth Strategies of *Thymus vulgaris* L. in Response to population density. *Industrial Crop and Products*, 30(3), 389-394.
- Amiri, M. B., Rezvani Moghadam, P., Jahan, M., Salehabadi, M., & Nasri, N. (2017). Effects of plant density and different organic and chemical fertilizers on some phytochemical characteristics of Iranian ox-tongue (*Echium amoenum* Fisch. & Mey). *Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants*, 33(4), 649-662. [In Farsi]
- Antonietta, M., Fanello, D. D., Acciaresi, H. A., & Guiamet, J. J. (2014). Senescence and yield responses to plant density in stay green and earlier-senescing maize hybrids from Argentina. *Field Crop Research*, 155, 111-119.
- Asadi Sanam, S., Zavareh, M., Pirdashti, H., Sefidkon, F., & Nemat Zadeh, G. (2018). Effect of transplanting date and plant density on dry matter and total phenol in shoot of purple coneflower (*Echinaceae purpurea* (L.) Moench) in Sari. *Journal of Crops Improvement*, 19(4), 1095-1111. [In Farsi]
- Badakhshan, F., Sedighi Dehkordi, F., & Mortazavi, M. H. (2018). The effect of plant density and cultivar on morphological characteristics, yield and quality traits of basil (*Ocimum basilicum* L.) in hydroponic system. *Journal of Horticulture Science*, 32(2), 263-272. [In Farsi]
- Bajji, M., Lutts, S., & Kient, J. M. (2001). Water deficit effects on solute contribution to osmotic adjustment as a function of leaf ageing in three durum wheat (*Triticum durum* Defs.) cultivars performing differently in arid condition. *Plant Science*, 160(4), 669-681.
- Borjiabad, A. (2014). *The effects of plant density and application of iron and zink on quantitative and qualitative yield of Roselle (Hibiscus sabdariffa L.)*. M.Sc Thesis, University of Zabol, Zabol, Iran. [In Farsi]
- Bridgers, E. N., Chinn, M. S., & Truong, V. D. (2010). Extraction of anthocyanins from industrial purple-fleshed sweet potatoes and enzymatic hydrolysis of residues for fermentable sugars. *Industrial Crops Production*, 32(3), 613-620.

- Candan, N., & Tarhan, L. (2003). Change in chlorophyll-carotenoid contents, antioxidant enzyme activities and lipid peroxidation levels in Zn-stressed *Mentha pulegium*. *Turkish Journal of Chemistry*, 27(1), 21-30.
- Chang, Y. L., Kim, D. O., Lee, K. W., Lee, H. J., & Lee, C. Y. (2002). Vitamin C equivalent antioxidant capacity (VCEAC) of phenolic phytochemicals. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 50(13), 3713-3717.
- Dastmalchi, K., Damien, D., Oinonen, H. J., Darwis, P. P., Laakso, I., & Hiltunen, R. (2008). Chemical composition and in vitro antioxidative activity of a lemon balm (*Melissa officinalis* L.) extract. *LWT Food Science and Technology*, 41(3), 391 - 400.
- Delfieh, M. R., Modares sanavy, S. A., & Farhodi, R. (2017). Investigating the effects of plant density, seed inoculation with bacteria and different nitrogen fertilizing methods on yield, yield components and essential oil of fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.). *Plant Productions*, 40(1), 111-121. [In Farsi]
- Delju, A., Mantashlo, J., & Piri, K. (2017). The study of flavonoids and antioxidant power of etanolic, metanolic, hydroalcoholic and etylacetatic extracts of branch and stem bark of *Salix Alba*. *Journal of Cellular and Molecular Researches*, 30(3), 381-391. [In Farsi]
- Douglas, J. A., Follet, J. M., & Heaney, A. J. (2002). The effect of plant density on production of valerian root. *Acta Horticulturae*, 426(42), 264-272.
- Dudai, N. (2008). Optimization and improvement of phenolic mono terpenes production in *Oregano* (*Origanum* spp). *Acta Horticulture*, 778(1), 15-28.
- El-Leithy, A. S., El-Hanafy, S. H., Khattab, M. E., Ahmed, S. S., & El-Sayed, A. (2017). Effect of nitrogen fertilization rates, plant spacing and their interaction on essential oil percentage and total flavonoid content of summer savory (*Satureja hortensis* L.) plant. *Egyptian Journal of Chemistry*, 60(5), 805-816.
- Emadi, N., Jahanbin, H., & Balouchi, R. (2013). Effect of drought dtress and dlant density on yield and some physiological characteristics of pinto bean (*Phaseolus vulgaris* L.) in yasouj region. *Journal of Crop Production and Processing*, 3(8), 25-36. [In Farsi]
- Fahlen, A., Welander M., & Wennersten R. (1999). Effects of light-temperature regimes on plant growth and essential oil yield of selected aromatic plants. *Journal Science Food Agriculture*, 73(1), 111-119.
- Farooq, M., Wahid. A., Kobayashi, N., Fujita, D., & Basra, S. M. A. (2009). Plant drought stress effects Mechanisms and management. *Agronomy for Sustainable Development*, 29, 185-212.
- Ghanati, F., Bakhtiyarian, S., & Abdolmaleki, P. (2010). Effects of methyl jasmonate on the secondary metabolites of *Calendula officinalis* L. *Modares Journal of Biotechnology*, 1(1), 20-30. [In Farsi]
- Ghasemi Pirbalouti, A., Bahmani, M., & Avijgan, M. (2009). Anti-candida activity of some of the Iranian medicinal plants. *Electronic Journal of Biology*, 5(4), 85-88.
- Habibzadeh, F., & Asghari, B. (2018). Study the effect of intercropping and chemical fertilizers on essential oil, phenolic and flavonoid contents and some biological properties of (*Hyssopus officinalis* L.). *Eco-phytochemical Journal of Medicinal Plants*, 6(3), 96-110. [In Farsi]
- Heidari, F., Zehtab-Salmasi, S., Javanshir, A., Aliari, H., & Dadpour, M.R. (2008). The effect of plant density on yield and production of essential oil of peppermint (*Mentha piperita* L.). *Journal of water and Soil Science*, 12(45), 501-510. [In Farsi]
- Hekmati, M., Hadian, J., & Tabaie Aghdaei, S. R. (2012). Evaluating the effect of planting density on yield and morphology of savory (*Satureja khuzistanica* Jamzad). *Annals of Biological Research*, 3(8), 4017-4022.
- Hossain, M. A., AL-Raqmi, K. H. S., AL-Mijizy, Z. H., Weli, A. M., & Al-Riyami, Q. (2013). Study of total phenol, flavonoids contents and phytochemical screening of various leaves crude extracts of locally grown *Thymus vulgaris*. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 3(9), 705-710.

- Hussein, M. S., El-Sherbeny, S. E., Khalil, M. Y., Naguib, N. Y., & Aly, S. M. (2006). Growth characters and chemical constituents of *Dracocephalum moldavica* L. plants in relation to compost fertilizer and planting distance. *Scientia Horticulturae*, 108(3), 322-331.
- Kennedy, D. O., Little, V., & Scholey, A. B. (2004). Attenuation of laboratory-induced stress in humans after acute administration of *Melissa officinalis* (Lemon Balm). *Psychosomatic Medicine*, 66(4), 607- 13.
- Khanpour-Ardestani, N., Sharifi, M., & Behmanesh, M. (2014). Effect of methyl jasmonate on antioxidant enzyme activities, phenolic and flavonoid compounds in *Scrophularia striata* cell culture. *Journal of Plant Researches*, 27(5), 840-853. [In Farsi]
- Khazaie, H. R., Najafi, F., & Banayan, M. (2008). Effect of irrigation frequency and planting density on herbage, biomass and oil production of theme (*Thymus vulgaris*) and hyssop (*Hyssopus officinalis*). *Industrial Crop Production*, 27(3), 315-321.
- Kizil, S. (2010). Determination of essential oil variations of *Thymbra spicata* var. *spicata* L. naturally growing in the wild flora of east mediterranean and southeastern anatolia regions of Turkey. *Industrial Crops and Products*, 32(3), 593-600.
- Kizil, S., Toncer, O., Diraz, E., & Karaman, S. (2015). Variation of agronomical characteristics and essential oil components of zahter (*Thymbra spicata* L. var *spicata*) population in semi-arid climatic conditions. *Field Crops*, 20(2), 242-251.
- Koocheki, A., & Sarmadnia, G. H. (2012). *Physiology of crop plants*. Mashhad: Jahad-e-Daneshgahi of Mashhad. [In Farsi]
- Kumar, R., Shurabh, S., & Pathania, V. (2013). Effect of shading and plant density on growth, yield and oil composition of clary sage (*Salvia sclarea* L.) in north western Himalaya. *Journal of Essential oil Research*, 25(1), 23-32.
- Lichtenthaler, H. K. (1987). Chlorophylls and carotenoids: Pigments of photosynthetic bio membranes. *Methods in Enzymology*, 148, 350-382.
- Mafakheri, A., Ciosemardeh, A., & Jaleel, P. (2010). Effect of drought stress on yield, proline and chlorophyll contents in three chickpea cultivars. *Australian Journal of Crop Science*, 4(8), 580-585.
- Mozafarian, V. (1996). *Flora of Ilam (Introducing medicinal plants of Ilam)*. Tehran: Farhang moaser publication. [In Farsi]
- Naghdi Badi, H., Yazdani, D., & Nazari, F. (2002). Seasonal variation in oil yield and composition from *Thymus vulgaris* L. under different dense cultivation. *Journal of Medicinal Plants*, 1(5), 51-56. [In Farsi]
- Nasiri, A., Sam daliri, M., Shirani Rad, A., Shahsavari, N., Mosavi Mirkale, A., & Jabbari, H. (2017). Effect of plant density on yield and physiological characteristics of six canola cultivars. *Journal of Scientific Agriculture*, 1, 249-253.
- Nikneghad, V., & Emam, Y. (2011). *An Introduction to the physiology of crop yield*. Shiraz: Shiraz university press. [In Farsi]
- Nonami, H., Wu, Y., & Boyer, J. S. (1997). Decreased growth-induced water potential a primary cause of growth inhabitation at low water potentials. *Plant Physiology*, 114(2), 501-509.
- Nooshkam, A., Majnoun Hoseini, N., Hadian, J., Jahanpoor, M. R., Khazaei, K., Salehnia, A., & Hedayatpour, S. (2016a). The effect of irrigation intervals on quantitative and qualitative yields of two savory species (*Satureja khuzestanica* and *Satureja rechingeri*). *Journal of Plant Production*, 39(1), 11-20. [In Farsi]
- Nooshkam, A., Mumivand, H., Hadian, J., Alemardand, A., & Morshedloo, M. R. (2016b). Drug yield and essential oil and carvacrol contents of two species of *Satureja* (*S. khuzistanica*). *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants*, 6, 126-130. [In Farsi]
- Ordone, A. L. (2006). Antioxidant activities of *Sechium edule* (Jacq.) swartz extracts. *Journal Agricultural Food Chemistry*, 97(3), 452-458.

- Rahmati, M., Azizi, M., Hasanzadeh khayat, M., & Nemati, H. (2009). The effects of different level of nitrogen and plant density on the agro morphological characters, yield and essential oils content of improved chamomile (*Matricaria chamomilla*) cultivar "Bodegold". *Journal of Horticultural Sciences*, 23(1), 27-35. [In Farsi]
- Raie Dehghan, H., Razmjo, J., Sabzalian, M. R., & Arzani, A. (2015). The effect of shad on physiological characteristics and essential oil of mint. *Plant Process and Function*, 4(13), 57-69. [In Farsi]
- Ren, B., Liu, W., Zhang, J., Dong, S., Liu, P., & Zhao, B. (2017). Effects of plant density on the photosynthetic and chloroplast characteristics of maize under high-yielding conditions. *The Science of Nature*, 104(3-4), 1-12.
- Rostaei, M., & Fallah, S. (2016). Assessment of canopy characteristics and essential oil yield of fenugreek and black cumin in intercropping under application of organic and chemical fertilizer. *Journal of Sustainable Agriculture and Production Science*, 25(4), 1-23. [In Farsi]
- Saifuddin, M., Hossain, A. M. B., & Normaniza, S. (2010). Impact of shading on flower formation and longevity, leaf chlorophyll and growth of *Bougainville glabra*. *Asian Journal of Plant Science*, 9(1), 20-27.
- Salarpour Ghoraba, F., & Farahbakhsh, H. (2015). Effects of water deficit and salicylic acid on essential oil and antioxidant enzymes of fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.). *Journal of Crop Improvement*, 17(3), 713-727. [In Farsi]
- Seyedalipour, B., Rahimi-Feyli, P., Nikousefat, Z., & Zarghami, S. (2016). Study on Antioxidant activity, total flavonoid and total phenolic contents of extracts taken from aerial parts of *Ballota platyloma* using three different methods: percolation, ultrasonic and polyphenolic fraction. *Journal of Kashan University of Medical Science*, 20(2), 147-156. [In Farsi]
- Taheri, R., Lebaschy, M. H., Zakerin, A., Bakhtiari, M., Borjian, A., & Makkizadeh Tafti, M. (2013). Effect of plant densities on qualitative characteristics of four *Thymus* spices under dry farming condition of Damavand. *Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants*, 29(3), 709-719. [In Farsi]
- Toncer, O., & Kizil, S. (2005). Determination of yield and yield components in wild thyme (*Thymbra spicata* L. var. *spicata*) as influenced by development stages. *Journal of Horticulture Science*, 3(3), 100-103.
- Toncer, O., Karaman, S., Diraz, E., Sogut, T., & Kizil, S. (2016). Diurnal variation effects in essential oils of wild thyme (*Thymbra spicata* var. *spicata* L.) under cultivation condition. *Essential Oil Bearing Plants*, 19(8), 2037-2048.
- Ulewicz-Magulska, B., & Wesolowski, M. (2019). Total phenolic contents and antioxidant potential of herbs used for medical and culinary purposes. *Plant Foods for Human Nutrition*, 74(1), 61-67.
- Wanger, G. J. (1979). Content and vacuole/ extra vacuole distribution of neutral sugars, free amino acids, and anthocyanin in protoplast. *Plant Physiology*, 64(1), 88-93.
- Watkinson, J. I., Hendricks, L., Sioson, A. A., Vasquez- Robinet, C., Verlyn, S., Heath, L. S., ... & Grene, R. (2006). Accessions of *Solanum toberosum* spp. Andigena show differences in photosynthetic recovery after drought stress as reflected in gene expression profiles. *Plant Science*, 171(6), 745-758.
- Wolf, F. T. (1963). Effects of light and darkness on biosynthesis of carotenoid pigments in wheat seedlings. *Plant Physiology*, 38(6), 649-652.
- Zhang, F., & Li, L. (2003). Using competitive and facilitative interaction in intercropping systems enhances crops productivity and nutrient-use efficiency. *Plant and Soil Research*, 248(1), 305-312.
- Zokaei, A., Seifzadeh, S., & Taheri, M. (2014). Effect of planting densities and pattern on physiological and agronomical traits in basil (*Ocimum basilicum* L.). *Crop Production Research*, 6(2), 143-157. [In Farsi]