

بهبود محتوای اسانس و ترکیبات فعال در رزماری (*Rosmarinus officinalis* L.) از طریق محلول پاشی ال- فنیل آلانین و القای تنش خشکی

مرضیه سلطانی آلکویی^۱، علی عباسی سورکی^{۱*}، سینا فلاح^۱، مهدی قاسمی نافچی^۲

^۱ گروه علوم زراعت، دانشکده کشاورزی دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران

^۲ گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران

(تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۰۸/۲۲، تاریخ پذیرش نهایی: ۱۴۰۳/۱۱/۰۸)

چکیده

به منظور بررسی اثر ال- فنیل آلانین بر متابولیت‌های ثانویه گیاه رزماری در شرایط تنش خشکی، آزمایشی فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار در مزرعه تحقیقاتی دانشگاه شهرکرد در سال ۱۴۰۰ انجام گرفت. آبیاری کامل و ۵۰ درصد آبیاری کامل به عنوان فاکتور اول و غلظت‌های مختلف ال- فنیل آلانین (۸۰، ۱۶۰ و ۳۲۰ میلی گرم در لیتر) به عنوان فاکتور دوم در نظر گرفته شدند. تنش خشکی سبب کاهش کلروفیل *a* (۳۶ درصد)، کلروفیل *b* (۴۶ درصد)، وزن خشک اندام هوایی (۱۴/۴ درصد)، عملکرد اسانس در بوته (۱۲ درصد) و افزایش کاروتنوئیدها (۱۱۴ درصد)، فعالیت آنزیم PAL (۴۰/۶ درصد)، فنول کل (۵/۷ درصد)، فلاونوئید کل (۳۵/۶ درصد) و قدرت آنتی‌اکسیدانی عصاره (۵/۶ درصد) در مقایسه با آبیاری کامل شد. کاربرد غلظت‌های ۸۰ تا ۳۲۰ میلی گرم در لیتر ال- فنیل آلانین سبب افزایش کلروفیل *a* (۳۱ تا ۴۱/۴ درصد)، وزن خشک اندام هوایی (۱۷/۷ تا ۱۴/۷ درصد)، فعالیت آنزیم PAL (۲۷ تا ۳۸/۷ درصد)، فنول کل (۱۲/۴ تا ۱۳/۴ درصد)، فلاونوئید کل (۶۰ تا ۶۹ درصد)، قدرت آنتی‌اکسیدانی عصاره (۱۰/۷ تا ۱۱/۵ درصد)، محتوای اسانس (۵/۸ تا ۷/۶ درصد) و عملکرد اسانس (۲۲/۷ تا ۲۷ درصد) در مقایسه با شاهد شد. به دلیل عدم اختلاف معنی‌دار بین غلظت‌های مختلف ال- فنیل آلانین، ۸۰ میلی گرم در لیتر به عنوان غلظت بهینه قابل توجه است. ترکیبات اصلی اسانس آلفا-پینن (۱۱/۹ درصد)، ۸،۱-سینئول (۷/۶ درصد)، کامفور (۱۲/۸ درصد)، بورنتول (۱۰/۴ درصد) و بورنیل استات (۱۲/۸ درصد) بودند. تنش خشکی سبب کاهش میزان آلفا-پینن، ۸،۱-سینئول و کامفور و افزایش بورنتول و بورنیل استات شد. در محلول پاشی رزماری با ال- فنیل آلانین، بالاترین میزان آلفا-پینن، ۸،۱-سینئول و کامفور در غلظت ۸۰ میلی گرم در لیتر و بالاترین میزان بورنتول و بورنیل استات در غلظت ۳۲۰ میلی گرم در لیتر بدست آمد. بنابراین می‌توان با اعمال تنش خشکی کنترل شده و همچنین محلول پاشی ال- فنیل آلانین، سبب افزایش میزان متابولیت‌های ثانویه عصاره و ترکیبات اسانس شده و با بهبود قدرت آنتی‌اکسیدانی عصاره رزماری، از فرآورده‌های آن در صنایع مختلف استفاده کرد.

کلمات کلیدی: آنتی‌اکسیدان، رزماری، آبیاری، فنول، فنیل آلانین آمونیاک

مقدمه

(ROS) و دفاع آنتی‌اکسیدانی تعادل برقرار است. با این حال،

در بدن انسان در شرایط نرمال بین تولید رادیکال‌های آزاد منابع خارجی رادیکال‌های آزاد مانند دود سیگار و تنباکو،

فلاونوئیدها، کاروتنوئیدها و ترپنوئیدها است (Nieto *et al.*, 2018).

در گیاهان متابولیت‌های ثانویه در طول مسیرهای بیوسنتزی متابولیت‌های اولیه تولید می‌شوند. این ترکیبات را می‌توان به عنوان محصولات مسیرهای جانبی بیوشیمیایی در سلول‌های گیاهی در نظر گرفت. این متابولیت‌ها نقش مهمی در محافظت از گیاهان در برابر تنش‌های محیطی دارند و شامل آلکالوئیدها، فلاونوئیدها، گلیکوزیدها، تانن‌ها، ساپونین‌ها، فنول‌ها و ترپنوئیدها هستند (Chaturvedi and Gupta, 2021). ترکیبات فنولی از مسیر اسید شیکیمیک و مسیر مالونیک سنتز می‌شوند. در گیاهان مسیر اسید شیکیمیک از اهمیت بالایی برخوردار است و در طول این مسیر ترکیبات ثانویه فنولی و فلاونوئیدی از طریق حذف یک مولکول آمونیاک از فنیل آلانین و تبدیل آن به اسید سینامیک که توسط آنزیم فنیل آلانین آمونیلایز (PAL) کاتالیز می‌شود، سنتز می‌شوند (Sharma *et al.*, 2019). آنزیم PAL یکی از آنزیم‌های مهم در ساخت متابولیت‌های ثانویه در گیاه است. PAL را می‌توان به عنوان آنزیم کلیدی بین سنتز متابولیت‌های اولیه و ثانویه در نظر گرفت. PAL با تبدیل فنیل آلانین به اسید سینامیک، مسیر فنیل پروپانوید را راه‌اندازی می‌کند (Feduraev *et al.*, 2020). ظرفیت آنتی‌اکسیدانی فنول‌ها شامل ترکیبی از مکانیسم‌های مختلف از جمله مهار رادیکال‌های آزاد، اهدای اتم‌های هیدروژن، خنثی کردن اکسیژن منفرد، کلات یون‌های فلزی و فعالیت‌هایی به عنوان بستر اکسیداسیون است (Chrysargyris *et al.*, 2020).

ترپنوئیدها نیز گروه بزرگی از ترکیبات فرار طبیعی با عملکردهای مهم بیولوژیکی هستند که در اسانس گیاه وجود دارند. دو مسیر بیوشیمیایی جهت سنتز آن‌ها وجود دارد. مسیر اول متیل اریتریتول فسفات (MEP) نام دارد و ترکیبات مونوترپنی، دی‌ترپنی و تتراترپنی (مانند کاروتنوئیدها) را تولید می‌کند. مسیر دوم موالونیک اسید (MVA) نام دارد که در نهایت سزکوئی‌ترین‌ها و تری‌ترین‌ها را تولید می‌کند (Sathee *et al.*, 2023). ترکیبات مونوترپنی (مانند آلفا-پینن، کامفن و کامفور) از اجزای اصلی اسانس هستند و در صنایع دارویی

سوخت‌های فسیلی و آلاینده‌هایی مانند NO و NO₂، عامل افزایش سطح ROS و برهم خوردن تعادل ردوکس در بدن هستند (Valko *et al.*, 2007). این وضعیت می‌تواند به ساختار سلولی آسیب رسانده و هموستاز سلولی را مختل کند (Chaudhary *et al.*, 2023). از این‌رو مصرف آنتی‌اکسیدان‌های خارجی چه به شکل مصنوعی یا طبیعی، راهکار مؤثری برای مبارزه با رادیکال‌های آزاد هستند. آنتی‌اکسیدان‌های مصنوعی به دلیل پایداری و عملکرد بالاتر، هزینه‌های پایین و در دسترس بودن، در محصولات غذایی کاربرد گسترده‌تری دارند (Xiu-Qin *et al.*, 2009). اما مصرف طولانی مدت آن‌ها می‌تواند موجب آسیب به سلامت انسان مانند ایجاد آلرژی‌های پوستی، مشکلات دستگاه گوارش و سرطان شود (Bleve *et al.*, 2008). علاوه بر این، دوزهای بالای این آنتی‌اکسیدان‌ها ممکن است به DNA آسیب برسانند و فرآیند پیری زودرس را القا کنند (Kornienko *et al.*, 2019). بنابراین گرایش به جایگزینی این ترکیبات با آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی به طور قابل توجهی افزایش یافته است.

گیاهان دارویی به دلیل وجود مواد شیمیایی فعال، ترکیبات آنتی‌اکسیدانی و ضد میکروبی در صنایع غذایی، داروسازی و آرایشی-بهداشتی کاربرد دارند (Jamshidi-Kia *et al.*, 2017). گیاهان دارویی پرمصرف با فعالیت آنتی‌اکسیدانی متعلق به گیاهانی از چندین تیره، به ویژه نعناعیان (Lamiaceae) هستند (Aebisher *et al.*, 2021). رزماری (*Rosmarinus officinalis* L.) گیاه دارویی چند ساله و همیشه سبز از تیره نعناعیان و بومی منطقه مدیترانه است (Novak and Bluthner, 2020). ترکیبات عصاره و اسانس رزماری به دلیل خاصیت آنتی‌اکسیدانی به منظور جلوگیری از اکسیداسیون در افزایش ماندگاری محصولات غذایی استفاده می‌شوند (Khan *et al.*, 2023). آنتی‌اکسیدان‌ها ترکیباتی هستند که با رادیکال‌های آزاد واکنش داده و واکنش زنجیره‌ای را با حذف واسطه‌های رادیکال آزاد خاتمه داده و واکنش‌های اکسیداسیون را مهار می‌کنند (Mamta *et al.*, 2014). خاصیت آنتی‌اکسیدانی عمدتاً به دلیل وجود متابولیت‌های ثانویه گیاهی مانند فنول‌ها،

تحریک بیان ژن و فعالیت آنزیم‌های کلیدی درگیر در بیوسنتز فلاونوئیدها، مانند فنیل آلانین آمونیلایز (PAL)، سینامات-۴-هیدروکسیلاز (C4H) و چالکون سنتاز (CHS) در گیاه بایکال (*Scutellaria baicalensis*) شد و تجمع متابولیت‌ها را افزایش داد (Cheng et al., 2018). بنابراین، خشکی کنترل‌شده علاوه بر صرفه‌جویی مصرف آب در طول دوره کشت، می‌تواند برای بهبود تولید متابولیت‌های ثانویه اعمال شود.

محلول‌پاشی با مواد مختلف (مانند اسیدهای آمینه) نیز در طول دوره رشد گیاه سبب شده تا گیاه از طریق حسگرها و گیرنده‌های خود این سیگنال‌ها را دریافت و پاسخ خود که تولید متابولیت‌های ثانویه است را فعال کند (Thakur et al., 2018). اسیدهای آمینه مولکول‌های آلی هستند که علاوه بر داشتن نیتروژن، کربن، هیدروژن و اکسیژن در ساختار خود، دارای زنجیره جانبی آلی بوده که به عنوان یک شاخص، بین اسیدهای آمینه مختلف تمایز ایجاد می‌کند (Buchanan et al., 2000). این مولکول‌ها می‌توانند به طور مستقیم یا غیرمستقیم بر فعالیت فیزیولوژیکی مرتبط با رشدونمو گیاهان تأثیر بگذارند (Wu, 2009). اسیدآمینه فنیل آلانین نه تنها از اجزای ضروری برای سنتز پروتئین بوده بلکه به عنوان پیش‌ماده بیوسنتزی، تولید طیف گسترده‌ای از متابولیت‌های ثانویه در گیاهان را تقویت می‌کند (Tzin and Galili, 2010). فنیل آلانین در تولید ترکیبات معطر، آنتی‌اکسیدان‌ها، ترکیبات فنولی و ترکیبات اصلی دیواره سلولی گیاه نقش دارد. اثر فنیل آلانین بر رشدونمو گیاهان از طریق تأثیر بر هورمون جیبرلین صورت می‌گیرد (Edahiro et al., 2005). اثر محلول‌پاشی ۰/۰۵ میلی‌مولار فنیل آلانین بر ریحان شیرین (*Ocimum basilicum* L.) موجب شد فعالیت آنزیم PAL، ۲۵۰ درصد و محتوای فنول و فلاونوئید کل به ترتیب ۳۹ و ۴۰ درصد افزایش یابند (Koca and Karaman, 2015). محلول‌پاشی گیاه مریم‌گلی (*Salvia officinalis* L.) با ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر فنیل آلانین میزان کامفور و ۸،۱-سینئول موجود در اسانس را به ترتیب ۴/۵ درصد و ۷ درصد در مقایسه با شاهد افزایش داد (Rahmani-Samani et al., 2019).

کاربرد دارند. آلفا-پینن دارای خواص ضدالتهابی، کاهش قند خون و کاهش چربی خون است. خواص ضدالتهابی آن احتمالاً برای درمان دیابت و عوارض آن کاربرد دارد (Soares Santos et al., 2023). همچنین جهت درمان عفونت‌های دستگاه تنفس و در صنایع غذایی به عنوان طعم‌دهنده مورد استفاده قرار می‌گیرد (Allenspach and Steuer, 2021). خواص بیولوژیکی کامفن از جمله فعالیت‌های ضدباکتریایی، ضدقارچی، ضدسرطانی، آنتی‌اکسیدانی، ضدانگلی، ضددیابتی، ضدالتهابی و کاهش چربی خون به اثبات رسیده است. علاوه بر این، کامفن فعالیت‌های محافظت از کبد، ضدویروسی و ضداستیل کولین استراز را نشان می‌دهد (Hachlafi et al., 2023). ۸،۱-سینئول دارای خواص دارویی از جمله ضدالتهابی و آنتی‌اکسیدانی بوده و برای درمان بیماری‌های تنفسی و قلبی-عروقی استفاده می‌شود (Cai et al., 2020). اثرات ضدالتهابی، آنتی‌اکسیدانی، ضد درد، محافظت‌کننده عصبی و ضدصرع بورنتول از طریق تعدادی از مطالعات پیش‌بالینی مشخص شده است (Rajput et al., 2023). بورنیل استات نیز دارای خواص سفیدکنندگی و آنتی‌اکسیدانی بوده و در مواد مراقبت از پوست قابل استفاده است (Kim et al., 2013). با توجه به اهمیت متابولیت‌های ثانویه و نقش آن‌ها در سلامتی انسان، کاربرد فنونی جهت افزایش این ترکیبات در گیاهان و در نهایت استخراج و استفاده از آن‌ها ضروری به نظر می‌رسد.

خشکی یکی از مهم‌ترین تنش‌های محیطی است که علاوه بر تغییر در رشدونمو مورفولوژیکی و ویژگی‌های فیزیولوژیکی گیاه، سبب تغییر در خواص بیوشیمیایی آن نیز می‌گردد (Oguz et al., 2022). مطالعات متعددی نشان داده است تنش آبی سبب تغییر مقدار متابولیت‌های ثانویه در طیف گسترده‌ای از گیاهان می‌شود (Yang et al., 2018). کم آبیاری کنترل شده ممکن است منجر به تغییر در میزان قندها، اسیدهای آلی و ترکیبات آنتی‌اکسیدانی شود (Bogale et al., 2016). به عنوان مثال ایجاد تنش خشکی برای مریم‌گلی (*Salvia dolomitica*) سبب افزایش میزان سزکوئی‌ترین‌های موجود در اسانس شد (Caser et al., 2019). سطح مناسبی از تنش خشکی سبب

$$FC\ 50\% = FC\ 100\% \times 1/2 \quad (1)$$

طبق نتایج آزمایش خاک (جدول ۱) و نیاز کودی رزماری (Mwithiga et al., 2022)، به منظور جبران کمبود عناصر موجود در خاک و اصلاح آن به سطح مطلوب، همچنین تأمین نیازهای تغذیه‌ای رزماری جهت رشد بهینه، ۰/۰۱ و ۰/۰۲۶ گرم به ترتیب اوره (جهت تأمین نیتروژن) و مونوفسفات پتاسیم (جهت تأمین فسفر و پتاسیم) به ازای هر کیلوگرم خاک اضافه گردید. گلدان‌ها در فضای باز قرار گرفتند و در هر گلدان یک نشاء با ارتفاع ۱۲-۱۵ سانتی‌متر در تاریخ ۲۰ اردیبهشت ۱۴۰۰ کاشته شد.

پس از کامل‌شدن پوشش برگی (Fageria et al., 2009)، تیمار آبیاری (آبیاری کامل و ۵۰٪ آبیاری کامل) و محلول‌پاشی با ال-فنیل آلانین (محصول مرک آلمان) در غلظت‌های ۸۰ و ۱۶۰ میلی‌گرم در لیتر همراه با شاهد (محلول‌پاشی با آب مقطر) اعمال شدند (El-Din and El-Reham et al., 2016; Wahed, 2005). حجم آبیاری برای بوته‌های تحت تنش ۷۴۰ میلی‌لیتر و برای بوته‌هایی با آبیاری کامل ۱۴۸۰ میلی‌لیتر برای هر گلدان بود. محلول‌پاشی در سه مرحله و دو هفته یکبار هنگام غروب انجام شد (Cheng et al., 2020) و در هر مرحله برای هر بوته به میزان ۳ میلی‌لیتر بود. پس از پایان محلول‌پاشی، گیاه در تاریخ ۲ آبان ۱۴۰۰ برداشت شد و صفات زیر مورد ارزیابی قرار گرفتند.

وزن خشک اندام هوایی: اندام هوایی گیاه پس از برداشت به مدت پنج روز در دمای اتاق خشک شده و نمونه‌ها با ترازوی دیجیتال با دقت ۱ میلی‌گرم وزن شدند.

رنگدانه‌های فتوسنتزی: ۰/۲۵ گرم از هر گیاه در مرحله پوشش کامل برگی در ۱۰ میلی‌لیتر استون ۸۰ درصد هموژن شده و پس از انجام سانتریفیوژ با سرعت ۳۵۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه، مایع رویی جدا و حجم آن با استون ۸۰ درصد به ۱۰ میلی‌لیتر رسانده شد. سپس به وسیله دستگاه اسپکتروفتومتر میزان جذب نور در طول موج‌های ۴۷۰، ۶۴۶/۸ و ۶۶۳/۲ نانومتر مشخص و با استفاده از روابط زیر رنگدانه‌های فتوسنتزی محاسبه شدند (Lichtenthaler, 1987).

برخی گزارش‌های مربوط به اثرات نامطلوب احتمالی مرتبط با مصرف آنتی‌اکسیدان‌های مصنوعی موجب توجه به استفاده از آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی در محصولات غذایی شده است (Lourenco et al., 2019) که می‌توانند انسان را در برابر رادیکال‌های آزاد محافظت کنند (Akbari et al., 2022). در این ارتباط، کاربرد تکنیک‌های زراعی برای افزایش متابولیت‌های ثانویه گیاهان دارویی ضروری به نظر می‌رسد. از این‌رو، این تحقیق با هدف بررسی اثرات القای شرایط تنش خشکی و محلول‌پاشی ال-فنیل آلانین بر تقویت سنتز ترکیبات آنتی‌اکسیدانی گیاه رزماری انجام شد.

مواد و روش‌ها

به منظور بررسی اثر ال-فنیل آلانین بر صفات مورفو فیزیولوژیک، ترکیبات فیتوشیمیایی و فعالیت آنتی‌اکسیدانی گیاه رزماری تحت تنش خشکی، آزمایشی به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار به صورت گلدانی در مزرعه تحقیقاتی دانشگاه شهرکرد با عرض جغرافیایی ۳۲° و ۲۱° شمالی و طول جغرافیایی ۵۰° و ۴۹° شرقی و ارتفاع ۲۰۵۰ متر از سطح دریا در سال ۱۴۰۰ انجام گرفت.

قلعه‌های ریشه‌دار شده رزماری ۱۵ اردیبهشت از شرکت آيسان کشت شیراز تهیه و براساس یکنواختی ظاهری برای کشت انتخاب شدند. خاک مورد نیاز از عمق صفر تا ۳۰ سانتی‌متر مزرعه جمع‌آوری و ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی آن تعیین شد (جدول ۱).

گلدان‌هایی با قطر ۱۹/۵ و ارتفاع ۱۸ سانتی‌متر انتخاب و به هر گلدان ۶ کیلوگرم خاک اضافه شد. برای تعیین ظرفیت زراعی (FC)، تعداد سه گلدان دارای خاک خشک توزین و سپس در ظرف آب غوطه‌ور شدند. پس از ۲۴ ساعت با خروج آب از زهکش، مجدداً توزین شدند. میانگین اختلاف وزن خاک خشک و خاک زهکشی شده، ظرفیت زراعی ۱۰۰ درصد بود (Khalil et al., 2022). ۵۰ درصد ظرفیت زراعی با استفاده از رابطه ۱ محاسبه که در تعیین حجم آبیاری از آن استفاده شد (Wang and Gong, 2021).

جدول ۱- ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی خاک مورد استفاده از عمق صفر تا ۳۰ سانتی‌متری مزرعه

شاخص	واحد	مقدار	شاخص	واحد	مقدار
بور قابل دسترس	(میلی‌گرم در کیلوگرم)	۱/۲۲	نیتروژن کل	(%)	۰/۰۱
آهن قابل دسترس	(میلی‌گرم در کیلوگرم)	۲/۱۹	کربن آلی	(%)	۰/۱۸
منگنز قابل دسترس	(میلی‌گرم در کیلوگرم)	۷/۴۰	آهک خاک	(%)	۲۳
روی قابل دسترس	(میلی‌گرم در کیلوگرم)	۰/۵۰	پی‌اچ		۸/۲۱
فسفر قابل دسترس	(میلی‌گرم در کیلوگرم)	۷/۶۰	هدایت الکتریکی	(دسی‌زیمنس بر متر)	۰/۵۸
پتاسیم قابل دسترس	(میلی‌گرم در کیلوگرم)	۲۹۳	بافت خاک		لومی رسی

دقیقه در تاریکی، نمونه‌ها در طول موج ۵۱۷ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر خوانده شدند. جهت تهیه کنترل، از ۵۰۰ میکرولیتر آب مقطر و ۵۰۰ میکرولیتر محلول DPPH استفاده شد. برای نمونه بلانک از ۵۰۰ میکرولیتر متانول مطلق و ۵۰۰ میکرولیتر محلول DPPH استفاده شد. درصد مهار رادیکال DPPH از رابطه شماره ۵ محاسبه شد (Yamasaky *et al.*, 1994).

$$DPPH = (A_c - A_s) / A_c \times 100 \quad (5)$$

A_c : عدد جذب کنترل، A_s : عدد جذب نمونه

غلظت‌های ۲۰ تا ۱۰۰ میکرومولار ترولوکس تهیه شد و با رسم نمودار استاندارد، معادله خط $y=0.84x + 2.6$ بدست آمد. درصد مهار جایگزین y شد و میزان x معادل میکرومولار ترولوکس بدست آمد که بیانگر توانایی عصاره در مهار رادیکال DPPH بر حسب میکرومولار ترولوکس بود.

محتوی فنول کل عصاره: ۱۰ میکرولیتر عصاره با ۲/۵

میلی‌لیتر فولین سیوکالتیو ۱۰ درصد مخلوط و پس از ۳ الی ۸ دقیقه به آن ۲/۵ میلی‌لیتر کربنات سدیم ۷/۵ درصد اضافه شد. ترکیب حاصله ۳۰ دقیقه در تاریکی نگهداری و سپس جذب در طول موج ۷۵۰ نانومتر خوانده شد. برای رسم منحنی کالیبراسیون از غلظت‌های متفاوت اسید گالیک (۲۰ تا ۱۶۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) استفاده شد و معادله خط $y=0.0025x + 0.1709$ بدست آمد (شکل ۳-۲). عدد خوانده‌شده در y جایگذاری و x که معادل غلظت اسید گالیک (C) بود بدست آمد. محتوی فنول کل بر حسب mg GAE/g از رابطه ۶ محاسبه شد (Marinova *et al.*, 2005).

$$Chl a = 12.21 (A663.2) - 2.81 (A646.8) \quad (2)$$

$$Chl b = 20.13 (A646.8) - 5.03 (A663.2) \quad (3)$$

$$C x + c = [(1000 (A470) - 3.27 (Chl a) - 104 (Chl b)] / 229 \quad (4)$$

A : طول موج جذب اسپکتروفتومتر، $Chl a$: کلروفیل a

$Chl b$: کلروفیل b ، $C.x+c$: کاروتنوئیدها

درصد و عملکرد اسانس: اندام هوایی گیاه با آسیاب خرد و ۲۲ گرم از آن در بالن ریخته شد. ۲۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر به آن اضافه و به مدت سه ساعت با دستگاه کلونجر به روش تقطیر با آب اقدام به استخراج اسانس گردید. اسانس با سولفات سدیم بدون آب آگیری شد و جهت نگهداری در تاریکی و دمای ۴ درجه سلسیوس قرار داده شد. با اندازه‌گیری میزان اسانس در ۱۰۰ گرم ماده خشک، درصد اسانس محاسبه شد. سپس عملکرد اسانس از حاصل ضرب درصد اسانس در بیوماس گیاه در گلدان بدست آمد (Khalil *et al.*, 2022).

تهیه عصاره متانولی: ۱۰ گرم پودر گیاه با ۱۰۰ میلی‌لیتر متانول ۷۰ درصد به مدت ۴۸ ساعت در تاریکی خیسانده شد. تفاله هر نمونه با صاف کردن جدا و حلال حاوی عصاره در دمای اتاق قرار داده شد تا حلال تبخیر شود. عصاره خشک خراشیده و در ظروف دربسته در دمای ۴ درجه سلسیوس جهت اندازه‌گیری پارامترها نگهداری شد (Gasmi *et al.*, 2019).

آزمون DPPH جهت بررسی قدرت آنتی‌اکسیدانی عصاره: ۵۰۰ میکرولیتر عصاره متانولی با ۵۰۰ میکرولیتر محلول DPPH (۰/۱ میلی‌مولار) مخلوط شده و بعد از ۳۰

Saunders and McClure,) بدست آمد $y=8.9372x + 0.0357$ (1974).

ترکیبات اسانس: اسانس‌ها با استفاده از کروماتوگرافی گازی Agilent مدل A7890 مجهز به ستون سیلیس ذوب شده DB-5 ($0.25\text{mm i.d} \times 30\text{m}$ و ضخامت فیلم 0.25 میکرومتر) آنالیز شدند. ابتدا 0.1 میکرولیتر نمونه به ورودی دستگاه تزریق شد. دمای ورودی دستگاه به مدت سه دقیقه روی 50 درجه سلسیوس تنظیم شد و سپس با سرعت 8 درجه سلسیوس بر دقیقه به 200 درجه سلسیوس رسید و سپس با سرعت 40 درجه سلسیوس بر دقیقه به 290 درجه سلسیوس افزایش یافت و به مدت سه دقیقه در این دما نگهداری شد. گاز حامل هلیوم با سرعت $1/2$ میلی‌لیتر در دقیقه استفاده شد. ترکیبات اسانس با استفاده از کروماتوگرافی گازی - طیف‌سنجی جرمی (GC-MS) تعیین شدند. تجزیه و تحلیل GC-MS روی یک سیستم GC-MS 7890 A/5975C مجهز به یک ستون سیلیس ذوب شده DB-5 ($0.25\text{mm i.d} \times 30\text{m}$ و ضخامت فیلم 0.25 میکرومتر) انجام شد. 0.1 میکرولیتر نمونه به ورودی دستگاه تزریق شد. ابتدا دمای ورودی دستگاه به مدت سه دقیقه روی 50 درجه سلسیوس تنظیم شد و سپس با سرعت 8 درجه سلسیوس بر دقیقه به 200 درجه سلسیوس رسید و سپس با سرعت 40 درجه سلسیوس بر دقیقه به 290 درجه سلسیوس افزایش یافت. دمای ورودی دستگاه طیف‌سنج جرمی 280 درجه سلسیوس بوده و برای یونیزاسیون از منبع الکتريکی با توان 70 الکترون ولت استفاده شد. ولتاژ آشکارساز دستگاه $1/665$ کیلو ولت بود و دستگاه توانایی تشخیص اجسام 30 تا 450 واحد جرم اتمی را داشت. سرعت اسکن دستگاه $2/86$ اسکن در ثانیه بود. ترکیبات از طریق مقایسه طیف‌های جرمی و شاخص‌های بازداري آنها با استانداردهای مرجع و داده‌های منتشر شده شناسایی شدند. درصد ترکیب به طور مستقیم از مساحت پیک‌های کروماتوگرام و بدون اعمال ضریب‌های تصحیح محاسبه شد.

جهت آنالیز داده‌ها از تجزیه و تحلیل واریانس دو طرفه بر اساس GLM در برنامه آماری SAS (v.9.2) استفاده شد. برای

$$T = C \times V/M \quad (6)$$

C: غلظت اسید گالیک بر حسب $\mu\text{g/ml}$ (C معادل x در معادله خط).

V: حجم عصاره (ml)، M: وزن عصاره (g)، T: فنول کل (mg GAE/g)

محتوی فلاونوئید کل عصاره: ۱ میلی‌لیتر عصاره با ۴ میلی‌لیتر آب مقطر مخلوط شد. ۳۰۰ میکرولیتر نیتريت سدیم ۵ درصد به آن اضافه گردید. بعد از پنج دقیقه ۳۰۰ میکرولیتر کلرید آلومینیوم ۱۰ درصد به مخلوط افزوده شد. شش دقیقه بعد ۲ میلی‌لیتر هیدروکسید سدیم ۱ مولار اضافه و با آب مقطر به حجم ۱۰ میلی‌لیتر رسانده شد. سپس در طول موج 510 نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر خوانده شد. جهت رسم منحنی استاندارد از غلظت‌های مختلف کوئرستین (0.1 تا 0.1 میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) استفاده شد و معادله خط $y=1.4372x + 0.0107$ بدست آمد. عدد خوانده شده در y جایگذاری شد و x که معادل غلظت فلاونوئید معادل کوئرستین بود بدست آمد. محتوی فلاونوئید کل با استفاده از رابطه ۷ محاسبه شد (Marinova et al., 2005).

$$C = X \times V/N \quad (7)$$

X: غلظت استاندارد به دست آمده از معادله خط، V: حجم عصاره (ml)، C: فلاونوئید کل (mg QE/g).

فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیا لیاز (PAL): 0.1 گرم از بافت تازه گیاه با استفاده از ۱ میلی‌لیتر بافر فسفات 50 میلی‌مولار با $\text{pH}=7$ کوبیده و به مدت ۱۵ دقیقه در 5000 دور در دقیقه سانتریفیوژ گردید. پس از اتمام سانتریفیوژ، از عصاره رویی جهت سنجش آنزیم استفاده شد. مخلوط واکنش حاوی 250 میکرولیتر عصاره آنزیمی، 250 میکرولیتر بافر بورات سدیم 10 میلی‌مولار ($\text{pH}=8.8$)، 250 میکرولیتر آب مقطر و 250 میکرولیتر سوبسترای فنیل آلانین (50 میلی‌مولار) بود. تولید سینامات با جذب در 270 نانومتر اندازه‌گیری شد، فعالیت PAL را تعیین کرد. جهت رسم نمودار استاندارد از غلظت‌های 0.1 تا $1/5$ میکروگرم بر میلی‌لیتر اسید سینامیک استفاده شد. جذب در 270 نانومتر انجام گرفت و معادله خط

مقایسه میانگین تیمارها از آزمون LSD در سطح احتمال ۵٪ استفاده شد.

نتایج و بحث

رنگدانه‌های فتوستنتزی: کلروفیل‌های *a* و *b* و کاروتنوئیدها در برگ رزماری تحت تأثیر خشکی در سطح احتمال ۱ درصد و کلروفیل *a* و کاروتنوئیدها تحت تأثیر محلول‌پاشی در سطح احتمال ۵ درصد معنی‌دار شدند، اما اثر متقابل خشکی × محلول‌پاشی معنی‌دار نشد (جدول ۲). خشکی سبب شد کلروفیل‌های *a* و *b* به ترتیب ۵/۱۸ میکروگرم بر میلی‌لیتر (۳۶/۱ درصد) و ۴/۴۸ میکروگرم بر میلی‌لیتر (۴۶/۲ درصد) نسبت به شرایط آبیاری کامل کاهش یابند (شکل ۱a و 1e). اما کاروتنوئیدها ۲/۷ میکروگرم بر میلی‌لیتر (۱۱۵/۴ درصد) تحت تنش خشکی افزایش یافتند (شکل 1c). به نظر می‌رسد تحت شرایط تنش القاشده میزان ROS و آنزیم کلروفیل‌لاز افزایش یافته و سبب آسیب به کلروفیل‌ها شده (Sobhkhizi et al., 2014) و برای مقابله با ROSها در جهت جذب انرژی اضافی و تنظیم اسمزی برای پایداری غشاء سلولی میزان ترکیبات آنتی‌اکسیدانی مانند کاروتنوئیدها افزایش یافتند (Correia et al., 2014; Molla et al., 2023). محلول‌پاشی با ال-فنیل آلانین در غلظت‌های ۸۰ تا ۳۲۰ میلی‌گرم در لیتر سبب شد کلروفیل *a* ۲/۹ تا ۳/۹ میکروگرم بر میلی‌لیتر (۳۱ تا ۴۱/۴ درصد) بیشتر از شاهد افزایش یابد (شکل 1b). اما کاروتنوئیدها تحت تأثیر محلول‌پاشی کاهش یافتند. این کاهش برای غلظت‌های ۸۰ و ۳۲۰ میلی‌گرم در لیتر بین ۰/۸ تا ۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر (۲۰/۳ تا ۲۳/۶ درصد) و در مقایسه با شاهد معنی‌دار بود (شکل 1d). کاهش کاروتنوئیدها در تیمار گیاه با ال-فنیل آلانین می‌تواند به دلیل اختصاص بیشتر کربن به تولید سایر ترکیبات آنتی‌اکسیدانی مانند فنول کل (شکل 2d) و فلاونوئیدها (شکل 2f) و بهبود کلروفیل (شکل 1b) باشد. گیاهان تحت تنش، عمل تعرق را با بستن روزنه‌ها جهت حفظ آب برگ کاهش می‌دهند. این عمل می‌تواند به حمل و نقل غیرفعال در آوندهای ساقه آسیب برساند. علاوه بر این

کمبود آب منجر به اختلال در واکنش‌های نوری فتوستنتز و تولید ROS می‌شود (Abrishamchi et al., 2012) بدین صورت که با کاهش تثبیت CO₂ به دلیل بسته شدن روزنه‌ها، سطح انرژی نوری افزایش می‌یابد و با کاهش میزان NADP⁺ (به عنوان پذیرنده الکترون)، انتقال الکترون‌ها از PSI به اکسیژن مولکولی (O₂^{•-}) تسریع شده و H₂O₂ تولید می‌شود. لذا سطح ROS افزایش یافته و سبب تخریب ساختمان کلروفیل‌ها می‌شود (Mittler et al., 2022). کاروتنوئیدها نقش مهمی در مقاومت به خشکی در گیاهان دارند و به عنوان یک آنتی‌اکسیدان، در محافظت از فرآیندهای فتوشیمیایی تحت شرایط تنش عمل می‌کنند (Maslova et al., 2021). نقش محافظتی اصلی بتاکاروتن در بافت فتوستنتزی ممکن است از طریق خاموش کردن مستقیم کلروفیل سه گانه باشد که از تولید اکسیژن منفرد جلوگیری و از آسیب اکسیداتیو محافظت می‌کند (Farooq et al., 2009). کاروتنوئیدها انرژی نور را دریافت و از طریق انتقال تحریک تک-تک به کلروفیل‌ها منتقل می‌کنند. این انتقال یک وضعیت انرژی پایین‌تری است که در طول فتوستنتز استفاده می‌شود. آن‌ها در وضعیت انرژی بالاتر، انرژی بیش از حد از کلروفیل‌ها را از طریق انتقال سه تایی-سه تایی جذب و به صورت ارتعاش پلی‌ین آزاد می‌کنند (Maoka, 2020). کاروتنوئیدها به عنوان محافظ نور، آنتی‌اکسیدان، جذب‌کننده رنگ (Lohr, 2009) و پیش‌ساز هورمون‌های گیاهی عمل می‌کنند (Nisar et al., 2014). تأثیر ال-فنیل آلانین بر کلروفیل *a* را می‌توان با نقش آن در افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه که شامل فنول‌ها، فلاونوئیدها، تانن‌ها و آنتوسیانین‌ها هستند، توضیح داد که همه آن‌ها و ترکیبات مختلف آن‌ها دارای اثر آنتی‌اکسیدانی بوده و از سیستم رنگدانه گیاه به ویژه رنگدانه‌های کلروفیل در برابر اکسیداسیون یا تجزیه محافظت می‌کنند (Naikoo et al., 2019). علاوه بر این، فنیل آلانین با فراهمی نیتروژن و کربن برای گیاه در بهبود فتوستنتز و تولید کلروفیل نقش دارد (Wen et al., 2022). در نعناع فلفلی (*Mentha piperita* L.)، تنش خشکی متوسط (تخلیه ۳۰ درصد آب موجود در خاک) غلظت کلروفیل کل را

جدول ۲- تجزیه واریانس (میانگین مربعات) محلول‌پاشی ال-فنیل آلانین بر برخی رنگدانه‌های برگ رزماری تحت القای تنش خشکی

منابع تغییر	درجه آزادی	میانگین مربعات	
		کلروفیل <i>a</i>	کلروفیل <i>b</i>
خشکی	۱	۱۶۱/۱**	۱۲۰**
ال-فنیل آلانین	۳	۱۷/۴*	۲/۹ ^{ns}
ال-فنیل آلانین × خشکی	۳	۰/۰۵ ^{ns}	۰/۳۹ ^{ns}
خطا	۱۶	۳/۳	۱
ضریب تغییرات (%)		۱۵/۵	۱۳/۷

* و ** به ترتیب معنی‌داری در سطح احتمال ۵ و ۱ درصد، ^{ns} عدم معنی‌داری.

جدول ۳- تجزیه واریانس (میانگین مربعات) محلول‌پاشی ال-فنیل آلانین بر وزن خشک اندام هوایی، فعالیت آنزیم PAL، محتوی فنول و فلاونوئید کل در رزماری تحت القای تنش خشکی

منابع تغییر	درجه آزادی	میانگین مربعات		
		وزن خشک اندام هوایی	فعالیت آنزیم PAL	فنول کل
خشکی	۱	۱۷۹/۶**	۱۰/۳**	۵۷**
ال-فنیل آلانین	۳	۳۹/۹**	۱/۷**	۶۳/۴**
ال-فنیل آلانین × خشکی	۳	۰/۱ ^{ns}	۰/۰۱ ^{ns}	۰/۲۵ ^{ns}
خطا	۱۶	۲/۶	۰/۰۴	۴/۵
ضریب تغییرات (%)		۴/۶	۵/۳	۳/۹

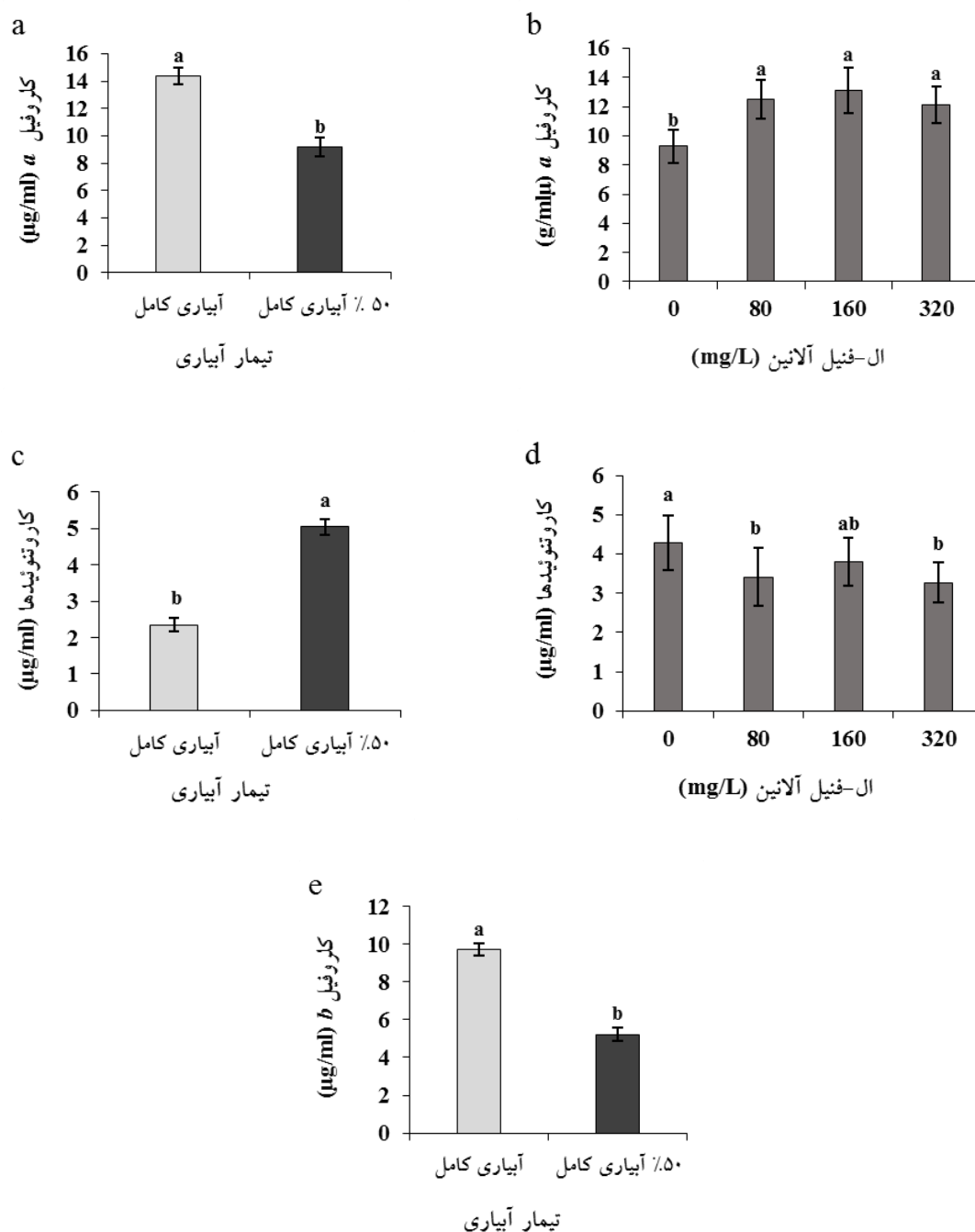
** معنی‌داری در سطح احتمال ۱ درصد، ^{ns} عدم معنی‌داری

۹/۹ درصد و تنش خشکی شدید (تخلیه ۴۵ درصد آب موجود در خاک) ۳۱/۴ درصد کاهش داد (Jahani et al., 2021). در

ریحان بنفش (*Ocimum basilicum* L.)، تحت تنش خشکی ۳۰ و ۶۰ درصد آبیاری کامل، کلروفیل *a* به ترتیب ۱۶ و ۲۳ درصد و کلروفیل *b* به ترتیب ۳/۵ و ۱۵/۵ درصد نسبت به آبیاری کامل کاهش پیدا کردند (Kordi et al., 2013). کلروفیل *b* در آویشن (*Thymus vulgaris* L.) تحت تنش خشکی در مرحله گلدهی ۱۰۴ درصد نسبت به شاهد کاهش یافت (Mohammadi et al., 2019). در ارقام ریحان محتوی کلروفیل *b* تحت آبیاری کامل از ۱/۱۸ میلی‌گرم بر گرم در Cinnamon تا ۱/۲۷ میلی‌گرم بر گرم در Palla Compato بود. تحت تنش خشکی کلروفیل *b* کاهش یافت و این کاهش برای

۴۵ Cinnamon درصد و برای Palla Compato ۳۸ درصد بود (Burbulis et al., 2023).

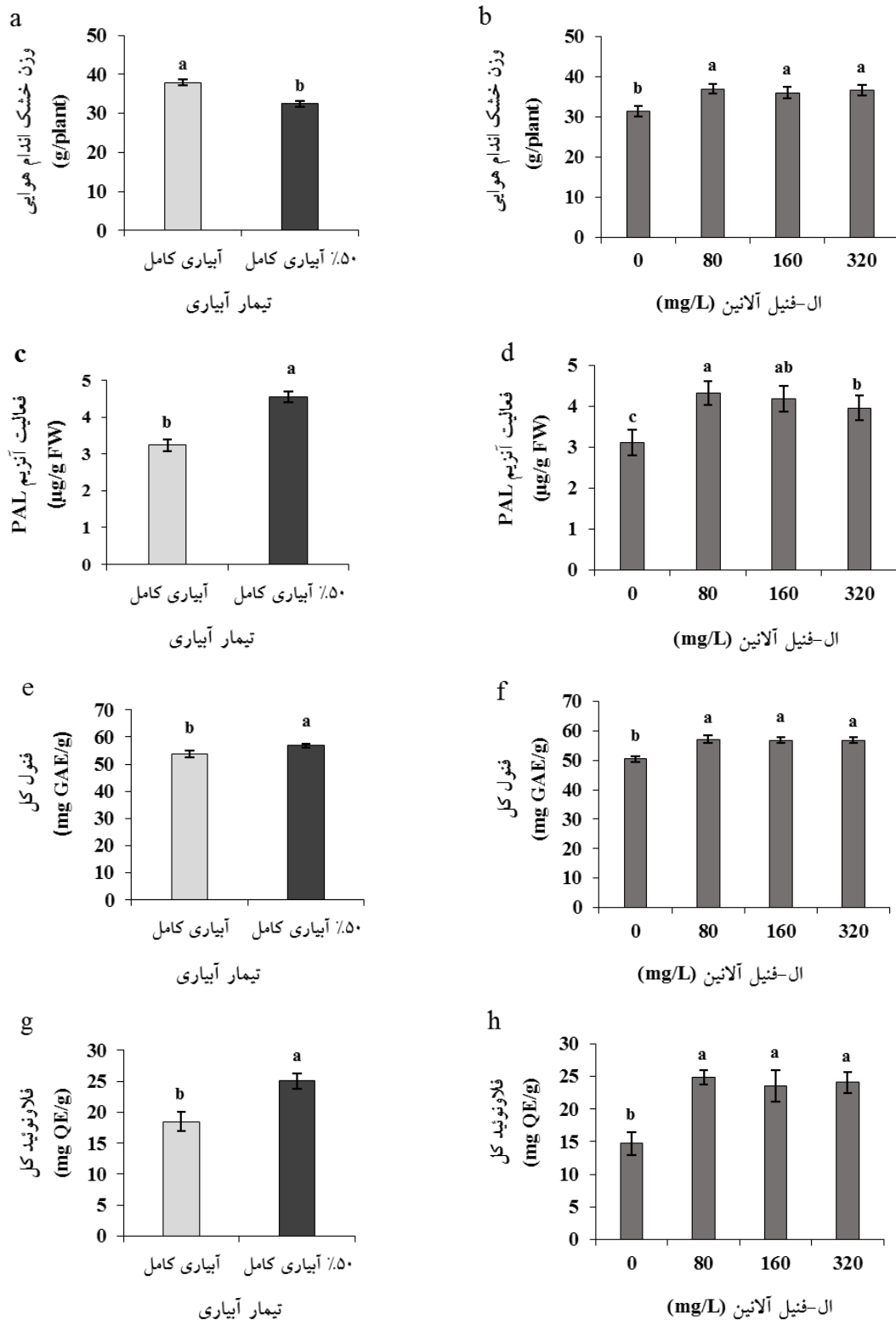
وزن خشک اندام هوایی: وزن خشک اندام هوایی رزماری تحت تنش خشکی و محلول‌پاشی در سطح احتمال ۱ درصد معنی‌دار شد، اما اثر متقابل این دو فاکتور معنی‌دار نشد (جدول ۳). وزن خشک اندام هوایی در شرایط آبیاری کامل ۳۷/۹ گرم در بوته بود که با اعمال تنش خشکی ۵/۵ گرم (۱۴/۴ درصد) کاهش یافت (شکل ۲a). با محلول‌پاشی با ال-فنیل آلانین در هر سه غلظت ۸۰، ۱۶۰ و ۳۲۰ میلی‌گرم در لیتر، به طور میانگین ۵ گرم (۱۶ درصد) به وزن خشک اندام هوایی اضافه گردید (شکل ۲b). کاربرد این ماده سبب افزایش رنگدانه‌های فتوسنتزی (شکل ۱b و ۱d) شد که در افزایش سرعت فتوسنتز،



شکل ۱- تأثیر تیمار آبیاری (آبیاری کامل و ۵۰٪ آبیاری کامل) و محلول پاشی غلظت‌های ال-فنیل آلانین (صفر، ۸۰، ۱۶۰ و ۳۲۰ میلی‌گرم در لیتر) بر کلروفیل *a* (a و b)، کاروتنوئیدها (c و d) و کلروفیل *b* (e). مقادیر با حروف متفاوت دارای اختلاف معنی‌دار آماری در سطح احتمال ۵ درصد بر اساس آزمون LSD و خطوط روی هر ستون معرف استاندارد ارور هستند.

با کاهش اندازه سلول‌های بالغ، بر اندازه برگ تأثیر می‌گذارد. سرعت فتوسنتز خالص نیز به دلیل کاهش رشد و سطح برگ تحت تأثیر تنش قرار می‌گیرد (Alves and Setter, 2004). در این شرایط استراتژی گیاه اختصاص بیشتر مواد به رشد ریشه

تثبیت بیشتر CO_2 و در نهایت افزایش وزن خشک نقش دارند. کاهش ارتفاع گیاه به کاهش انبساط و طولیل شدن سلول نسبت داده می‌شود (Manivannan *et al.*, 2007). تنش خشکی سبب کاهش رشد و تقسیم سلولی می‌شود که در طولانی مدت



شکل ۲- تأثیر تیمار آبیاری (آبیاری کامل و ۵۰٪ آبیاری کامل) و محلول پاشی غلظت‌های ال-فنیل آلانین (صفر، ۸۰، ۱۶۰ و ۳۲۰ میلی‌گرم در لیتر) بر وزن خشک اندام هوایی (a و b) فعالیت آنزیم PAL (c و d)، فنول کل (e و f) و فلاونوئید کل (g و h) در رزماری. مقادیر با حروف متفاوت دارای اختلاف معنی‌دار آماری در سطح احتمال ۵ درصد بر اساس آزمون LSD و خطوط روی هر ستون معرف استاندارد ارور هستند.

گیاهان چندین مکانیسم مقاومت به خشکی را در خود تکامل داده‌اند که یکی از آن‌ها افزایش فعالیت آنزیم PAL است. این آنزیم تشکیل ترانس اسید سینامیک از فنیل آلانین را با از دست دادن همزمان آمونیاک کاتالیز می‌کند (Paul et al., 2023) و منجر به تولید طیف گسترده‌ای از متابولیت‌های ثانویه بر اساس اسکلت فنیل پروپانوئیدی می‌شود (Feduraev et al., 2020). PAL آنزیم اصلی درگیر در اتصال مسیر اسیدهای آمینه آروماتیک و متابولیت‌های ثانویه است (Paul et al., 2023). آنزیم PAL با تغییر مسیرهای متابولیکی اولیه به ثانویه، سبب تولید و تجمع فنول و فلاونوئید در بافت‌ها می‌شود. این تجمع ارزش غذایی محصولات گیاهی را افزایش می‌دهد. بنابراین، PAL نقش مهمی در بهبود کیفیت محصولات ایفا می‌کند (Gohari et al., 2021). همچنین با فراهمی فنیل آلانین برای گیاه، این ماده به عنوان سوسترای PAL، سبب تحریک فعالیت این آنزیم می‌شود (شکل ۲د). در مرحله گلدهی فلفل، تحت تنش خشکی تدریجی، فعالیت آنزیم PAL افزایش یافت (Phimchan et al., 2014). فعالیت PAL در انگورهای وارپته حسینی تیمار شده با فنیل آلانین در غلظت‌های ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میکرومولار پیش از رنگ‌گیری حبه‌ها در مقایسه با خوشه‌های تیمار نشده به طور قابل ملاحظه‌ای افزایش یافت (Gohari et al., 2021).

فنول کل: فنول کل عصاره رزماری تحت تأثیر خشکی و محلول‌پاشی قرار گرفت اما اثر متقابل این دو فاکتور معنی‌دار نشد (جدول ۳). تحت تنش خشکی فنول کل از ۰/۱۰۷ به ۰/۱۱۳ میلی‌گرم گالیک اسید بر گرم افزایش یافت (افزایش ۵/۷ درصدی نسبت به شاهد) (شکل ۲e). محلول‌پاشی با ال-فنیل آلانین در غلظت‌های ۸۰ تا ۳۲۰ میلی‌گرم در لیتر سبب شد ترکیبات فنولی عصاره ۰/۰۱۲ میلی‌گرم گالیک اسید بر گرم در مقایسه با شاهد افزایش یابد (افزایش ۱۲/۴ تا ۱۳/۴ درصدی نسبت به شاهد) (شکل ۲f). با افزایش فعالیت آنزیم PAL تحت تنش خشکی (شکل ۲c)، میزان متابولیت‌ها به عنوان فرآورده نهایی بیشتر از شرایط آبیاری کامل گردید. احتمالاً با قرارگرفتن ال-فنیل آلانین از طریق محلول‌پاشی در

جهت کمک به جذب آب است (Leport et al., 2006). در نهایت با کاهش ارتفاع گیاه، اندازه برگ، سطح برگ و انتقال بیشتر کربن جهت تقویت ریشه، وزن اندام هوایی گیاه کاهش می‌یابد. اسیدهای آمینه به عنوان پیش‌سازهای طیف گسترده‌ای از محصولات طبیعی گیاهی نقش مهمی در رشد، نمو و تولید کلروفیل به دلیل فراهمی نیتروژن و کربن برای گیاه دارند (Maeda and Dudareva, 2012). بیشترین ماده خشک مریم‌گلی (۲/۷ تن در هکتار) در شرایط آبیاری بعد از تخلیه ۴۰ درصد آب در دسترس و کم‌ترین میزان ماده خشک (۰/۹ تن در هکتار) در شرایط آبیاری بعد از تخلیه ۸۰ درصد آب در دسترس گیاه بدست آمد (Govahi et al., 2015). این کاهش می‌تواند نتیجه تخصیص ترجیحی تولید زیست‌توده به ریشه‌ها می‌تواند نتیجه کارایی فتوسنتز باشد (Sobkhizi et al., 2014). محلول‌پاشی زوفا (*Hyssopus officinalis*) با فنیل آلانین در غلظت ۱۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر به ترتیب سبب شد وزن خشک گیاه در سال اول از ۰/۵۵ به ۰/۷۱ کیلوگرم بر متر مربع و در سال دوم از ۰/۸۹ به ۱/۰۵ کیلوگرم بر متر مربع برسد (Aghaei et al., 2019). محلول‌پاشی فنیل آلانین بر بوته‌های ریحان در غلظت‌های ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر در چین اول به ترتیب سبب افزایش ۲۴/۳ و ۲۵/۷ درصد و در چین دوم سبب افزایش ۲۷/۴ و ۳۰ درصد وزن خشک شد (Reham et al., 2016).

فعالیت آنزیم PAL: نتایج تجزیه واریانس نشان داد فعالیت آنزیم PAL تحت اثر اصلی خشکی و محلول‌پاشی در سطح احتمال ۱ درصد معنی‌دار شد اما اثر متقابل خشکی × محلول‌پاشی معنی‌دار نشد (جدول ۳). فعالیت این آنزیم تحت تنش خشکی ۴۰/۶ درصد افزایش یافت (شکل ۲c) همچنین فعالیت PAL تحت تأثیر محلول‌پاشی رزماری با ال-فنیل آلانین قرار گرفت. بیشترین فعالیت با محلول‌پاشی ۸۰ و ۱۶۰ میلی‌گرم در لیتر ال-فنیل آلانین بدست آمد که به ترتیب ۳۸ و ۳۳/۹ درصد نسبت به شاهد افزایش داشت. با افزایش غلظت تأثیر این ماده بر فعالیت آنزیم کمتر شد (شکل ۲d).

برای سنتز فلاونوئید، دامینه کردن فنیل آلانین به سینامات توسط فنیل آلانین آمونیلایز است. مرحله بعد شامل تبدیل سینامات به ۴-کوماریل-کوآنزیم آ توسط ترانس سینامات ۴-هیدروکسیلاز (C4H) است (Barros and Dixon, 2020). محتوی فلاونوئید در بادرنجبویه (*Melissa officinalis L.*) تحت تنش خشکی با ۶۰ و ۳۰ درصد آبیاری کامل، به ترتیب ۵۵ و ۶۰ درصد نسبت به شاهد افزایش یافت (Omidi *et al.*, 2018).

قدرت آنتی اکسیدانی عصاره: اثرات اصلی خشکی و محلول پاشی به ترتیب در سطح احتمال ۵ و ۱ درصد معنی دار شدند اما اثر متقابل خشکی × محلول پاشی معنی دار نشد (جدول ۴). تحت تنش خشکی القاشده، قدرت آنتی اکسیدانی عصاره رزماری ۵/۶ درصد افزایش یافت (شکل ۳a). محلول پاشی رزماری با غلظت های ۸۰، ۱۶۰ و ۳۲۰ میلی گرم در لیتر ال-فنیل آلانین، سبب افزایش ۱۰/۷ تا ۱۱/۵ درصد قدرت آنتی اکسیدانی عصاره شد (شکل ۳b). افزایش فعالیت آنزیم PAL تحت تنش خشکی (شکل ۲c) و محلول پاشی ال-فنیل آلانین (شکل ۲d) سبب افزایش محتوی فنول کل (شکل ۲e و ۲f) و فلاونوئید کل (شکل ۲g و ۲h) موجود در عصاره رزماری شد. همچنین کاروتنوئیدها تحت تأثیر تنش خشکی (شکل ۱c) و محلول پاشی (شکل ۱d) افزایش یافتند. افزایش این متابولیت های ثانویه به عنوان ترکیبات آنتی اکسیدانی، با دادن هیدروژن به رادیکال DPPH سبب مهار آن شدند (شکل ۳a و ۳b).

سیستم آنتی اکسیدانی گیاه نقش حفاظتی مهمی از طریق افزایش متابولیت های ثانویه جهت خنثی سازی رادیکال های آزاد تشکیل شده تحت تنش خشکی ایفا می کند. تنش خشکی در ریشه از طریق شبکه های سیگنال دهی سلول به سلول درک می شود. این سیگنال های استرس متعاقباً از طریق ریشه به سمت برگ ها می روند تا از طریق آوند چوبی بیوستتز هورمون های گیاهی و متابولیت های ثانویه را القا کنند (Yadav *et al.*, 2021). اسانس گیاه رزماری تحت تنش خشکی ۷۵ و ۵۵ درصد آبیاری کامل به ترتیب سبب مهار ۹۰ و ۸۸ درصد رادیکال های DPPH شدند (Farhoudi, 2013). در نعنای فلفلی

اختیار گیاه، فراوانی پیش ماده برای آنزیم PAL سبب افزایش تولید فنول کل از طریق تبدیل فنیل آلانین به اسید سینامیک شد (شکل ۲f).

تحت تنش آبی در انتقال کربن به مخازن گیاه محدودیت ایجاد می شود و کربن انباشته شده به تولید متابولیت های ثانویه اختصاص می یابد که بدون رقابت با رشدونمو هستند (Ning *et al.*, 2022). افزایش مقادیر فنولی را می توان به پاسخ متداول گیاه به شرایط تنش خشکی و افزایش ROSها و راهی برای ذخیره اسکلت کربنی تولید شده توسط فتوسنتز در دوره هایی که رشد گیاه محدود می شود در نظر گرفت (Kapoor *et al.*, 2020). محلول پاشی نعنای ال-تریپتوفان، ال-تیروزین، ال-فنیل آلانین در دو غلظت ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی گرم در لیتر، محتوی فنول کل را ۱/۲۲ تا ۳/۵۱ برابر افزایش داد (Taraseviciene *et al.*, 2021).

فلاونوئید کل: اثرات اصلی خشکی و محلول پاشی در سطح احتمال ۱ درصد معنی دار شدند، اما اثر متقابل معنی دار نشد (جدول ۳). تنش خشکی اعمال شده در رزماری سبب شد فلاونوئید کل عصاره ۰/۰۲۱ میلی گرم کوئرستین بر گرم (۳۵/۶ درصد) نسبت به شرایط آبیاری کامل افزایش یابد (شکل ۲g). محلول پاشی با ال-فنیل آلانین تأثیر مثبتی بر میزان این ترکیبات در عصاره داشت و سبب افزایش ۶۰ تا ۶۹ درصدی در مقایسه با شاهد شد (شکل ۲h). ممکن است فراهمی ال-فنیل آلانین برای گیاه سبب افزایش فعالیت آنزیم PAL (شکل ۲d) و القای تولید متابولیت های ثانویه با قدرت آنتی اکسیدانی بالا شامل فنول (شکل ۲f) و فلاونوئید (شکل ۲h) گردد.

فلاونوئیدها یک سیستم آنتی اکسیدانی ثانویه تشکیل می دهند و عملکرد سایر سیستم های مهارکننده ROS را هنگام کاهش فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدانی تکمیل می کنند. مهار تولید ROS به وسیله فلاونوئیدها از طریق بازداری آنزیم های تولیدکننده ROS و همین طور بازچرخ دیگر آنتی اکسیدان ها و کلاته شدن یون های فلزی انتقالی میسر می گردد. لذا این ترکیبات برای گیاهان در شرایط نامطلوب محیطی اهمیت دارند (Baskar *et al.*, 2018). اولین مرحله در مسیر فنیل پروپانوئید

جدول ۴- تجزیه واریانس (میانگین مربعات) محلول پاشی ال-فنیل آلانین بر قدرت آنتی اکسیدانی، محتوای اسانس و عملکرد اسانس رزماری تحت القای تنش خشکی

منابع تغییر	درجه آزادی	میانگین مربعات	
		قدرت آنتی اکسیدانی	عملکرد اسانس در بوته
خشکی	۱	۶۴/۶۵*	۵/۱× ^۳ -۱۰ ^{ns}
ال-فنیل آلانین	۳	۵۵/۹۴**	۶/۶× ^۳ -۱۰*
ال-فنیل آلانین × خشکی	۳	۵/۱۵ ^{ns}	۲/۰× ^۳ -۱۰ ^{ns}
خطا	۱۶	۱۰/۴۷	۵/۷× ^۴ -۱۰
ضریب تغییرات (%)		۵/۴	۴
		۶/۷	

* و ** به ترتیب معنی داری در سطح احتمال ۵ و ۱ درصد، ^{ns} عدم معنی داری

افزایش داد (Velicka et al., 2022).

عملکرد اسانس در بوته: عملکرد اسانس بوته رزماری

تحت اثرات اصلی تنش خشکی و محلول پاشی در سطح احتمال ۱ درصد معنی دار شد (جدول ۴). تحت تأثیر تنش خشکی عملکرد اسانس رزماری ۱۲ درصد کاهش یافت (شکل ۳c) که علت می تواند کاهش وزن خشک اندام هوایی (شکل ۲a) باشد. عملکرد اسانس رزماری تحت محلول پاشی با کلیه غلظت های ال-فنیل آلانین افزایش معنی داری نسبت به شاهد داشت که احتمالاً به علت افزایش وزن خشک رزماری تحت تأثیر محلول پاشی با مواد فوق بود (شکل ۲b). به طور کلی کاربرد ال-فنیل آلانین سبب شد عملکرد اسانس در بوته ۲۲/۷ تا ۲۷ درصد نسبت به شاهد افزایش یابد (شکل ۳d). در آزمایشی محلول پاشی فنیل آلانین ۱۵۰ میلی گرم در لیتر بر آویشن بیشترین تأثیر مثبت را بر عملکرد اسانس داشت (Ghazal, 2015).

ترکیبات اسانس: بر اساس نتایج GC-MS، ترکیبات اصلی

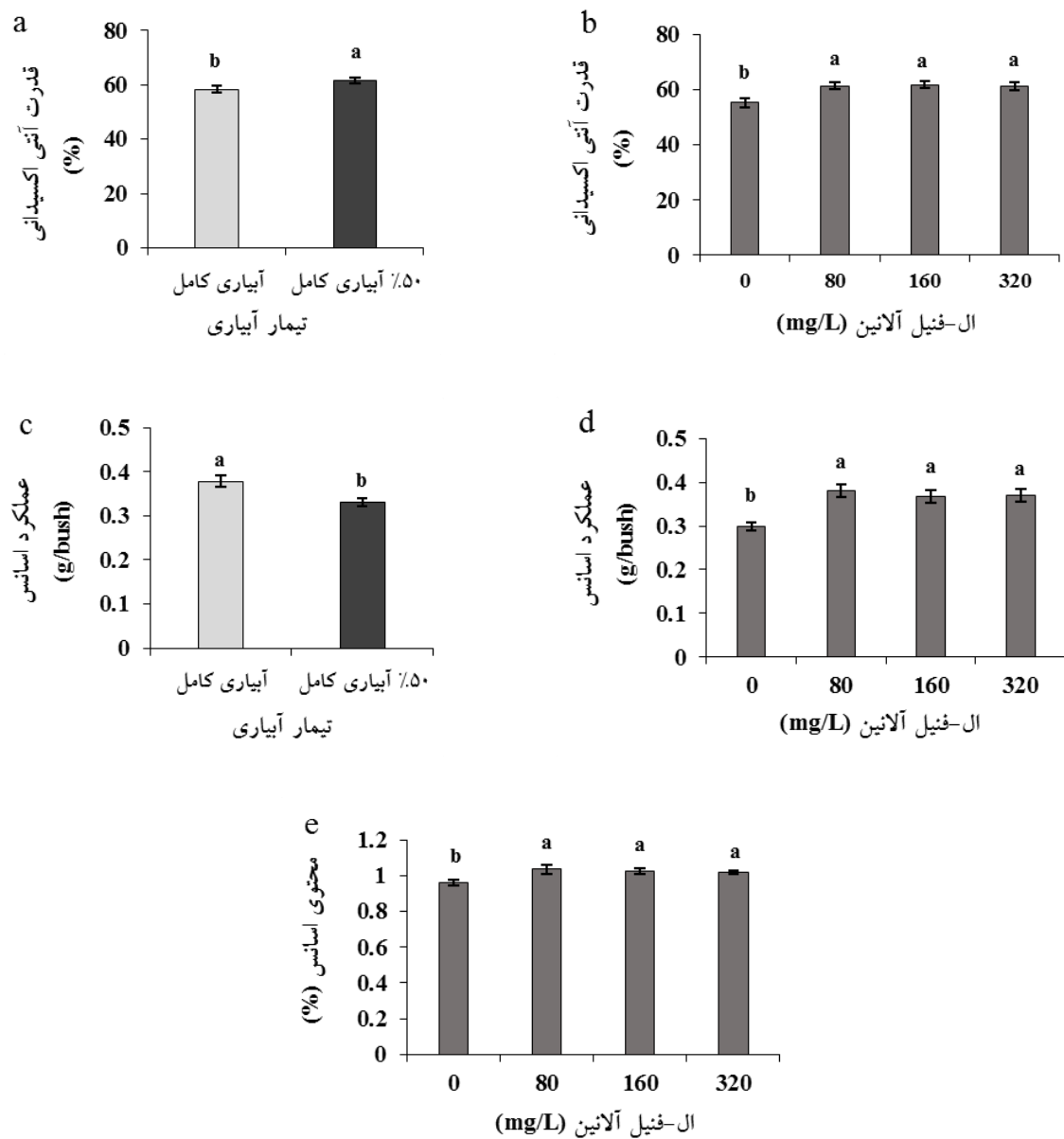
اسانس رزماری آلفا-پینن (α -Pinene) (۱۱/۹ درصد)، ۸،۱-سینئول (1,8-cineole) (۷/۶ درصد)، کامفور (Camphor) (۱۲/۸ درصد)، بورنتول (Borneol) (۱۰/۴ درصد) و بورنیل استات (Bornyl acetate) (۱۲/۸ درصد) بودند. تنش خشکی میزان آلفا-پینن، ۸،۱-سینئول و کامفور (مونوترپن ها) را کاهش داد اما بورنتول و بورنیل استات (مونوترپن ها) افزایش یافتند.

با اعمال تنش خشکی ۳۰ درصد آبیاری کامل، رادیکال های DPPH ۲۶ درصد مهار شدند (Jahani et al., 2021).

محتوای اسانس: تحت تأثیر محلول پاشی رزماری با

ال-فنیل آلانین، تغییرات محتوای اسانس در سطح احتمال ۵ درصد معنی دار شد اما اثر خشکی و اثر متقابل خشکی × محلول پاشی معنی دار نشد (جدول ۴). کلیه غلظت های ال-فنیل آلانین سبب افزایش ۶ تا ۷/۵ درصدی محتوای اسانس شدند (شکل ۳e).

فنیل آلانین به عنوان منبع نیتروژن یک کمک کننده برای رشد و نمو گیاه است که بر بسیاری از آنزیم های کنترل کننده فرآیندهای فیزیولوژیکی گیاه و تشکیل و تولید اسانس تأثیر می گذارد. این ماده در تمام سلول های گیاهی، پروتئین های گیاهی، هورمون ها و کلروفیل ها یافت می شود (Poorghadir et al., 2020). نیتروژن بر تولید اسانس از طریق متابولیسم کربن و تشکیل استیل کوآنزیم آ از طریق مسیر مولونات تأثیر می گذارد (Fazli et al., 2005). محلول پاشی بادرنجبویه در مرحله رویشی و شروع گلدهی با غلظت های ۱۰۰۰، ۲۰۰۰ و ۴۰۰۰ میلی گرم در لیتر ال-فنیل آلانین سبب افزایش عملکرد کمی اسانس شد و بیشترین بازده اسانس از محلول پاشی ۱۰۰۰ میلی گرم در لیتر مشاهده شد (Baharlou et al., 2019). در نعنای فلفلی (*M. piperita* Granada) محلول پاشی با فنیل آلانین ۱۰۰ میلی گرم در لیتر، میزان اسانس را ۱/۳۸ برابر



شکل ۳- تأثیر تیمار آبیاری (آبیاری کامل و ۵۰٪ آبیاری کامل) و محلول پاشی غلظت‌های ال-فنیل آلانین (صفر، ۸۰، ۱۶۰ و ۳۲۰ میلی‌گرم در لیتر) قدرت آنتی‌اکسیدانی (a و b)، عملکرد اسانس در بوته (c و d) و محتوی اسانس (e). مقادیر با حروف متفاوت دارای اختلاف معنی‌دار آماری در سطح احتمال ۵ درصد بر اساس آزمون LSD و خطوط روی هر ستون معرف استاندارد ارور هستند.

تحت تأثیر محلول‌پاشی رزماری با ال-فنیل آلانین، بالاترین میزان آلفا-پینن، ۸۱-۸- سینئول و کامفور در غلظت ۸۰ میلی‌گرم در لیتر بدست آمد که به ترتیب ۱۵/۸، ۷/۹ و ۱۰/۴ درصد ترکیبات اسانس را تشکیل دادند. بیشترین میزان بورنتول و بورنیل استات در غلظت ۳۲۰ میلی‌گرم در لیتر مشاهده شد که میزان آن‌ها به ترتیب ۱۴/۳ و ۱۹/۱ درصد بود (جدول ۵). با توجه به تأثیر خشکی القاشده و محلول‌پاشی ال-فنیل آلانین بر

کاهش برخی مونوترپن‌ها تحت تنش خشکی به دلیل تغییر در بیان ژن‌های مرتبط، تغییر در مسیرهای متابولیکی، و تخصیص منابع به ترکیبات محافظتی است (Ramezani *et al.*, 2020; Kumlay *et al.*, 2022). از سوی دیگر، افزایش برخی مونوترپن‌ها مانند بورنتول به نقش‌های محافظتی، تنظیم اسمزی، پاسخ به آسیب مکانیکی و تغییر در فعالیت آنزیمی مرتبط است (Yang *et al.*, 2021; Zarepour *et al.*, 2024).

جدول ۵- تأثیر تیمار آبیاری (آبیاری کامل و ۵۰٪ آبیاری کامل) و محلول‌پاشی غلظت‌های ال-فینیل آلانین (صفر، ۸۰، ۱۶۰ و ۳۲۰ میلی‌گرم در لیتر) بر ترکیبات اسانس رزماری (*Rosmarinus officinalis* L.).

ردیف	ترکیبات اسانس	شاخص بازداری	سطوح آبیاری (%)		غلظت‌های ال-فینیل آلانین (mg/L)			
			۱۰۰	۵۰	۰	۸۰	۱۶۰	۳۲۰
۳	α -Pinene	۹۴۲	۱۱/۸۶	۸/۱۵	۱۰/۰۱	۱۵/۷۶	۱۰/۲۸	۵/۶۹
۴	Camphene	۹۵۹	۳/۷۶	۳/۴۱	۳/۵۹	۵/۳۴	۳/۸۱	۳/۲۴
۵	Verbenene	۹۶۱	-	۰/۳۹	۰/۴۰	۰/۳۹	۰/۴۰	۰/۴۱
۶	β -Pinene	۹۸۵	۰/۶۴	۰/۴۵	۰/۵۵	۰/۸۱	۰/۵۶	۰/۳۵
۷	3-Octanone	۹۸۷	۱/۶۵	۰/۶۵	۱/۱۵	۱/۴۸	۰/۵۶	۰/۲۷
۸	β -Myrcene	۹۹۰	۱/۸۴	۱/۲۳	۱/۵۴	۲/۰۵	۱/۴۰	۱/۳۷
۹	<i>p</i> -cymene	۱۰۳۲	۱/۳۸	۰/۷۸	۱/۰۸	۱/۳۰	۰/۹۸	۰/۴۹
۱۰	Limonene	۱۰۳۷	۳/۰۹	۱/۸۹	۲/۴۹	۳/۳۴	۲/۲۲	۱/۵۴
۱۱	1,8-cineole	۱۰۴۲	۷/۶۲	۶/۵۲	۷/۰۷	۷/۹۴	۶/۲۷	۵/۹۷
۱۲	Linalool	۱۱۰۳	۳/۴۵	۳/۴۹	۳/۴۷	۲/۵۸	۳/۳۰	۴/۳۵
۱۳	<i>trans</i> -Sabinene hydrate	۱۱۰۶	۰/۶۵	۰/۵۳	۰/۵۹	۰/۳۷	۰/۴۸	۰/۵۸
۱۴	Chrysanthenone	۱۱۲۵	۰/۸۹	۱/۳۴	۱/۱۲	۱/۷۷	۱/۰۵	۰/۹۱
۱۵	<i>cis</i> -Verbenol	۱۱۴۴	-	۰/۷۲	۰/۷۲	۰/۶۲	۰/۶۷	۰/۷۹
۱۶	Camphor	۱۱۴۹	۱۲/۸۸	۶/۰۶	۹/۴۷	۱۰/۴۱	۶/۸۸	۴/۱۲
۱۷	<i>trans</i> -Pinocamphone	۱۱۵۸	۰/۸۵	۰/۶۹	۰/۷۷	۰/۷۶	۰/۷۳	۰/۶۵
۱۸	Borneol	۱۱۶۸	۱۰/۳۹	۱۳/۶۰	۱۲/۰۰	۹/۸۹	۱۲/۲۹	۱۴/۲۷
۱۹	<i>cis</i> -Pinocamphone	۱۱۷۱	۱/۴۹	۱/۳۲	۱/۴۱	۱/۳۰	۱/۳۱	۱/۳۸
۲۰	Terpinene-4-ol	۱۱۷۲	۱/۲۵	۱/۱۹	۱/۲۲	۱/۰۰	۱/۱۱	۱/۳۵
۲۱	α -Terpineol	۱۲۰۳	۲/۴	۲/۵۸	۲/۴۹	۲/۱۶	۲/۴۵	۲/۹۱
۲۲	Myrtenol	۱۲۰۵	۰/۳۳	۰/۴۰	۰/۳۷	۰/۳۴	۰/۴۰	۰/۴۷
۲۳	Myrtenal	۱۲۰۹	۱/۷۷	۲/۵۹	۲/۱۸	۱/۶۹	۲/۳۱	۳/۰۸
۲۴	Verbenone	۱۲۲۰	۴/۸۶	۲/۱۳	۳/۵۰	۳/۴۰	۲/۳۹	۱/۴۶
۲۵	Isobornyl formate	۱۲۵۳	۱/۷۱	۲/۸۲	۲/۲۷	۱/۸۰	۲/۲۷	۳/۵۹
۲۶	Bornyl formate	۱۲۶۰	-	۲/۷۹	۲/۷۹	۲/۱۲	۲/۵۳	۲/۸۴
۲۷	Bornyl acetate	۱۲۹۲	۱۲/۸۳	۱۶/۳۸	۱۴/۶۱	۱۲/۰۴	۱۶/۵۵	۱۹/۱۲
۲۸	Piperitenone oxide	۱۳۵۶	۰/۴	۰/۶۷	۰/۵۴	۰/۴۵	۰/۶۳	۰/۷۸
۲۹	α -Copaene	۱۳۶۱	۰/۷۵	۱/۵۷	۱/۱۶	۰/۸۴	۱/۱۵	۲/۴۶
۳۰	<i>trans</i> -Caryophyllene	۱۴۲۹	۲/۴۶	۴/۳۴	۳/۴۰	۲/۲۲	۴/۰۲	۵/۶۷
۳۱	α -humulene	۱۴۶۴	۰/۴	۰/۸۵	۰/۶۲	۰/۴۰	۰/۶۵	۰/۷۸
۳۲	Caryophyllene oxide	۱۵۷۷	۰/۸۹	۱/۹۴	۱/۴۲	۰/۸۳	۱/۴۰	۲/۷۴
۳۳	<i>epi</i> - α -Muurolol	۱۶۴۸	۰/۷	۱/۳۰	۱/۰۰	۰/۶۷	۱/۰۸	۱/۵۶
۳۴	<i>allo</i> -Aromandrene	۱۶۶۷	۲/۳۴	۴/۱۵	۳/۲۵	۲/۰۵	۳/۹۵	۴/۷۸
۳۵	Apiol	۱۶۸۰	۰/۵	۰/۹۰	۰/۷۰	۰/۴۵	۱/۱۸	۱/۰۸
	Monoterpene Hydrocarbons (%)		۲۲/۵۷	۱۶/۳۲	۱۹/۶۴	۲۹/۰۱	۱۹/۶۷	۱۳/۰۹
	Oxygenated Monoterpenes (%)		۵۶/۹۲	۵۴/۲۵	۵۵/۵۹	۵۱/۴۶	۵۳/۰۵	۵۵/۶۸
	Sesquiterpene (%)		۷/۵۴	۱۴/۱۶	۱۰/۸۵	۷/۰۲	۱۲/۲۵	۱۷/۹۱

فنیل آلانین رشد رویشی گیاه، تولید رنگدانه‌های فتوستتزی، فعالیت آنزیم PAL، تولید فنول و فلاونوئیدها را بهبود بخشید. بنابراین، با القای تنش خشکی کنترل شده و محلول پاشی فنیل آلانین می‌توان بر مقدار ترکیبات فعال و محتوی اسانس رزماری اثر گذاشت و فراورده ارزشمند این گیاه دارویی را در صنایع مختلف مورد استفاده قرار داد.

ترکیبات اسانس، بسته به هدف می‌توان میزان ترکیبات مورد نظر را افزایش یا کاهش داد.

نتیجه‌گیری

تحت تأثیر تنش خشکی ظاهراً کربن انباشته شده در سلول برای افزایش متابولیت‌های ثانویه اختصاص یافته و به موازات آن رشد رویشی کاهش یافته است. غلظت ۸۰ میلی‌گرم در لیتر

منابع

- Abrishamchi, P., Ganjeali, A., & Sakeni, H. (2012). Evaluation of morphological traits, proline content and antioxidant enzymes activity in chickpea genotypes (*Cicer arietinum* L.) under drought stress. *Iranian Journal Pulses Research*, 3(2), 17-30. DOI: 10.22067/IJPR.V1391I2.24695
- Aebisher, D., Cichonski, J., Szyrka, E., Masjonis, S., & Chrzanowski, G. (2021). Essential oils of seven lamiaceae plants and their antioxidant capacity. *Molecules*, 26(13), 3793.
- Aghaei, K., Ghasemi Pirbalouti, A., Mousavi, A., Naghdi Badi, H., & Mehnatkesh, A. (2019). Effects of foliar spraying of L-phenylalanine and application of bio-fertilizers on growth, yield, and essential oil of hyssop [*Hyssopus officinalis* L. subsp. *Angustifolius* (Bieb.)]. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2019.101318>
- Akbari, B., Baghaei-Yazdi, N., Bahmaie, M., & Mahdavi Abhari, F. (2022). The role of plant-derived natural antioxidants in reduction of oxidative stress. *Bio Factors*, 1-23. DOI: 10.1002/biof.1831
- Albouchi, A., Bejaoui, Z., & El-Aouni, M. H. (2003). Influence of moderate or severe water stress on the growth of *Casuarina glauca* Sieb. seedlings. *Science et changements planetaires*, 14(3), 137-142. <https://www.cabidigitallibrary.org/doi/full/10.5555/20033180592>.
- Allenspach, M., & Steuer, C. (2021). α -pinene: A never-ending story. *Phytochemistry*. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2021.112857>
- Alves, A. A. C., & Setter, T. L. (2004). Response of cassava leaf area expansion to water deficit: cell proliferation, cell expansion and delayed development. *Annals of Botany*, 94(4), 605-613. <https://doi.org/10.1093/aob/mch179>
- Baharlou, M. J., Ghasemi Pirbalouti, A., & Malekpoor, F. (2019). Effect of different concentrations of L-phenylalanine on chemical compositions and yield of essential oil of lemon balm (*Melissa officinalis*). *Journal of Medicinal Herbs*, 10(4), 175-183.
- Barros, J., & Dixon, R. A. (2020). Plant phenylalanine/tyrosine ammonia-lyases. *Trends in Plant Science*, 25(1), 66-79.
- Baskar, V., Rajendran, V., & Ramalingam, S. (2018). Flavonoids (antioxidants systems) in higher plants and their response to stresses. In: *Antioxidants and Antioxidant Enzymes in Higher Plants* (eds. Gupta, D. K., Palma, J. M. and Corpas, F. J.). Pp. 253-268. DOI: 10.1007/978-3-319-75088-0_12
- Bleve, M., Ciurlia, L., Erroi, E., Lionetto, G., Longo, L., Rescio, L., Schettino, T., Vasapollo, G., & Lionetto, M. G. (2008). An innovative method for the purification of anthocyanins from grape skin extracts by using liquid and sub-critical carbon dioxide. *Separation and Purification Technology*, 64, 192-197.
- Bogale, A., Nagle, M., Latif, S., Aguila, M., & Muller, J. (2016). Regulated deficit irrigation and partial root-zone drying irrigation impact bioactive compounds and antioxidant activity in two select tomato cultivars. *Scientia Horticulturae*, 213, 115-124. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2016.10.029>
- Buchanan, B. B., Gruissem, W., & Jones, R. L. (2000). *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. 2nd Ed. American Society of Plant Physiologists Rockville, MD.
- Burbulis, N., Deveikyte, J., Baltusnikiene, A., & Blinstrubiene, A. (2023). Effect of phenylalanine and tryptophane on chlorophyll and phenolic content, and the antioxidant activity of sweet basil (*Ocimum basilicum* L.) under drought conditions. *Zemdirbyste-Agriculture*, 110(4), 339-346. DOI:10.13080/z-a.2023.110.038
- Cai, Z. M., Peng, J. Q., Chen, Y., Tao, L., Zhang, Y. Y., Fu, L. Y., Long, Q. D., & Shen, X. C. (2020). 1,8-Cineole: A review of source, biological activities, and application. *Journal of Asian Natural Products Research*. <https://doi.org/10.1080/10286020.2020.1839432>
- Caser, M., Chitarra, W., D'Angiolillo, F., Perrone, E., Demasi, S., Lovisolo, C., Pistelli, L., Pistelli, L., & Scariot, V. (2019). Drought stress adaptation modulates plant secondary metabolite production in *Salvia dolomitica* Codd. *Industrial Crops and Products*, 129, 85-96. DOI: 10.1016/j.indcrop.2018.11.068
- Chaturvedi, S., & Gupta, P. (2021). Plant secondary metabolites for preferential targeting among various stressors of metabolic syndrome. *Studies in Natural Products Chemistry*, 71, 221-261. [\[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2025-10-01\]](https://doi.org/10.1016/B978-0-323-</p>
</div>
<div data-bbox=)

91095-8.00012-X

- Chaudhary, M. R., Chaudhary, S., Sharma, Y., Singh, T. A., Mishra, A. K., Sharma, S., & Mehdi, M. M. (2023). Aging, oxidative stress and degenerative diseases: Mechanisms, complications and emerging therapeutic strategies. *Biogerontology*, 24(5), 609-662.
- Cheng, L., Han, M., Yang, L., Yang, L., Sun, Z., & Zhang, Z. (2018). Changes in the physiological characteristics and baicalin biosynthesis metabolism of *Scutellaria baicalensis* Georgi under drought stress. *Industrial Crops and Products*, 122, 473-482. DOI:10.1016/j.indcrop.2018.06.030
- Cheng, X., Wang, X., Zhang, A., Wang, P., Chen, Q., Ma, T., & Fang, Y. (2020). Foliar phenylalanine application promoted antioxidant activities in cabernet sauvignon by regulating phenolic biosynthesis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 68(52), 15390-15402.
- Chrysargyris, A., Mikallou, M., Petropoulos, S., & Tzortzakis, N. (2020). Profiling of essential oils components and polyphenols for their antioxidant activity of medicinal and aromatic plants grown in different environmental conditions. *Agronomy*, 10(727), 1-28. <https://doi.org/10.3390/agronomy10050727>
- Correia, B., Pinto-Marijuan, M., Neves, L., Brossa, R., Dias, M. C., Costa, A., & Pinto, G. (2014). Water stress and recovery in the performance of two Eucalyptus globulus clones: physiological and biochemical profiles. *Physiologia Plantarum*, 150(4), 580-592. <https://doi: 10.1111/ppl.12110>
- Edahiro, J. I., Nakamura, M., Seki, M., & Furusaki, S. (2005). Enhanced accumulation of anthocyanin in cultured strawberry cells by repetitive feeding of L-phenylalanine into the medium. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 99, 43-47.
- El-Din, K. M. G., & El-Wahed, M. S. A. A. (2005). Effect of some amino acids on growth and essential oil content of chamomile plant. *International Journal of Agriculture and Biology*, 7, 376-380.
- Fageria, N. K., Filho, M. B., Moreira, A., & Guimaraes, C. M. (2009). Foliar fertilization of crop plants. *Journal of Plant Nutrition*, 32(6), 1044-1064.
- Farhoudi, R. (2013). Effect of drought stress on chemical constituents, photosynthesis and antioxidant properties of *Rosmarinus officinalis* essential oil. *Journal of Medicinal plants and By-Products*, 1, 17-22. DOI: 10.22092/JMPB.2013.108486
- Farooq, M., Wahid, A., Kobayashi, N., Fujita, D., & Basra, S. (2009). Plant drought stress: Effects, mechanisms and management. *Agronomy*, 29, 185-212. DOI: 10.1051/agro: 2008021
- Fazli, S., Abdin, M. Z., Jamal, A., & Ahmad, S. (2005). Interactive effect of sulphur and nitrogen on lipid accumulation, acetyl-CoA concentration and acetyl-CoA carboxylase activity in developing seeds of oilseed crops (*Brassica campestris* L. and *Eruca sativa* Mill.). *Plant Science*, 168(1), 29-36. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2004.07.008>
- Feduraev, P., Skrypnik, L., Riabova, A., Pungin, A., Tokupova, E., Maslennikov, P., & Chupakhina, G. (2020). Phenylalanine and tyrosine as exogenous precursors of wheat (*Triticum aestivum* L.) secondary metabolism through PAL-associated pathways. *Plants*, 9(4), 476. DOI: 10.3390/plants9040476
- Gasmi, A., Benabderrahim, M. A., Guasmi, F., Elfalleh, E., Triki, T., Zammouri, T., & Ferchichi, A. (2019). Phenolic profiling, sugar composition and antioxidant capacity of arta (*Calligonum comosum* L.), a wild Tunisian desert plant. *Industrial Crops and Products*, 130, 436-442. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2019.01.003>
- Ghazal, G. M. (2015). Growth and oil yield of thymus vulgaris plant as influenced by some amino acids and ascorbic acid. *World Journal of Pharmaceutical Sciences*, 3(10), 1949-2166.
- Gohari, G. R., Freydoni, S., Panahirad, S., Sepehri, N., & Dadpour, M. R. (2021). Foliar application of phenylalanine on nutritional value in *Vitis vinifera* var. Hosseini. *Food Research Journal*, 30(4), 109-121. 10.22034/FR.2021.37105.1708
- Govahi, M., Ghalavand, A., Nadjafi, F., & Sorooshzadeh, A. (2015). Comparing different soil fertility systems in Sage (*Salvia officinalis*) under water deficiency. *Industrial Crops and Products*, 74, 20-27. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.04.053>
- Hachlafi, N., Aanniz, T., Menyiy, N., Baaboua, A., Omari, N., & Balahbib, A. (2023). In vitro and in vivo biological Investigations of camphene and its mechanism insights. *Food Reviews International*, 39(4), 1799-1826. <https://doi.org/10.1080/87559129.2021.1936007>
- Jahani, F., Tohidi-Moghadam, H. R., Larijani, H. R., Ghooshchi, F., & Oveysi, M. (2021). Influence of zinc and salicylic acid foliar application on total chlorophyll, phenolic components, yield and essential oil composition of peppermint (*Mentha piperita* L.) under drought stress. *Arabian Journal of Geosciences*, 14(691). DOI: 10.1007/s12517-021-07024-3
- Jamshidi-Kia, F., Lorigooini, Z., & Amini-Khoei, H. (2017). Medicinal plants: Past history and future perspective. *Journal of Herbmmed Pharmacology*, 7(1), 1-7.
- Kapoor, D., Bhardwaj, S., Landi, M., Ramakrishnan, M., Sharma, A., & Sharma, A. (2020). The impact of drought in plant metabolism: How to exploit tolerance mechanisms to increase crop production. *Applied Sciences*, 10(16), 5692. <https://doi.org/10.3390/app10165692>

- Khalil, N., Elhady, S. S., Diri, R. M., Fekry, M. I., Bishr, M., Salama, O., & El-Zalabani, S. M. (2022). Salicylic acid spraying affects secondary metabolites and radical scavenging capacity of drought-stressed *Eriocephalus africanus* L. *Agronomy*, 12(10), 2278. <https://doi.org/10.3390/agronomy12102278>
- Khan, S., Abdo, A. A. A., Shu, Y., Zhang, Z., & Liang, T. (2023). The extraction and impact of essential oils on bioactive films and food preservation, with emphasis on antioxidant and antibacterial activities-a review. *Foods*, 12(4169). <https://doi.org/10.3390/foods12224169>
- Kim, S. H., Lee, S. Y., Hong, C. Y., Gwak, K. S., Park, M. J., Smith, D., & Choi, I. G. (2013). Whitening and antioxidant activities of bornyl acetate and nezukol fractionated from *Cryptomeria japonica* essential oil. *International Journal of Cosmetic Science*, 35, 484-490. <https://doi.org/10.1111/ics.12069>
- Koca, N., & Karaman, S. (2015). The effects of plant growth regulators and L-phenylalanine on phenolic compounds of sweet basil. *Food Chemistry*, 166, 515-521. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.06.065>
- Kordi, S., Saidi, M., & Ghanbari, F. (2013). Induction of drought tolerance in sweet basil (*Ocimum basilicum* L.) by salicylic acid. *Journal of Agriculture and Food Research*, 2(2), 18-26. DOI:10.24102/ijafr.v2i2.149
- Kornienko, J. S., Smirnova, I. S., Pugovkina, N. A., Ivanova, J. S., Shilina, M. A., Grinchuk, T. M., Shatrova, A. N., Aksenov, N. D., Zenin, V. V., & Nikolsky, N. N. (2019). High doses of synthetic antioxidants induce premature senescence in cultivated mesenchymal stem cells. *Scientific Reports*, 9, 1296.
- Kumlay, A. M., Kocak, M. Z., Gohari, G., Nouraein, M., Celikkan, F., Kaysim, M. G., & Kulak, M. (2022). Agronomic traits, secondary metabolites and element concentrations of *Lavandula angustifolia* leaves as a response to single or reiterated drought stress: How effective is the previously experienced stress? *Folia Horticulturae*, 34(1), 1-16. [https://DOI: 10.2478/fhort-2022-0005](https://DOI:10.2478/fhort-2022-0005)
- Leport, L., Turner, N. C., French, R. J., Barr, M. D., Duda, R., & Davies, S. L. (2006). Physiological responses of chickpea genotypes to terminal drought in a Mediterranean-type environment. *European Journal of Agronomy*, 11(3), 279-291. DOI: 10.1016/S1161-0301(99)00039-8
- Lichtenthaler, H. K. (1987). Chlorophylls and carotenoids: Pigments of photosynthetic biomembranes. *Methods in Enzymology*, 148, 350-382. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(87\)48036-1](https://doi.org/10.1016/0076-6879(87)48036-1)
- Lohr, M. (2009). Carotenoids in chlamydomonas. In: The Chlamydomonas Sourcebook (eds. Grossman, A. R. and Wollman, F. A.). Pp. 733-761. DOI:10.1016/B978-0-12-370873-1.00029-0
- Lourenco, S. C., Moldao-Martins, M., & Alves, V. D. (2019). Antioxidants of natural plant origins: From sources to food industry applications. *Molecules*, 24(22), 4132. DOI: 10.3390/molecules24224132
- Maeda, H., & Dudareva, N. (2012). The shikimate pathway and aromatic amino acid biosynthesis in plants. *Annual Review of Plant Biology*, 63, 73-105. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042811-105439>
- Mamta, K. M., Gurpreet, S. D., Satinder, K. B., & Mausam, V. (2014). Antioxidants. In: Biotransformation of Waste Biomass into High Value Biochemicals (eds. Satinder, K. B., Gurpreet, S. D. and Carlos, R. S.) Pp. 117-138. Springer, New York, NY.
- Manivannan, P., Jaleel, C. A., Sankar, B., Kishorekumar, A., Somasundaram, R., Lakshmanan, G. A., & Panneerselvam R. (2007). Growth, biochemical modifications and proline metabolism in *Helianthus annuus* L. as induced by drought stress. *Colloids and Surface B: Biointerfaces*, 59(2), 141-149. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2007.05.002>
- Maoka, T. (2020). Carotenoids as natural functional pigments. *Journal of Natural Medicines*, 74(1), 1-16. DOI: 10.1007/s11418-019-01364-x
- Marinova, D., Ribarova, F., & Atanassova, M. (2005). Total phenolics and flavonoids in Bulgarian fruits and vegetables. *Journal of Chemical Technology and Metallurgy*, 40(3), 255-260.
- Maslova, T. G., Markovskaya, E. F., & Slemnev, N. N. (2021). Functions of carotenoids in leaves of higher plants. *Biology Bulletin Reviews*, 11, 476-487.
- Mittler, R., Zandalinas, S. I., Fichman, Y., & Van Breusegem, F. (2022). Reactive oxygen species (ROS) signalling in plant stress responses. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 23, 663-679.
- Mohammadi, H., Amirikia, F., Ghorbanpour, M., Fatehi, F., & Hashempour, H. (2019). Salicylic acid induced changes in physiological traits and essential oil constituents in different ecotypes of *Thymus kotschyanus* and *Thymus vulgaris* under well-watered and water stress conditions. *Industrial Crops and Products*, 129, 561-574. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.12.046>
- Molla, A. E., Andualem, A. M., Ayana, M. T., & Zeru, M. A. (2023). Effects of drought stress on growth, physiological and biochemical parameters of two Ethiopian red pepper (*Capsicum annum* L.) cultivars. *Journal of Applied Horticulture*, 25(1), 32-38. <https://doi.org/10.37855/jah.2023.v25i01.05>
- Mwithiga, G., Maina, S., Gitari, J., & Muturi, P. (2022). Rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) growth rate, oil yield and oil quality under differing soil amendments, *Heliyon*, 8(4).
- Naikoo, M. I., Dar, M. I., Raghieb, F., Jaleel, H., Ahmad, B., Raina, A., Khan, F. A., & Naushin, F. (2019). Role and regulation of plants phenolics in abiotic stress tolerance. *Plant Signaling Molecules*, 9, 157-168. DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816451-8.00009-5>

- Nieto, G., Ros, G., & Castillo, J. (2018). Antioxidant and antimicrobial properties of rosemary (*Rosmarinus officinalis*, L.). *Medicines*, 5(98), 1-13. <https://doi.org/10.3390/medicines5030098>
- Ning, W., Zhu, S. Q., Nian, H., Yin, J. H., & An, B. Y. (2022). Effects of exogenous CaCl₂ on the photosynthetic function and active oxygen metabolism of *Salix viminalis* leaves under Pb stress. *Applied Ecology and Environmental Research*, 20(4), 3143-3154. https://doi.org/10.15666/aeer/2004_31433154
- Nisar, N., Li, L., Chi Khin, N., & Pogson, B. J. (2014). Carotenoid metabolism in plants. *Molecular Plant*, 8(1), 68-82. DOI:<https://doi.org/10.1016/j.molp.2014.12.007>
- Novak, J., & Bluthner, W. D. (2020). *Rosmarinus officinalis* L.: Rosemary. *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants*, 501-521. https://doi.org/10.1007/978-3-030-38792-1_15
- Oguz, M. C., Aycan, M., Oguz, E., Poyraz, I., & Yildiz, M. (2022). Drought stress tolerance in plants: Interplay of molecular, biochemical and physiological responses in important development stages. *Physiologia*, 2(4), 180-197.
- Omidi, J., Shoja, M., & Sariri, R. (2018). Effect of water-deficit stress on secondary metabolites of *Melissa officinalis* L.: Role of exogenous salicylic acid. *Caspian Journal of Environmental Sciences*, 16(2), 121-134.
- Paul, A., Acharya, K., & Chakraborty, N. (2023). Involvement of phenylpropanoid pathway and shikimic acid pathway in environmental stress response. In: *Biology and Biotechnology of Environmental Stress Tolerance in Plants* (ed. Roychoudhury, A.) Pp. 40. New York.
- Phimchan, P., Chathai, S., Bosland, P. W., & Techawongstien, S. (2014). Enzymatic changes in phenylalanine ammonia-lyase, cinnamic-4-hydroxylase, capsaicin synthase, and peroxidase activities in capsicum under drought stress. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62, 7057-7062. [dx.doi.org/10.1021/jf4051717](https://doi.org/10.1021/jf4051717)
- Poorghadir, M., Mohammadi Torkashvand, A., Mirjalili, S. A., & Moradi, P. (2020). Interactions of amino acids (proline and phenylalanine) and biostimulants (salicylic acid and chitosan) on the growth and essential oil components of savory (*Satureja hortensis* L.). *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 30, 1-21. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2020.101815>
- Rahmani Samani, M., Ghasemi Pirbalouti, A., Moattar, F., & Golparvar, A. R. (2019). L-Phenylalanine and bio-fertilizers interaction effects on growth, yield and chemical compositions and content of essential oil from the sage (*Salvia officinalis* L.) leaves. *Industrial Crops and Products*, 137, 1-8. DOI:10.1016/j.indcrop.2019.05.019
- Rajput, A., Kasar, A., Thorat, S., & Kulkarni, M. (2023). Borneol: A plant-sourced terpene with a variety of promising pharmacological effects. *Natural Products Journal*, 13(1), 13-28. <https://doi.org/10.2174/2210315512666211221115143>
- Ramezani, S., Abbasi, A., Sobhanverdi, S., Shojaeiyan, A., & Ahmadi, N. (2020). The effects of water deficit on the expression of monoterpene synthases and essential oils composition in *Salvia* ecotypes. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 26, 2199-2207. <https://doi.org/10.1007/s12298-020-00892-1>
- Reham, M. S., Khattab, M. E., Ahmed, S. S., & Kandil, M. A. M. (2016). Growth, yield quality and chemical composition of genoveser basil plant. *African Journal of Agricultural Research*, 11(16), 1398-1410. <https://doi.org/10.5897/AJAR2015.10699>
- Sathee, L., Malini, M. K., Kumar, P., & Kumar, S. (2023). Terpenoid production through mevalonate and methylerythritol phosphate pathway and regulation of environmental stress tolerance. In: *Biology and Biotechnology of Environmental Stress Tolerance in Plants* (ed. Roychoudhury, A.) Pp. 34.
- Saunders, J. A., & McClure, J. W. (1974). The suitability of a quantitative spectrophotometric assay for phenylalanine ammonia-lyase activity in barley, buckwheat and pea seedlings. *Journal of Plant Physiology*, 54, 412-413. <https://doi.org/10.1104/pp.54.3.412>
- Sharma, A., Shahzad, B., Rehman, A., Bhardwaj, R., Landi, M., & Zheng, B. (2019). Response of phenylpropanoid pathway and the role of polyphenols in plants under abiotic stress. *Molecules*, 24(13), 1-22. DOI: 10.3390/molecules24132452
- Soares Santos, E., Tavares de Sousa Machado, S., Beethoven Rodrigues, F., Almeida da Silva, Y., Carlos Xavier Matias, L., Janice Pereira Lopes, M., Damiana Soares Gomes, A., Feitosa Ribeiro, T., Adilfa de Oliveira Garcia, F., Douglas Melo Coutinho, H., Francisco Bezerra Felipe, C., de Araujo Neves, S., & Regina Kerntopf, M. (2023). Potential anti-inflammatory, hypoglycemic, and hypolipidemic activities of alpha-pinene in diabetic rats. *Process Biochemistry*, 126, 80-86. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2022.12.023>
- Sobhkhizi, A., fadai Rayni, M., Badie Barzin, H., & Noori, M. (2014). Influence of drought stress on photosynthetic enzymes, chlorophyll, protein and relative water content in crop plants. *International Journal of Biosciences*, 5(7), 89-100. <http://dx.doi.org/10.12692/ijb/5.7.89-100>
- Taraseviciene, Z., Velicka, A., & Paulauskiene, A. (2021). Impact of foliar application of amino acids on total phenols, phenolic acids content of different mints varieties under the field condition. *Plants*, 10(3), 1-16. <https://doi.org/10.3390/plants10030599>
- Thakur, M., Bhattacharya, S., Khosla, P. K., & Puri, S. (2018). Improving production of plant secondary metabolites through biotic and abiotic elicitation. *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants*, 12, 1-12. <https://doi.org/10.1016/j.jarmap.2018.11.004>

- Tzin, V., & Galili, G. (2010). The biosynthetic pathways for shikimate and aromatic amino acids in *Arabidopsis thaliana*. *American Society of Plant Biologists*, 1-18. DOI:10.1199/tab.0132
- Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M., Mazur, M., & Telser, J. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 39, 44-84.
- Velicka, A., Taraseviciene, Z., Hallmann, E., & Kieltyka Dadasiewicz, A. (2022). Impact of foliar application of amino acids on essential oil content, odor profile, and flavonoid content of different mint varieties in field conditions. *Plants*, 11(21), 2938. <https://doi.org/10.3390/plants11212938>
- Wang, W., & Gong, Y. (2021). Effects of water and salt coordinated regulation at the different growth stages on water consumption and yield of tomato. *International Journal of Agricultural and Biological Engineering*, 14(4), 96-105. DOI: 10.25165/j.ijabe.20211404.6238
- Wen, S., Liu, B., Long, S., Gao, S., Liu, Q., Liu, T., & Xu, Y. (2022). Low nitrogen level improves low-light tolerance in tall fescue by regulating carbon and nitrogen metabolism. *Environmental and Experimental Botany*. <https://doi.org/10.1016/j.enxpb.2021.104749>
- Wu, G. (2009). Amino acids: Metabolism, functions, and nutrition. *Amino Acids*, 37, 1-17. DOI: 10.1007/s00726-009-0269-0
- Xiu-Qin, L., Chao, J., Yan-Yan, S., Min-Li, Y., & Xiao-Gang, C. (2009). Analysis of synthetic antioxidants and preservatives in edible vegetable oil by HPLC/TOF-MS. *Food Chemistry*, 113, 692-700.
- Yadav, B., Jogawat, A., Rahman, M. S., & Narayan, O. P. (2021). Secondary metabolites in the drought stress tolerance of crop plants. *Gene Reports*, 23, 1-14. <https://doi.org/10.1016/j.genrep.2021.101040>
- Yamasaky, K., Hashimoto, A., Kokusenya, Y., Miyamoto, T., & Sato, T. (1994). Electrochemical method for estimating the antioxidative effects of methanol extracts of crude drugs. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 42(8), 1663-1665.
- Yang, L., Wen, K., Ruan, X., Zhao, Y. X., Wei, F., & Wang, Q. (2018). Response of plant secondary metabolites to environmental factors. *Molecules*, 1-26. <https://doi.org/10.3390/molecules23040762>
- Yang, Z., Xie, C., Huang, Y., An, W., Liu, S., Huang, S., & Zheng, X. (2021). Metabolism and transcriptome profiling provides insight into the genes and transcription factors involved in monoterpene biosynthesis of borneol chemotype of *Cinnamomum camphora* induced by mechanical damage. *Peerj Journals*, 9, e11465. <https://doi.org/10.7717/peerj.11465>
- Zarepour, M., Rahimi, M. M., Kelidari, A. S., & Abdipour, M. (2024). Growth-promoting bacteria and salicylic acid improve essential oil, flower yield, and compatible osmolyte content of common yarrow (*Achillea millefolium* L.) under drought stress. *The Philippine Agricultural Scientist*, 107(3), 215-224. [https:// DOI:10.62550/dq040023](https://doi.org/10.62550/dq040023)

Improving the content of essential oil and active compounds in rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) through spraying L-phenylalanine and induction of drought stress

Marzie Soltani Alikooyi¹, Ali Abbasi Surki^{1*}, Sina Fallah¹, Mehdi Ghasemi Nafchi²

¹ Department of Agriculture, Faculty of Agriculture, Shahrekord University, Shahrekord, Iran

² Department of Horticultural Science, Faculty of Agriculture, Shahrekord University, Shahrekord, Iran

(Received: 2024/11/12, Accepted: 2025/01/27)

Abstract

To investigate the effect of L-phenylalanine on the secondary metabolites of rosemary under drought stress conditions, a factorial experiment was conducted in a completely randomized design with three replications at Shahrekord University, 2021. The first factor involved drought stress at 50% of field capacity compared to normal irrigation, while the second factor examined various concentrations of L-phenylalanine (80 mg/L, 160 mg/L, and 320 mg/L). The findings indicated that drought stress led to a reduction in chlorophyll *a* (36%), chlorophyll *b* (46%), shoot dry weight (14.4%), and essential oil yield (12%), while simultaneously increasing carotenoid levels (114%), PAL enzyme activity (40.6%), phenolic compounds (5.6%), flavonoid compounds (35.5%), and the antioxidant capacity of the extract (5.6%) when normalized against the irrigated control. The application of concentrations ranging from 80 mg/L to 320 mg/L of L-phenylalanine increased chlorophyll *a* content (31 to 41.4%), shoot dry weight (17.7 to 14.7%), PAL enzyme activity (27 to 38.7%), phenolic compounds (12.4 to 13.4%), flavonoid compounds (60 to 69%), antioxidant capacity of the extract (10.5 to 11.5%), essential oil content (6 to 7.5%), and essential oil yield (27%) compared to the control. Due to the lack of significant difference between different concentrations of L-phenylalanine, 80 mg/L is significant as the optimal concentration. The primary constituents of the essential oil were identified as alpha-pinene (11.9%), 1,8-cineole (7.6%), camphor (12.8%), borneol (10.4%), and borneol acetate (12.8%). Drought stress decreased the levels of alpha-pinene, 1,8-cineole, and camphor while increasing those of borneol and borneol acetate. Application of L-phenylalanine resulted in the highest concentrations of alpha-pinene, 1,8-cineole, and camphor at 80 mg/L, whereas the maximum levels of borneol and borneol acetate were observed at 320 mg/L. Consequently, the application of controlled drought stress combined with L-phenylalanine spraying can effectively enhance the secondary metabolites in rosemary extracts and essential oil compounds, thereby improving the antioxidant properties of rosemary extract for potential applications across various industries.

Keywords: Antioxidant, Rosemary, Irrigation, Phenol, Phenylalanine ammonia lyase

Corresponding author, Email: aliabbasis.1359@gmail.com