نشریه علمی ـ پژوهشی اکوفیزیولوژی گیاهان زراعی، جلد دوازدهم، شماره ۲(۴۶)، تابستان ۱۳۹۷، صفحه ۲۱۰-۱۹۱

# واکنش گیاه همیشه بهار (*Calendula officinalis* L.) به آسکوربیک اسید و براسینواستروئید در شرایط تنش خشکی

**خاطره همتی[1*]، علی عبادی[2]، سعید خماری[3] و محمد صدقی[4]**

**تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۴/۸ تاریخ بازنگری: ۱۳۹۶/۳/۱۹ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۶/۷**

## چکیده

تاثیر تنش کم‌آبیاری، براسینواستروئید و آسکوربیک اسید بر رنگیزه‌های فتوسنتزی و برخی از متابولیت‌های سازگاری گل همیشه بهار طی آزمایشی در مزرعه تحقیقاتی و آزمایشگاه دانشگاه محقق اردبیلی در سال ۱۳۹۳ بررسی گردید. آزمایش به‌صورت اسپلیت فاکتوریل در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی در سه تکرار اجرا شد. تیمار تنش کم‌آبیاری در دو سطح (۵۰ میلی متر تبخیر از تشتک تبخیر (شاهد) و ۱۰۰ میلی متر تبخیر از تشتک تبخیر (تنش کم‌آبیاری)) به‌عنوان عامل اصلی و تیمارهای براسینواستروئید ($10^{-7}$، $10^{-8}$ و صفر مولار) و آسکوربیک اسید ( ۱۰ میلی‌مولار و صفر (شاهد)) نیز به‌صورت فاکتوریل به‌عنوان عوامل فرعی در نظرگرفته شدند. نتایج نشان داد که تنش کم‌آبیاری، کاربرد براسینواستروئید و آسکوربیک اسید موجب افزیش درصد اسانس، کربوهیدرات، کاروتنوئیدها و فعالیت آنزیم پلی‌فنل اکسیداز شد. همچنین، تنش آبی، میزان کلروفیل a، b، کلروفیل کل، لیزین و متیونین را کاهش داد. با این حال، کاربرد براسینواستروئید و آسکوربیک اسید توانست آسیب‌های ناشی از تنش را تخفیف داده و میزان کلروفیل‌های a، b و کل را افزایش دهد. کاربرد آسکوربیک اسید در شرایط تنش به جلوگیری از کاهش بیشتر لیزین و متیونین کمک کرد. با توجه به این نتایج، به نظر می‌رسد استفاده از آسکوربیک اسید و براسینواستروئید با کمک به سیستم دفاعی از تخریب کلروفیل‌ها جلوگیری کرده و موجب افزایش تحمل به تنش خشکی شده است. همچنین، به نظر می‌رسد کاربرد براسینواستروئید می‌تواند در بهبود خاصیت دارویی همیشه بهار مؤثر گردد.

**واژگان کلیدی**: رنگدانه‌های فتوسنتزی، پلی‌فنل اکسیداز، لیزین، متیونین و همیشه بهار.

۱- دانشجوی دوره دکتری زراعت، دانشکده کشاورزی، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران.
۲- استاد گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران.
۳- استادیار گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران.
۴- عضو هیئت علمی گروه شیمی، واحد اردبیل، دانشگاه آزاد اسلامی، اردبیل، ایران.
* نگارنده‌ی مسئول khhemati@yahoo.com

## مقدمه

همیشه بهار با نام علمی (*Calendula officinalis* L.) گیاهی یک ساله و علفی است که منشا آن را غرب آسیا و مدیترانه می‌دانند. عصاره آبی این گیاه دارای ویژگی ضدسرطانی است و در درمان ایدز نیز کاربرد دارد (Kavatchev *et al*., 1997).

تنش‌های محیطی به‌ویژه کم‌آبی از عوامل عمده محدودیت تولید گیاهان می‌باشد. گیاهان نیز برای مقابله با تنش‌های محیطی از مکانیسم‌های مختلفی از جمله تغییر در ویژگی‌های مورفولوژیک و همچنین واکنش‌های فیزیولوژیک و بیوشیمیایی استفاده می‌کنند. سازگاری به این تنش‌ها همراه با تغییراتی در مسیرهای متابولیک می‌باشد که از طریق تاثیر بر فعالیت‌های آنزیمی حاصل می‌گردد (Strain and Fletcher, 2003). آسکوربیک اسید از اهمیت ویژه‌ای در فرآیندهای فیزیولوژیک گیاه از جمله تنظیم رشد، تمایز و متابولیسم (Horemans *et al*., 2000) و کاهش بسیاری از رادیکال‌های آزاد ناشی از تنش اکسیداتیو (Smirnoff and Wheeler, 2000) برخوردار است. نقش اساسی آسکوربیک اسید در سیستم دفاعی گیاه حفاظت از واکنش‌های متابولیک در برابر $H_2O_2$ و دیگر مشتقات سمی اکسیژن می‌باشد (Shao *et al*., 2008). کاربرد خارجی آسکوربیک اسید موجب افزایش مقـاومت به تنش خشکی می‌شود (Khalid Hussein and Qader Khursheed, 2014) به‌طوری‌که گزارش شده است کاربرد آسکوربیک اسید در شرایط تنش، غلظت پرولین، کربوهیدرات‌ها و آسکوربیک اسید داخلی را افزایش می‌دهد (Amin *et al*., 2008). میزان کربوهیدرات، پروتئین کل، کلروفیل a و b، کاروتنـوئیدها نیـز در اثر تنش خشکی کاهش می‌یابد و کاربرد آسکوربیک اسید می‌تواند موجب کاهش اثر تنش خشکی بر این پارامترها گردد (Khalid Hussein and Qader Khursheed, 2014). براسینواستروئیدها گروهی از هورمون‌های استروئیدی هستند که در تنظیم جنبه‌های مختلف رشد و توسعه گیاه از جمله رشد طولی سلول، فتومورفوژنز، تمایز آوندی و جوانه‌زنی بذر نقش دارند (Sasse, 2003). با مطالعات ژنتیک مولکولی بر روی موتانت‌های غیرحساس به BR و یا دارای کمبود براسینواستروئید، ضرورت نقش براسینواستروئید در رشد و توسعه گیاهان مشخص و چندین مسیر سیگنالی براسینواستروئید شناسایی شده است (Vert *et al*., 2005; Belkhadir *et al*., 2006). بسیاری از ژن‌های تنظیم‌کننده BR مربوط به رشد و توسعه گیاهان مانند تغییر شکل دیواره سلولی، تشکیل سیتواسکلتون و سنتز هورمون می‌باشند (Vert *et al*., 2005). آزمایش‌های مختلف نشان داده است که کاربرد براسینواستروئید به تنهایی یا به همراه سایر هورمون‌ها موجب افزایش عملکرد محصول و مقاومت به تنش در گیاهان مختلف می‌شود (Divi and Krishna 2009; Peleg and Blumwald 2011). نتایج ظفری و عبادی (Zafari and Ebadi, 2016) نشان داد که کاربرد براسینواستروئید می‌تواند لیزین و متیونین را در برخی از ارقام گلرنگ افزایش دهد.

از ترکیبات اساسی در گیاه همیشه بهار، روغن‌های فرار می‌باشد که در صنعت غذا و دارو استفاده می‌شود (Omidbaighi, 2005). نتایج یک پژوهش نشان داد که عملکرد اسانس تحت تاثیر کاربرد براسینواستروئید افزایش نشان داد (HaghShenas and Skandari, 2011). محمدپور وشوایی و همکاران (MohammadPour

Voshvaie *et al*., 2015) نیز مشاهده کردند که تنش خشکی موجب کاهش درصد اسانس آویشن شد. هدف از این پژوهش بررسی برخی تغییرات فیزیولوژیک و بیوشیمیایی گیاه همیشه‌بهار در اثر کاربرد براسینواستروئید و آسکوربیک اسید تحت تنش کم‌آبی بود.

## مواد و روش‌ها

این آزمایش در سال زراعی ۱۳۹۳ در مزرعه تحقیقاتی و آزمایشگاه دانشگاه محقق اردبیلی انجام گرفت. آزمایش به‌صورت اسپلیت فاکتوریل در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی در سه تکرار اجرا شد. تیمار تنش کم‌آبیاری در دو سطح (شاهد یا آبیاری کامل و تنش آبیاری) به‌عنوان عامل اصلی و تیمارهای براسینواستروئید ($10^{-7}$، $10^{-8}$ و صفر مولار) و اسید آسکوربیک (۱۰ میلی‌مولار) (Pazeki *et al*., 2012; Ronaldo *et al*., 2013) صفر به عنوان شاهد) نیز به‌صورت فاکتوریل به‌عنوان عوامل فرعی در نظرگرفته شدند.

جهت اجرای آزمایش قطعه زمینی مناسب و یکنواخت انتخاب و در بهار پس از آبیاری اولیه اقدام به تهیه زمین شامل شخم، دیسک، ماله و کودپاشی گردید. همچنین، با استفاده از فاروئر ردیف‌هایی با عرض۴۰ سانتی‌متر ایجاد شد. طول هر کرت ۵ متر و عرض آن ۲متر بود. فاصله پشته‌ها ۴۰ سانتی‌مترو در هر کرت پنج خط کشت در نظر گرفته شد. کاشت به‌صورت کپه‌ای با قرار دادن سه تا چهار بذر در هر محل در عمق دوتا سه سانتی‌متر و فاصله ۲۰ سانتی‌متر از یکدیگر انجام گرفت. با احتساب فواصل بوته‌ها از یکدیگر و فاصله خطوط کشت، تراکم ۱۵ بوته در متر مربع به‌دست آمد. پس از کاشت نیز در مرحله ۴-۲ برگی نسبت به تنک نمودن بوته‌ها جهت ایجاد تراکم‌های مورد نظر (با استفاده از شاخص مدرج) اقدام گردید. آبیاری نیز به روش غرقابی با توجه به میزان تبخیر از تشتک تبخیر انجام گرفت و عملیات داشت و کنترل علف‌های هرز به‌صورت دستی برحسب نیاز انجام گرفت. طول دوره رشد ۲۰۰ روز بود و گلدهی ۴۰ تا ۵۰ روز پس از کاشت اتفاق افتاد. زمانی که گلدهی به ۵۰٪ رسید نمونه‌برداری انجام شد.

برای استخراج عصاره حاوی آنزیم‌های آنتی اکسیدان ۰/۳ گرم از بافت گیاهی با افزودن ۲ میلی‌لیتر از بافر استخراج هموژنیزه شد. عصاره حاصل به داخل سانتریفوژ یخچال‌دار منتقل شد و در ۱۵۰۰۰ دور در دقیقه، به مدت ۱۰ دقیقه و در دمای ۴ درجه سلسیوس سانتریفیوژ شد. پس از آماده‌سازی عصاره پروتئینی فعالیت سینتیکی آنزیم پلی‌فنل‌اکسیداز با روش کار و میشرا (Kar and Mishra, 1976) بررسی شد. برای این منظور ۱/۵ میلی‌لیتر بافر تریس با ۰/۴ میلی‌لیتر پیروگالل و ۰/۱ میلی‌لیتر عصاره آنزیمی به خوبی مخلوط و به مدت ۵ دقیقه در بن‌ماری ۲۵ درجه سلسیوس قرار گرفت، منحنی تغییرات جذب در طول موج ۴۲۰ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر قرائت شد. سرانجام فعالیت آنزیمی بر حسب تغییرات واحد جذب در دقیقه به ازای هر میلی گرم پروتئین محاسبه گردید.

برای سنجش کلروفیل‌ها ابتدا ۰/۲ گرم از بافت برگ را با استن ۸۰٪ به تدریج ساییده تا کلروفیل وارد محلول استنی شود و در نهایت حجم محلول با استن ۸۰٪ به ۲۰ میلی‌لیتر رسانده شد. محلول حاصل به مدت ۱۰ دقیقه در ۴۰۰ دور سانتریفوژ شده و سپس جذب نوری محلول رویی در طول موج‌های ۴۷۰، ۶۴۵ و ۶۶۳ نانومتر توسط اسپکتروفتومتر قرائت شد. مقدار

کلروفیل‌ها و کاروتنوئید طبق معادله‌های زیر به دست آمد (Arnon, 1967):

$$Chl\ a= (19.3\times A_{663}-0.86\times A_{645})\ V/100W$$
$$Chl\ b= (19.3\times A_{645}-3.6\times A_{663})V/100W$$
$$Chl\ total= chlorophyll\ a + chlorophyll\ b$$
$$Carotenoids = 100\ (A_{470}) + 3.27(mg\ chl.a) - 104(mg\ chl.b)/227$$

در این فرمول V، حجم محلول استون و W، وزن نمونه گیاهی می‌باشد.

برای اندازه‌گیری کربوهیدرات، ابتدا عصاره الکلی از برگ‌ها تهیه شد. ۰/۵ گرم از بافت برگی در هاون چینی کاملاً هموژن گردید. سپس پنج میلی‌لیتر اتانول ۹۵٪ به آن اضافه و به لوله آزمایش درب‌دار منتقل شده و به مدت ۳۰ ثانیه ورتکس شد. مایع رویی جدا و به لوله‌ی دیگری منتقل شده و سپس دو بار و در هر بار پنج میلی لیتر اتانول ۷۰٪ به بخش جامد باقی‌مانده افزوده و به‌طور کامل شستشو گردید و بخش مایع رویی به لوله آزمایش منتقل شده و در نهایت ۱۵ میلی‌لیتر از عصاره به دست آمد. عصاره‌ی حاصل، به مدت ۱۵ دقیقه با سرعت ۳۵۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. بعد از جداسازی روشناور، میلی لیتر از عصاره‌ی الکلی انتخاب و داخل لوله‌های آزمایشی ریخته شد. سپس سه میلی‌لیتر آنترون تازه تهیه شده به آن اضافه و به مدت ۱۰ دقیقه در حمام آب جوش قرار داده شد. پس از خنک شدن نمونه‌ها در محیط آزمایشگاه، میزان جذب نمونه‌ها در طول موج ۶۲۵ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر خوانده شد (Irigoyen *et al.*, 1992).

برای اندازه‌گیری میزان لیزین و میتونین همیشه‌بهار نمونه‌های برگی در هاون به همراه اسید هیدروکلریدریک ۰/۱ درصد خوب ساییده شده و جهت استخراج لیزین محلول به دست آمده با گلیسرول (۵۰٪)، بافر فسفات و نین‌هیدرین مخلوط شد. سپس در آب جوش ۱۰۰ درجه سلسیوس قرار گرفته و سپس میزان جذب آن در ۵۷۰ نانومتر قرائت گردید. جهت استخراج متیونین به محلول تهیه شده در قسمت بالا با سدیم هیدروکسید (۵ نرمال)، محلول گلیسین آبدار (۵۰٪)، محلول سدیم نیتروفری‌سیانید آبدار (۰/۱٪) و هیدروکلریک‌اسید (۱:۱) اضافه و میزان جذب آن در ۵۱۰ نانومتر خوانده شد (Losak *et al.*, 2010).

تجزیه آماری به‌وسیله نرم‌افزار SAS و SPSS انجام و مقایسه میانگین‌ها نیز به روش دانکن در سطح احتمال ۵٪ انجام شد.

## نتایج و بحث

نتایج تجزیه واریانس نشان داد که اثر متقابل تنش کم‌آبی، براسینواستروئید و آسکوربیک اسید بر میزان کلروفیل a، b و کلروفیل کل معنی‌دار بود (جدول ۱). مقایسه میانگین‌های مربوط به اثر متقابل تیمارهای آزمایشی نشان داد که تنش کم آبیاری موجب کاهش کلرفیل‌ها گردید اما میزان کلروفیل در اثر کاربرد براسینواستروئید و آسکوربیک اسید نسبت به شاهد و شرایط تنش افزایش یافت

بیشترین کلروفیل a (۰/۷۲ میلی‌گرم در گرم وزن تر)، b (۰/۱۹ میلی‌گرم در گرم وزن تر) و کلروفیل کل (۰/۹۱ میلی‌گرم در گرم وزن تر) تحت شرایط بدون تنش و کاربرد ۱۰ میلی‌مولار آسکوربیک اسید و $10^{-7}$ مولار براسینواستروئید مشاهده شد. کمترین میزان کلروفیل‌های a، b و کلروفیل کل به شرایط تنش و عدم کاربرد آسکوربیک اسید و براسینواستروئید تعلق گرفت (شکل ۱، ۲ و ۳).

تنش خشکی می‌تواند منجر به ایجاد تنش اکسیداتیو گردد. در اثر تنش اکسیداتیو انواع اکسیژن فعال تولید شده و افزایش پراکسیداسیون چربی‌ها، خسارت به غشای سلولی، تخریب رنگدانه‌ها و کاهش غلظت کلروفیل b و a اتفاق می‌افتد (Pagter *et al*., 2005). همان‌طورکه در شکل‌های ۱، ۲ و ۳ قابل مشاهده است تنش خشکی به‌شدت از میزان رنگیزه‌های فتوسنتزی کاسته است که با نتایج تعدادی از مطالعات (Massacci *et al*., 2008; Jaleel *et al*., 2008) نیز مطابقت دارد. تاثیر آسکوربیک اسید بر فتوسنتز ممکن است به علت تاثیر بر پایداری و حفظ رنگدانه‌های فتوسنتزی باشد (Khalid Hussein and Qader Khursheed, 2014).

مالیک و اشرف (Malik and Ashraf, 2012) بیان کردند که کاربرد خارجی آسکوربیک اسید به حفظ رنگدانه‌های کلروفیل و کاهش تاثیر تنش خشکی کمک می‌کند. از آن‌جایی که آسکوربیک اسید از فعالیت آنتی‌اکسیدانی جهت پاک‌سازی انواع اکسیژن فعال برخوردار است بنابراین می‌تواند از تخریب کلروفیل جلوگیری کند (Ashraf, 2009). کاربرد آسکوربیک اسید از طریق افزایش هدایت روزنه‌ای تاثیر مخرب تنش خشکی را تعدیل کرده و این موضوع می‌تواند ناشی از نقش آنتی‌اکسیدانی آسکوربیک اسید از طریق خنثی کردن اکسیدان‌های مضر باشد (Malik and Ashraf, 2012).

نتایج احمدی موسوی و همکاران (Ahmadi Mousavi *et al*., 2005) نیز نشان‌دهنده افزایش میزان کلروفیل با کاربرد براسینواستروئید در شرایط تنش خشکی بود. به‌نظر می‌رسد علت افزایش کلروفیل‌ها در اثر کاربرد براسینواستروئید، افزایش مقاومت در برابر تنش اکسیداتیو باشد زیرا براسینواستروئید همانند آسکوربیک اسید دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانی می‌باشد. به‌طوری‌که ازدمیر و همکاران (Ozdamir *et al*., 2004) بیان کردند براسینواستروئید می‌تواند از خسارت به غشاها و ماکرومولکول‌ها جلوگیری کند.

در شرایط تنش خشکی نتایج نشان داد اثر متقابل خشکی، آسکوربیک اسید و براسینواستروئید بر میزان کاروتنوئیدها معنی‌دار بود (جدول ۱). مقایسه میانگین اثرات متقابل نشان داد بیشترین مقدار کاروتنوئید (۵/۲ میلی گرم بر گرم) در تیمارهای $۱۰^{-۷}$ مولار براسینواستروئید و عدم کاربرد آسکوربیک اسید در شرایط تنش مشاهده شد که با کاربرد $۱۰^{-۸}$ مولار براسینواستروئید و ۱۰ میلی‌مولار آسکوربیک اسید تفاوت آماری معنی‌داری نداشت. کمترین مقدار کاروتنوئیدها نیز (۳/۰۲ میلی‌گرم بر گرم) از مصرف $۱۰^{-۷}$ مولار براسینواستروئید و کاربرد ۱۰ میلی‌مولار اسید آسکوربیک در شرایط بدون تنش حاصل شد (شکل ۴). همان‌طورکه در شکل ۴ نشان داده شده است در شرایط بدون تنش با کاربرد براسینواستروئید و آسکوربیک اسید میزان کاروتنوئید کاهش یافت. از آن‌جایی‌که آسکوربیک اسید و براسینواستروئید هر دو از آنتی‌اکسیدان‌ها هستند، بنابراین به نظر می‌رسد از طریق ایجاد تعادل در میزان اکسیدان‌ها نیاز به کاروتنوئید را کاهش می‌دهند. اما در شرایط تنش افزایش کاروتنوئید با کاربرد براسینواستروئید و آسکوربیک اسید قابل مشاهده بود. کاروتنوئیدها از سیستم‌های آنتی‌اکسیدان غیرآنزیمی می‌باشند که در کاهش آسیب‌های ناشی از تنش اکسیداتیو نقش داشته (Prochazkova *et al*., 2001) و قادر هستند مستقیماً اکسیژن رادیکال ($O^-$) را مهار و غیرفعال کنند. همچنین، در چرخه زانتوفیل باعث مصرف

انواع اکسیژن فعال شوند (Koyro, 2006). بنابراین، افزایش این ماده در شرایط تنش می‌تواند به محافظت کلروفیل‌ها و کلروپلاست کمک کرده باشد.

امین و همکاران (Amin *et al*, 2008) بیان کردند که کاربرد آسکوربیک اسید موجب افزایش کاروتنوئیدها می‌گردد. این ماده محلول در آب می‌باشد و در محافظت از کاروتنوئیدها و توکوفرول نقش مهمی ایفا می‌کند (Hong and Vierling, 2000). به نظر می‌رسد تاثیر آسکوربیک اسید در افزایش کاروتنوئیدها به همین دلیل باشد. براسینواستروئید نیز با کمک به افزایش سنتز کاروتنوئیدها موجب مهار انواع اکسیژن فعال می‌شود (Khan *et al*., 2012) به طوری‌که نتایج نشان می‌دهد کاربرد براسینواستروئید موجب افزایش کاروتنوئید در شرایط تنش شده است. نتایج آزمایش لی و همکاران (Li *et al*., 1998) نیز نشان‌دهنده افزایش فعالیت سوپراکسیددیسموتاز، کاتالاز، پراکسیداز و کاروتنوئیدها در اثر کاربرد براسینواستروئید در شرایط تنش کم‌آبی بود.

فعالیت آنزیم پلی‌فنل اکسیداز تحت تاثیر تیمارهای آزمایشی قرار گرفت (جدول ۱). با توجه به شکل (۵) در اثر عدم کاربرد براسینواستروئید و آسکوربیک اسید در شرایط تنش و نرمال کمترین میزان فعالیت آنزیم پلی‌فنل اکسیداز قابل مشاهده بود. اما کاربرد براسینواستروئید و آسکوربیک اسید و ترکیب این دو تنظیم‌کننده رشد موجب افزایش فعالیت آنزیم شد. به‌طوری‌که، در شرایط تنش شدید و کاربرد ۱۰ میلی‌مولار آسکوربیک اسید و $۱۰^{-۷}$ مولار براسینواستروئید بیشترین میزان فعالیت پلی‌فنل اکسیداز مشاهده شد.

آنزیم پلی‌فنل اکسیداز هیدرولاسیون مونو فنول‌ها را به دی فنول‌ها کاتالیز می‌کند. همچنین این آنزیم اکسیداسیون دی‌فنول‌ها را به کوئینون‌ها که در پلیمریزاسیون رنگ‌دانه‌ها نقش دارند، کاتالیز می‌کند (Turkan, 2011). تغییرات میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان از جمله پلی‌فنل اکسیداز در شرایط تنش کمبود آب گزارش شده است (Tavakoli Hasanaklou, 2013). با توجه به افزایش فعالیت پلی‌فنل اکسیداز در اثر کاربرد براسینواستروئید و آسکوربیک اسید به نظر می‌رسد این دو ماده نقش ویژه‌ای در حفاظت گیاه در برابر تنش اکسیداتیو دارند. کاربرد آسکوربیک اسید می‌تواند یک راهبرد برای بهبود تحمل تنش‌های غیرزنده باشد. اثرات متقابل تنش خشکی × آسکوربیک اسید، تنش خشکی × براسینواستروئید و براسینواستروئید × آسکوربیک اسید در مورد کربوهیدرات معنی‌دار شد (جدول ۱). با توجه به شکل (۶a) کاربرد براسینواستروئید در شرایط تنش توانست موجب افزایش کربوهیدرات گردد. اما در مورد کاربرد براسینواستروئید و عدم کاربرد آن در شرایط بدون تنش تفاوت آماری معنی‌دار مشاهده نشد. همچنین، کاربرد آسکوربیک اسید در شرایط تنش و نرمال موجب افزایش کربوهیدرات گردید. اما بیشترین میزان کربوهیدرات (۱/۰۲ میلی‌گرم بر گرم) به کاربرد آسکوربیک اسید در شرایط تنش تعلق گرفت و کمترین میزان آن (۰/۵۸ میلی‌گرم بر گرم) مربوط به عدم کاربرد براسینواستروئید و شرایط بدون تنش بود (شکل ۶b). با توجه به شکل (۶ c) اثر ترکیب براسینواستروئید با آسکوربیک اسید نیز موجب افزایش کربوهیدرات شد به‌طوری‌که با افزایش غلظت این دو ماده بر میزان کربوهیدرات افزوده شد و با کاربرد $۱۰^{-۷}$

مولار براسینواستروئید و ۱۰ میلی‌مولار آسکوربیک اسید بیشترین میزان کربوهیدرات مشاهده شد و کمترین میزان آن به عدم کاربرد این دو تنظیم کننده رشد تعلق گرفت.

کربوهیدرات به‌عنوان تنظیم‌کننده‌های اسمزی، موجب افزایش پایداری غشاها و حفظ تورژسانس سلول‌ها می‌شود. در حقیقت، افزایش کربوهیدرات در گیاهان تحت تنش در برقراری آماس و جلوگیری از پلاسمولیز مؤثر است (Slama *et al*., 2007). همچنین، کربوهیدرات با تأمین متابولیت α- گلوتارات با افزایش بیوسنتز پرولین که یکی از مهم‌ترین اسیدآمینه‌های ضد تنش است به افزایش مقاومت به تنش کمک می‌کند (Irigoyen *et al*., 1992) و این امر به تنظیم اسمزی و حفاظت از پروتئین‌های غشا و برخی از آنزیم‌های سیتوسولی در گیاه تحت تنش کمک می‌کند. همچنین، به لحاظ تأمین بخشی از انرژی تولید ترکیب‌های نیتروژن‌دار در بالا بردن آستانه تحمل گیاه تحت تنش مؤثر هستند (Ramak *et al*., 2004). بنابراین، افزایش کربوهیدرات در شرایط تنش برای حفاظت از گیاه ضروری به نظر می‌رسد. ممکن است افزایش کربوهیدرات در زمان تنش به علت سنتز این ترکیبات از مسیرهای غیر فتوسنتزی و تخریب سایر کربوهیدرات‌های بزرگ باشد (Ghorbani and Niakan, 2005).

خالدحسین و قادرخورشید (Khalid Hussein and Qader Khursheed, 2014) بیان کردند کاربرد آسکوربیک اسید می‌تواند میزان کربوهیدرات را در شرایط تنش خشکی افزایش دهد. به‌نظر می‌رسد که آسکوربیک اسید با محافظت از کلروفیل‌ها به افزایش کربوهیدرات کمک کرده است (Ebrahimian and Bybordi, 2012). پژوهش‌های لی و فنگ (Li and Feng, 2011) نیز تاثیر مثبت براسینواستروئید را در افزایش کربوهیدرات نشان داد. آنها اعلام کردند که کاربرد براسینواستروئید موجب افزایش تحمل به تنش خشکی می‌شود.

اثر متقابل آسکوربیک اسید × تنش و آسکوربیک اسید × براسینواستروئید در مورد لیزین معنی‌دار شد (جدول ۱). تنش کم‌آبیاری موجب کاهش میزان لیزین شد و کاربرد آسکوربیک اسید در شرایط تنش نیز موجب کمتر شدن میزان لیزین گردید (شکل ۷). همچنین، برهمکنش براسینواستروئید و آسکوربیک اسید نیز به افزایش لیزین انجامید. به‌طوری‌که، با افزایش غلظت این مواد بر میزان لیزین افزوده شد. بیشترین میزان لیزین (۳/۱۱ میکروگرم بر گرم) در اثر کاربرد $10^{-7}$ مولار براسینواستروئید و ۱۰ میلی‌مولار آسکوربیک اسید قابل مشاهده بود و کمترین میزان آن (۱/۸ میکروگرم بر گرم) مربوط به کاربرد ۱۰ میلی‌مولار آسکوربیک اسید و عدم کاربرد براسینواستروئید بود (شکل ۷). لیزین یکی از اسید امینه‌هایی است که در شرایط تنش خشکی شکسته شده و به اسمولیت‌هایی که در تحمل به تنش نقش دارند، تبدیل می‌شود (Tavakoli Hasanaklou *et al*., 2014). به‌طوری که، لیزین، پیش ماده اصلی سه متابولیت مهم می‌باشد که عبارتند از پرولین (Hare and Cress, 1997)، امینو بوتیریک اسید (منتقل کننده سیگنال مربوط به تنش) (Baum *et al*., 1996) و آرژنین که پیش‌ماده پلی‌آمین‌ها و نیتریک اکسید است (Klessig *et al*., 2000).

نتایج کلانتر احمدی (Kalantar ahmadi, 2014) نیز نشان‌دهنده تاثیر کاهنده آسکوربیک اسید بر لیزین در شرایط تنش بود. اما پژوهش وی نشان داد که در شرایط تنش میزان متیونین در

اثر کاربرد آسکوربیک اسید افزایش می‌یابد. با توجه به افزایش لیزین در شرایط بدون تنش و با کاربرد براسینواستروئید و آسکوربیک اسید به نظر می‌رسد گیاه در شرایط نرمال به موادی که از لیزین سنتز می‌شوند، نیاز کمتری داشته و افزایش این ماده می‌تواند موجب افزایش فتوسنتز گردد. به‌طوری‌که، لیزین در ساختمان روبیسکو نقش دارد (Parry *et al*., 1999).

نتایج نشان داد که اثر متقابل تنش ×آسکوربیک اسید و براسینواستروئید× آسکوربیک اسید بر متیونین معنی‌دار شد (جدول ۱). تنش و کاربرد آسکوربیک اسید موجب کاهش متیونین گردید به‌طوری‌که کمترین میزان متیونین (۰/۲۱ میکروگرم بر گرم) در اثر کاربرد ۱۰ میلی‌مولار آسکوربیک اسید در شرایط تنش مشاهده شد و بیشترین مقدار آن (۰/۱۳ میکروگرم بر گرم) به شرایط تنش و عدم کاربرد آسکوربیک اسید تعلق گرفت (شکل ۸). درحالی‌که براسینواستروئید بر میزان متیونین در حضور آسکوربیک اسید افزود و بیشترین میزان آن (۰/۱۹ میکروگرم بر گرم) به کاربرد $۱۰^{-۷}$ مولار براسینواستروئید و عدم مصرف آسکوربیک اسید تعلق یافت و کمترین متیونین (۰/۱۳ میکروگرم بر گرم) به کاربرد ۱۰ میلی‌مولار آسکوربیک اسید و عدم کاربرد براسینواستروئید تعلق گرفت (شکل ۸).

رادیکال سوپراکسید که یکی از انواع اکسیژن فعال می‌باشد قادر است، اسید آمینه‌های متیونین، هیستیدین و تریپتوفان را اکسید نموده و یکی از دلایل افزایش میزان سوپراکسید ایجاد تنش اکسیداتیو در اثر تنش خشکی می‌باشد (Breusegem *et al*. 2001). اما تجزیه متیونین در شرایط تنش موجب تبدیل آن به پلی‌آمین‌ها شده (Alirezaie *et al*., 2012) و باعث افزایش توان دفاعی گیاه در برابر کمبود آب می‌گردد. پلی آمین‌ها، پلی‌کاتیون‌های مهمی هستند که در مراحل مختلف فیزیولوژیک نقش داشته و عمدتاً موجب تعادل اسمزی و pH سلولی می‌شوند (Martin-Tanguy, 2001). نتایج پژوهش‌های توکلی و همکاران (Tavakoli *et al*., 2014) نیز نشان‌دهنده‌ی کاهش میزان متیونین در اثر تنش خشکی بود. به نظر می‌رسد که در شرایط تنش، گیاه برای افزایش تحمل متیونین بیشتری را به سایر متابولیت‌های دفاعی تبدیل کرده و از این طریق مقاومت خود را در برابر تنش خشکی افزایش می‌دهد.

نتایج نشان‌دهنده تاثیر معنی‌دار تنش خشکی و براسینواستروئید بر درصد اسانس و عملکرد اسانس بود (جدول ۱). مطابق شکل ۹ کاربرد براسینواستروئید موجب افزایش درصد اسانس در شرایط مطلوب و تنش شد، به‌طوری‌که در شرایط بدون تنش و کاربرد $۱۰^{-۷}$ مولار براسینواستروئید بیشترین میزان (۵/۲) درصد اسانس قابل مشاهده بود اما تنش موجب کاهش درصد اسانس شد و کمترین میزان آن به عدم کاربرد براسینواستروئید و شرایط تنش خشکی تعلق یافت. با این حال عملکرد اسانس در شرایط بدون تنش و با افزایش غلظت براسینواستروئید افزایش یافت به‌طوری‌که بیشترین میزان عملکرد اسانس در شرایط بدون تنش و کاربرد ۱۰۷ مولار براسینواستروئید قابل مشاهده بود و کمترین عملکرد اسانس نیز به شرایط تنش و عدم کاربرد براسینواستروئید تعلق گرفت (شکل ۱۰)

با توجه به این که گیاه همیشه بهار یک گیاه دارویی می‌باشد افزایش میزان ترکیبات دارویی آن دارای اهمیت می‌باشد. همانند نتایج این پژوهش، حق‌شناس و اسکندری ( HaghShenas and

Skandari, 2011) نیز نشان دادند که عملکرد اسانس تحت تاثیر کاربرد براسینواستروئید افزایش می‌یابد و محمدپور و همکاران (Mohammadpour *et al*., 2015) نیز مشاهده کردند که تنش خشکی موجب کاهش درصد اسانس آویشن شد. باید در نظر داشت که همواره با افزایش تنش، درصد اسانس افزایش نمی‌یابد، چرا که در تنش‌های شدید، گیاه مقدار زیادی از مواد فتوسنتزی خود را صرف تولید ترکیبات تنظیم‌کننده اسمزی نظیر پرولین، گلیسین بتائین و ترکیبات قندی همانند ساکاروز، فروکتوز و فروکتان می‌کند تا بتواند وضعیت لازم برای ادامه حیات خود را در این وضعیت فراهم کند (Shahmoradi, 2003). این ترکیبات هزینه‌بر است و گیاه این هزینه را از طریق کاهش عملکرد تامین می‌کند (Munns, 1993).

نتایج نشان داد که اثر متقابل تنش خشکی و براسینواستروئید در مورد وزن خشک بوته معنی‌دار بود (جدول ۱). وزن خشک بوته با افزایش شدت تنش کاهش یافت اما کاربرد براسینواستروئید موجب افزایش آن گردید به طوری‌که در شرایط بدون تنش و کاربرد $۱۰^{-۷}$ مولار براسینواستروئید بیشترین میزان ماده خشک بوته مشاهده شد و کمترین میزان آن به شرایط تنش و عدم کاربرد براسینواستروئید تعلق گرفت (شکل ۱۱). ترکیباتی مانند براسینواستروئید که خواص آنتی‌اکسیدانی دارند (Haubrick and Assmann, 2006) با افزایش توانایی آنتی اکسیدانی گیاه توانایی کم کردن خسارت تنش خشکی را دارند، مقداری از خسارات تنش خشکی در غشای سلول یک سدی برای تولید رادیکال‌های آزاد است. توانایی براسنواستروئید در افزایش تحمل به تنش خشکی، پایداری غشا، افزایش بیوماس، عملکرد و اجزای عملکرد توسط سایر پژوهشگران مشخص شده است (Sairam, 1994).

## نتیجه‌گیری کلی

نتایج نشان داد که تنش کم‌آبی، کاربرد براسینواستروئید و آسکوربیک اسید موجب افزیش کربوهیدرات، کاروتنوئیدها و فعالیت آنزیم پلی‌فنل اکسیداز شد. همچنین، تنش خشکی منجر به کاهش درصد اسانس، لیزین، متیونین، کلروفیل a، b و کلروفیل کل شد. در حالی که استفاده از براسینواستروئید و آسکوربیک اسید از آسیب‌های ناشی از تنش کاسته و میزان کلروفیل a، b و کلروفیل کل را افزایش داد. با این حال، در شرایط تنش، آسکوربیک اسید به کاهش بیشتر لیزین و متیونین کمک کرد. با توجه به نتایج این پژوهش، به نظر می‌رسد برهمکنش براسینواستروئید و آسکوربیک اسید می‌تواند با افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان و تنظیم‌کننده‌های اسمزی از جمله کربوهیدرات‌ها از آسیب‌های ناشی از تنش خشکی بکاهد و ممکن است از طریق افزایش سیستم دفاعی موجب کاهش تخریب کلروفیل‌ها شده و به افزایش فتوسنتز کمک کند. همچنین، افزایش درصد اسانس در اثر کاربرد براسینواستروئید نشان می‌دهد احتمالاً این ماده می‌تواند به افزایش خاصیت دارویی گیاه همیشه بهار کمک کند.

**جدول ۱**- نتایج تجزیه واریانس تاثیر برخی از تنظیم‌کننده‌های رشد بر صفات فیزیولوژیک همیشه بهار در شرایط تنش خشکی

**Table 1-** Analysis of variance of the effect of some growth regulators on physiological traits of spring wheat under drought stress conditions

| منابع تغییرات S.O.V. | درجه آزادی df | کربوهیدرات carbohydrate | کاروتنوئیدها cartenoids | کلروفیل کل Total chlorophyll | کلروفیل b Chlorophyll b | کلروفیل a Chlorophyll a |
|---|---|---|---|---|---|---|
| بلوک block | 2 | 0.0011 ns | 519×10-5 ns | 6×10-5 ns | 1×10-7 ns | 14×10-5 ns |
| تنش خشکی Drought stress (D.S) | 1 | 0.68** | 11.23* | 0.525** | 0.049** | 0.248** |
| خطای اصلی | 2 | 0.002 ns | 0.02 ns | 0.0002 ns | 1×10-5 ns | 27×10-5 ns |
| براسینواستروئید brassinostroid (Br) | 2 | 0.069** | 0.165* | 0.0208** | 0.0028** | 0.0078** |
| اسید آسکوربیک Acid Ascorbic (AS) | 1 | 0.107** | ns0.0002 | 0.156** | 0.0038** | 0.0042** |
| D.S* Br | 2 | 0.043** | 1.59** | 0.0002 ns | 61×10-5** | 0.0007 ns |
| D.S* AS | 1 | 0.019** | 0.08 ns | 0.003* | 13×10-5 ns | 0.0042** |
| Br* AS | 2 | 0.0057* | 0.43 ** | 0.002** | 83×10-5** | 55×10-5 ns |
| D.S* Br* AS | 2 | 0.001 ns | 0.28** | 0.0044** | 55×10-5** | 0.0019** |
| خطا error | 20 | 0.0001 | 0.3 | 0.0003 | 8×10-5 | 45×10-5 |
| ضریب تغییرات CV (٪) | | 5.4 | 4.9 | 2.75 | 6.5 | 3.7 |

**، * و ns به ترتیب نشان دهنده معنی‌داری در سطح احتمال ۱٪ و ۵٪ و غیرمعنی‌دار.

**, * and ns indicate the significance at the probability level of 1%, 5% and non-significant

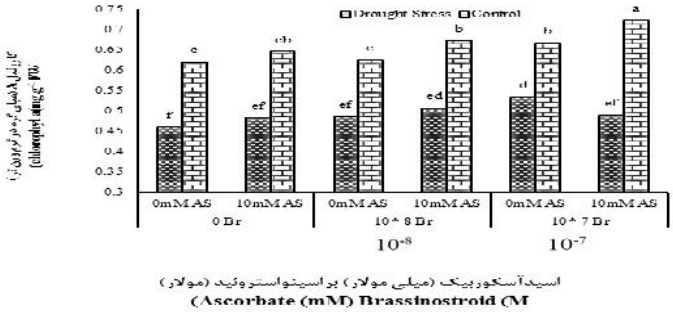
**ادامه جدول ۱**

**Table 1-** Continued

| منابع تغییرات S.O.V. | درجه آزادی df | متیونین methionin | لیزین lysin | پلی‌فنل اکسیداز ppo | درصد اسانس Essence pressentage |
|---|---|---|---|---|---|
| بلوک block | 2 | 2×10-5 ns | 0.16** | 668338* | 0.026ns |
| تنش خشکی Drought stress (D.S) | 1 | 0.02** | 2.4** | 38915986** | 2.83** |
| خطای اصلی | 2 | 0.0001 ns | 0.032 ns | 39460 ns | 0.27ns |
| براسینواستروئید brassinostroid (Br) | 2 | 0.005** | 2.5** | 18403258** | 1.69* |
| اسید آسکوربیک Acid Ascorbic (AS) | 1 | 0.003** | 0.37 ns | 25168419** | 1.65* |
| D.S* Br | 2 | 17×10-5 ns | 0.018 ns | 3461380** | 1.19* |
| D.S* AS | 1 | 0.0004* | 2.5** | 157 ns | 0.21ns |
| Br* AS | 2 | 0.0006** | 0.4* | 3658985** | 0.008ns |
| D.S* Br* AS | 2 | 16×10-5 ns | 0.131 ns | 1664516** | 0.06ns |
| خطا error | 20 | 87×10-5 | 0.095 | 188719 | 0.29 |
| ضریب تغییرات CV (٪) | | 5.4 | 12 | 6.14 | 12.5 |

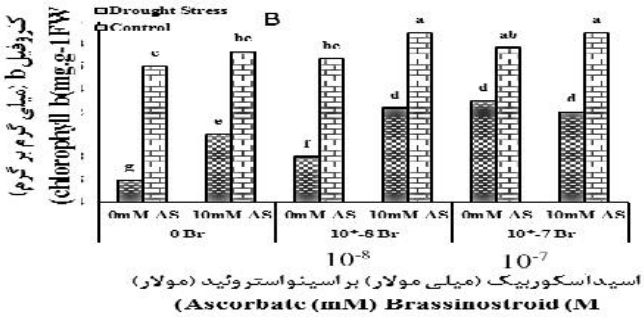
**، * و ns به ترتیب نشان دهنده معنی‌داری در سطح احتمال ۱٪ و ۵٪ و غیرمعنی‌دار

**, * and ns indicate the significance at the probability level of 1%, 5% and non-significant



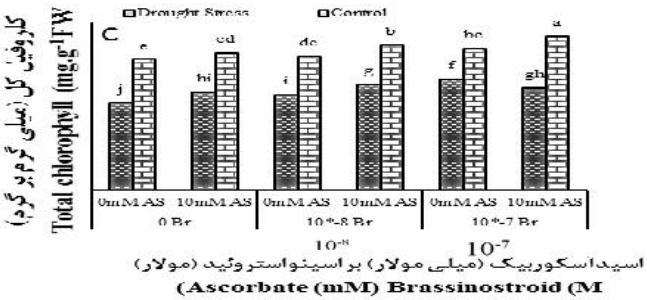

**شکل ۱**- تاثیر کاربرد براسینواستروئید و اسید آسکوربیک بر میزان کلروفیل a در شرایط تنش خشکی

**Figure 1-** Effect of brassinosteroid and ascorbic acid on the chlorophyll a under water dificit condition



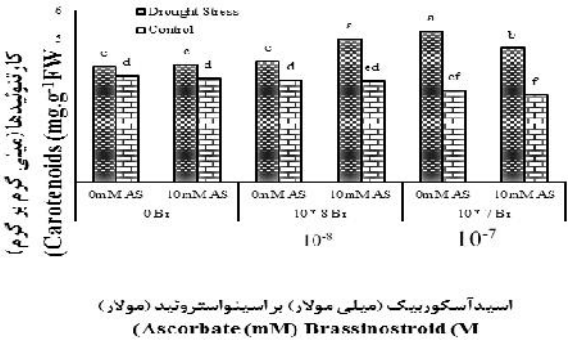

**شکل ۲**- تاثیر کاربرد براسینواستروئید و اسید آسکوربیک بر میزان کلروفیل b در شرایط تنش خشکی

**Figure 2-** Effect of brassinosteroid and ascorbic acid on the chlorophyll b under water dificit condition



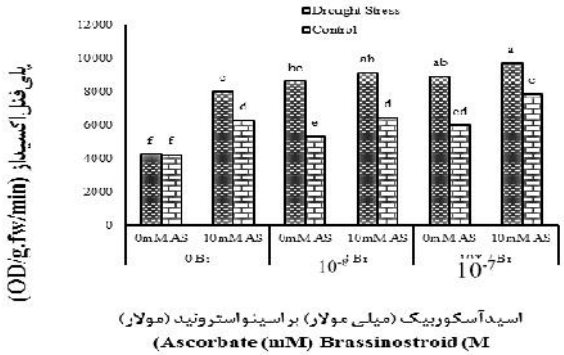

**شکل ۳**- تاثیر کاربرد براسینواستروئید و اسید آسکوربیک بر میزان کلروفیل کل در شرایط تنش خشکی

**Figure 3-** Effect of brassinosteroid and ascorbic acid on the total chlorophyll under water dificit condition



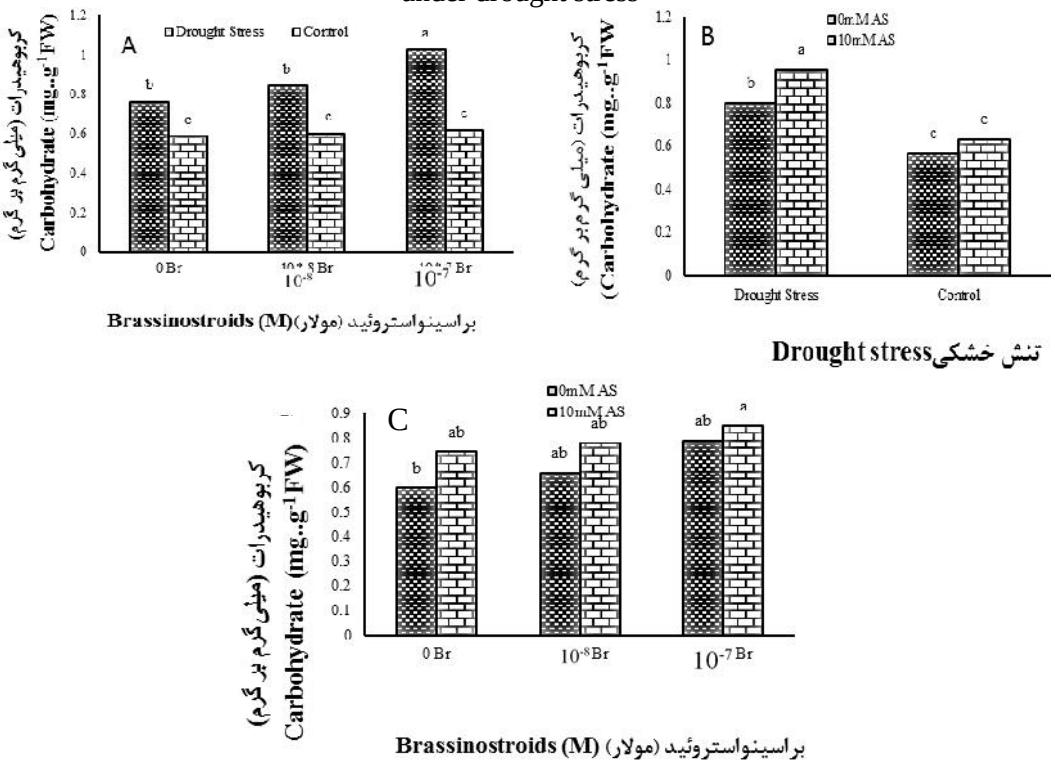

**شکل ۴**- تاثیر کاربرد اسید آسکوربیک و براسینواستروئید بر محتوای کاروتنوئیدها در شرایط تنش خشکی

**Figure 4-** Effect of Ascorbic acid and brassinosteroid on caretenoids content under drought stress condition



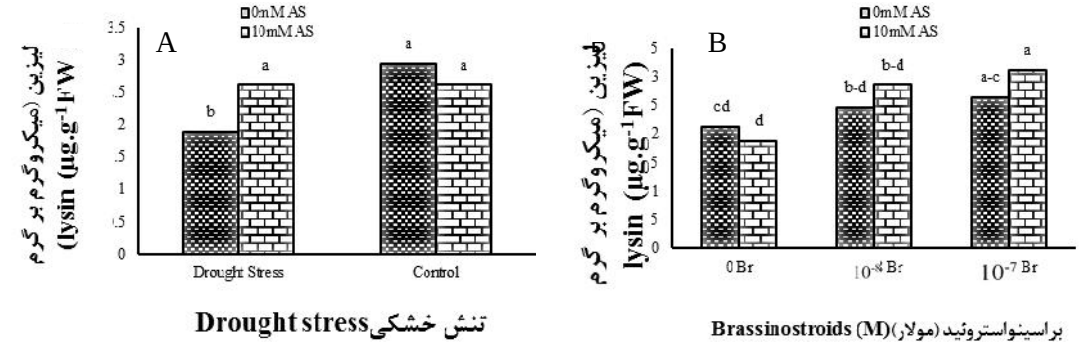

**شکل ۵**- تاثیر کاربرد اسید آسکوربیک، و براسینواستروئید بر فعالیت پلی فنل اکسیداز در تنش خشکی

**Figure 5-** Effect of Ascorbic acid and brassinosteroid on the polyphenol oxidase activity under drought stress



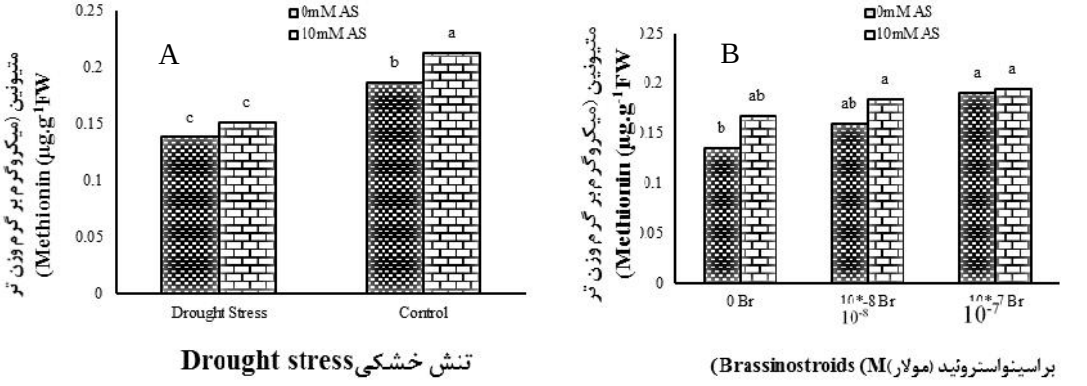

**شکل ۶**- تاثیر کاربرد براسینواستروئید (A)، اسید آسکوربیک (B) و براسینواستروئید و اسید آسکوربیک (C) بر محتوای کربوهیدرات در شرایط تنش خشکی

**Figure 6-** Effect of brassinosteroid (A) Ascorbic acid (B) and brassinosteroid and ascorbic acid (C) on carbohydratecontent under drought stress



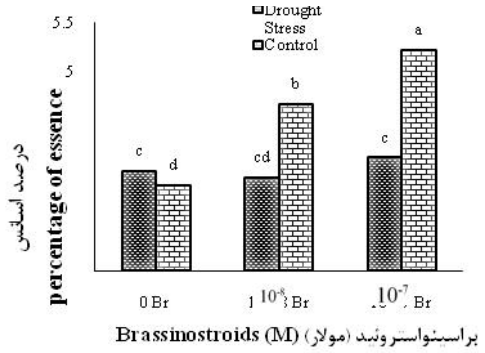

**شکل ۷**- اثر کاربرد اسید آسکوربیک (A) و براسینواستروئید و اسید آسکوربیک (B) بر محتوای لیزین در شرایط تنش خشکی

**Figure 7-** Effect of ascorbic acid (A) and ascorbic acid and brassinosteroid (B) on lysin content under drought stress



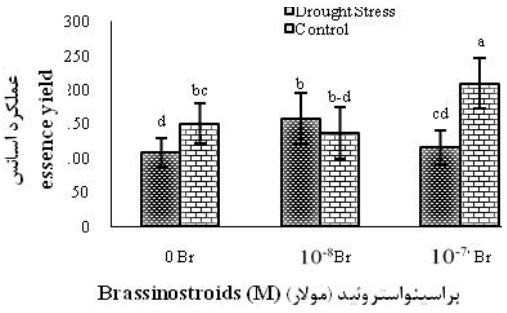

**شکل ۸**- اثر کاربرد اسید آسکوربیک (A) و براسینواستروئید و اسید آسکوربیک (B) بر تغییرات متیونین در شرایط تنش خشکی

**Figure 8-** Effect of ascorbic acid (A) and Ascorbic acid and brassinosteroid (B) on methionin content under drought stress condition



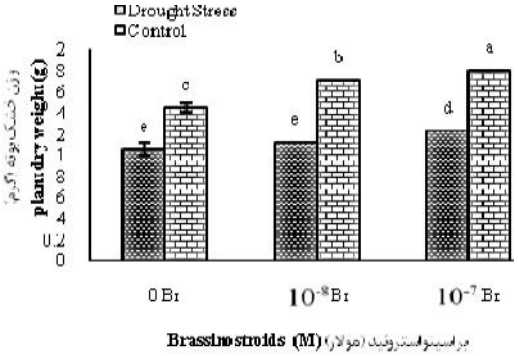

**شکل ۹**- اثر تنش خشکی و براسینواستروئید بر درصد اسانس

**Figure 9-** Effect of drought stress and brassinosteroid on percentage of essence




**شکل ۱۰**- اثر تنش خشکی و براسینواستروئید بر عملکرد اسانس

**Figure 10**- Effect of drought stress and brassinosteroid on essence yield




**شکل ۱۱**- اثر تنش خشکی و براسینواستروئید بر ماده خشک بوته

**Figure 11-** Effect of drought stress and brassinosteroid on plant dry weight

## References منابع مورد استفاده


- Ahmadi Mousavi, E., Kh. ManoukhehriKalantari, and M. Torkzadeh. 2005. Effects of 24-epibrassinolide on lipid peroxidation, prolin, sugar and photosynthesis pigments content of colza (*Brassica napus* L.) under water stress. *Iranian Journal of Botany.* 18(4): 295-306 (In Persian).
- Alirezaie, K., S. Jahanbakhsh Ghode Kahriz, J. Razmju., L. Faravardeh, and A. Ebadi. 2012. Assess lysine and methionine in the two disease resistant and susceptible species under of, wheat yellow rust (*Puccinia striiformis* f.sp. tritici) stress. The 17th Iranian National & 5th International Biology Conference, 1-6 September, Shahid Bahonar Kerman University, Iran. (In Persian).
- Amin, A., E.S.M. Rashad, and F. Gharib. 2008. Changes in morphological, physiological and reproductive characters of wheat plants as affected by foliar application with salicylic acid and ascorbic acid. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences.* 2: 252-261.
- Arnon, A.N. 1967. Method of extraction of chlorophyll in the plants. *Agronomy Journal.* 23: 112-121.
- Ashraf, M. 2009. Biotechnological approach of improving plant salt tolerance using antioxidants as markers. *Bitechnology Advances.* 27: 84-93.
- Baum, G., S. Lev-Yadun, Y. Fridmann, T. Arazi, H. Katsenelson, M. Zik, and H. Fromm. 1996. Calmodulin binding to glutamate decarboxylase is required for regulation of glutamate and GABA metabolism and normal development in plants. *EMBO Journal*. 15: 2988-2996.
- Belkhadir, Y., X. Wang, and J. Chory. 2006. Brassinosteroid signaling pathway. Sci STKE. 364P
- Breusegem, F.V., E. Vranova., J.F. Dat, and D. Inze. 2001. The role of active oxygen species in plant signal transduction. *Plant Science*. 161: 405-414.
- Divi, U.K., and P. Krishna. 2009. Brassinosteroid: a biotechnological target for enhancing crop yield and stress tolerance. *Nature Biotechnology.* 26:131–136
- Ebrahimian, E., and A. Bybordi. 2012. Influence of ascorbic acid foliar application on chlorophyll, flavonoids, anthocyanin and soluble sugar contents of sunflower under conditions of water deficit stress. *Journal of Food, Agriculture and Environment*, 10: 1026-1030.
- Ghorbani, M., and M. Niakan. 2005. Effect of drought stress on soluble sugar, protein and proline contain, phenolic component and nitrate reductase enzyme activity in ghorghan coltivar3 of soybean. *Journal of Science Kharazmi University*. 50:537-549. (In Persian)
- Haghshenas, J., and M. Eskandari. 2011. Growth parameters and essential oil percentage changes of dill (*Anethum graveolens*) as affected by drought stress and use of 28-homobrassinolide. *Journal of Plant Ecophysiology.* 3: 29-41 (In Persian)
- Hare, P.D., and W.A. Cress. 1997. Metabolic implications of stress-induced proline accumulation in plants. *Plant Growth Regulation.* 21: 79-102
- Haubrick, L.L., and S.M. Assmann, 2006. Brassinosteroids and plant function: some clues, more puzzles. *Plant, Cell and Environment*. 29: 446-457.

- Hong, S.W., and E. Vierling. 2000. Mutants of *Arabidopsis thaliana* defective in the acquisition of tolerance to high temperature stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 97(8): 4392-4397.
- Horemans, N.H., C. Foyer, G. Potters, and H. Asard. 2000. Ascorbate function and associated transport systems in plants. *Plant Physiology and Biochemistry*. 38: 531-540.
- Irigoyen, J.J., D.W. Emerich, and M. Sanchez-Diaz. 1992. Water stress inducedchanges in concentrations of proline and total soluble sugars in nodulated alfalfa (*Medicago sativa* L.) plants. *Plant Physiology*. 84: 55-60.
- Jaleel, C., P. Manivannan, G. Lakshmanan, M. Gomathinayagam, and R. Panneerselvam. 2008. Alterations in morphological parameters and photosynthetic pigment responses of *Catharanthus roseus* under soil water deficits. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 61(2): 298-303.
- Kalantarahmadi, A. 2014. Ecophysiological study of some invironmental stresses, growth regulators and micro-nutrients on agronomic and qualitative characteristics of canola in north of Khouzestan. Ph.D Thesis. University of Mohaghegh Ardabili. (In Persian).
- Kar, M., and D. Mishra. 1976. Catalase, peroxidase and polyphenol oxidase activities during rice leaf senescence. *Plant Physiology*. 578: 315-319.
- Kavatchev, Z., R. Walder, and D. Garzoro. 1997. Anti HIV activity of extracts from calendula. *BioMed Pharmaceutical*. 51(4): 176-180.
- Khalid Hussein, Z., and M. Qader Khursheed. 2014. Effect of foliar application of ascorbic acid on growth, yield components and some chemical constituents of wheat under water stress conditions. *Jordan Journal of Agricultural Sciences.* 10: 1-15.
- Khan, N.A., R. Nazar, N. Iqbal, and N.A. Anjum. 2012. Phytohormones and abiotic stress tolerance in plants. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. 311p
- Klessig, D.F., J. Durner, R. Noad, D.A. Navarre, D. Wendehenne, D. Kumar, J.M. Zhou, J. Shah, S. Zhang, and P. Kachroo. 2000. Nitric oxide and salicylic acid signaling in plant defense. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 97: 8849-8855.
- Koyro, H.W. 2006. Effect of salinity on growth, photosynthesis, water relations and solute composition of potential cash crop halophyte (*Plantago coronopus* L.). *Environmental and Experimental Botany*. 56: 136-149.
- Li, K.R., and C.H. Feng. 2011. Effects of brassinolide on drought resistance of *Xanthoceras sorbifolia* seedlings under water stress. *Acta Physiological Plantarum*. 33: 1293–1300
- Li, L., J. van Staden, and A.K. Jager. 1998. Effects of plant growth regulators on the antioxidant system in seedlings of two maize cultivars subjected to water stress. *Journal of Plant Growth Regulation*. 25:81–87
- Losak, T., J. Hlusek, R. Filipcik, L. Pospisilova, J. Manasek, K. Prokes. 2010. Effect of nitrogen fertilization on metabolism of essential and non-essential amino acids yield-grown grain maize (*Zea mays* L). *Plant Soil Environment*. 56: 574-579.

- Malik, S., and M. Ashraf. 2012. Exogenous application of ascorbic acid stimulates growth and photosynthesis of wheat (*Triticum aestivum* L.) under drought. *Soil and Environment.* 31 (1): 72-77.
- Martin-Tanguy, J. 2001. Metabolism and function of polyamines in plants: recent development (new approaches). *Plant Growth Regulation*. 34: 135-148.
- Massacci, A., S. Nabiev, L. Pietrosanti, S. Nematov, T. Chernikova, K. Thor, and J. Leipner. 2008. Response of the photosynthetic apparatus of cotton (*Gossypium hirsutum*) to the onset of drought stress under field conditions studied by gas-exchange analysis and chlorophyll fluorescence imaging. *Plant Physiology and Biochemistry*. 46(2):189-195.
- MohammadPour Voshvaie, R., M. Ghloy, M. Ramroodi, and B. Fakheri. 2015. Effect of drought stress and biological fertilizers on the growth, yield and essence component of thyme (*Thymus vulgaris* L.). *Journal of Agroecology*. 7( 2): 237-253
- Munns, R. 1993. Physiological process limiting plant growth in saline soil: some dogmass and hypotheses. *Plant Cell and Environment*. 16: 15-24.
- Omidbaigi, R. 2005. Production and processing of medicinal plants. Behnashr Publication, Mashhad, Iran. (In Persian)
- Ozdamir, F., M. Bor, T. Demiral, and I. Turkan. 2004. Effects of 24-epibrassinolide on seed germination, seedling growth, lipid peroxidation, proline content and antioxidative system of rice (*Oriza sativa* L.) under salinity stress. *Plant Growth Regulation*. 42: .203-211.
- Pagter, M., C. Bragato, and H. Brix. 2005. Tolerance and physiological responses of phragmites australis to water deficit. *Aquatic Botany*. 81:285-299.
- Parry, M.A.J., J. Loveland, and P.J. Andralojc. 1999. Regulation of Rubisco. In: Brayant, J., Burrel, M., Kruger. N., eds. Plant carbohydrate biochemistry. Oxford. BIOS Scientific Publishers Ltd. 127-145
- Pazeki, A., H. Rezaie, D., Habibi, and F. Paknejad. 2012. Effect of drought stress, ascorbat and giberlin sperey on some morphological subjects, RWC and membrance stability in thyme plant (*Thymus vulgaris* L.). *Journal of Agronomy and Plant Breading*. 8(1): 1-13. (In Persian)
- Peleg, Z. and E. Blumwald. 2011. Hormone balance and abiotic stress tolerance in crop plants. *Current Opinion in Plant Biology*. 14:290–295
- Prochazkova, D., R. Sairam., G. Srivastava, and D. Singh. 2001. Oxidative stress and antioxidant activity as the basis of senescence in maize leaves. *Plant Science*. 161(4): 765-771.
- Ramak, P., R. Khavari Nejad, H. Hydari SharifAbad, and M. Rafiee. 2004. Effect of water stress on unstuctural carbohydrate in *Onobrychis viciifolia* and *Onobrychis radiate* species. *Iranian Journal of Rangelands Forests Plant Breading*. 3(12): 317-327. (In Persian).
- Ronaldo, J.D.D., PP. Hildete., S. Ladaslav, and R.B.H Claudia. 2013. 24-epibrassinolide restores nitrogen metabolismof pigeon pea under saline stress. *Botanical Studies*. 54: 9- 15.
- Sairam, R.K. 1994. Effects of homobrassinolide application on plant metabolism and grain yield under irrigated and moisturestress conditions of two wheat varieties, *Plant Growth Regulation*. 14: 173–181.

- Sasse, J.M. 2003. Physiological actions of brassinosteroids: an update. *Plant Growth Regulation*. 22:276-288.
- Shao, H.B., L.Y. Chu, C.A. Jaleel, and C.X. Zhao. 2008. Water deficit stress-induced anatomical changes in higher plants. *Comptes Rendus Biologies*. 331: 215-225
- Slama, I., T. Ghnaya, K. Hessini, D. Messedi, A. Savoure, and C. Abdelly. 2007. Comparative study of the effects of mannitol and PEG osmotic stress on growth and solute accumulation in *Sesuvium portulacastrum*. *Environmental and Experimental Botany*. 61:10–17.
- Smirnoff, N., and G.L. Wheeler. 2000. Ascorbic acid in plants: biosynthesis and function. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*. 35: 291-314.
- Strain, D., and J. Fletcher. 2003. Plant ascorbic: acid chemistry, function, metabolism, bioavailability and effects of processing. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 80: 825-850.
- Tavakoli Hasanaklou, H., A. Ebadi, and S. Jahanbakhsh, 2014. Study of some tolerance mechanisms to water dificit stress in bread wheat genotypes (*Triticum aestivum* L.). *Cereal Research*. 4(1): 13-21. (In Persian).
- Tavakoli Hassanaklou, H. 2013. Effect of water deficit onsome metabolits chenges of wheat genotypes. Msc Thesis. University of Mohaghegh Ardabili. (In Persian).
- Turkan, I. 2011. Plant responses to drought and salinity stress, Development in a post-Genomic era. Advances in Botanical Research, 593p.
- Vert, G., JL. Nemhauser, N. Geldner, F. Hong, and J. Chory. 2005. Molecular mechanisms of steroid hormone signaling in plants. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*. 21: 177-201.
- Zafari, M., and A. Ebadi, 2016. Effects of water strass and brassinosteroid (24-epibrassinolide) on changes of some amino acids and pigments in safflower (*Cartamus tinctorius* L.). *Journal of Current Research in Science*. 1:711-715.

# The Response of Pot Marigold Plant (*Calendula officinalis* L.) to Ascorbic Acid and Brassinosteroid under Drought Stress

**Khatereh Hemmati[1]*, Ali Ebadi[2], Saeed Khomari[3], and Mohammad Sedghi[4]**

*Received: June 2016 , Revised: 9 June 2017, Accepted: 29 August 2018*

## Abstract

To evaluate water deficit stress, brassinosteroid and ascorbic acid effects on photosynthetic pigments and some pot marigold's compatible solutes, an experiment was conducted at the experimental field and labratory of university of Mohaghegh Ardabili in 2014. A factorial split experiment based on completely randomized design with three replications were used. Water deficit was induced by two levels of water stress (50 and 100 mm evaporation from class A pan) considered as main factor and brassinosteroid (0, $10^{-8}$ and $10^{-7}$ M) and ascorbic acid (0 and 10 mM) as sub factors. Results showed that water deficit, brassinosteroid and ascorbic acid increased soluble sugars, carotenoids and polyphenol oxidase activity. Water deficit decreased the rate of a, b and total chlorophylls, lysine and methionine. However, application of brassinosteroid and ascorbic acid decreased water deficit effects and increased the rate of a, b and total chlorophylls. Ascorbic acid application under stress condition increased the rate of lysine and methionine. Considering these results it can concluded that ascorbic acid and brassinosteroid increase marigold tolerance to water shortage by enhancing defensive system and prevention of photosynthetic pigments destruction. It seems application of brassinosteroid can improve medicinal particularity of marigold.

**Key words**: Lysine, Marigold, Methionine, Photosynthetic pigments, Polyphenol oxidase,.

1- Ph.D. Student, Department of Agronomy and Plant Breeding, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran.
2- Prof., Faculty of Agricultural science, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran.
3- Assistant Prof., Faculty of Agricultural science, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran.
4- Department of Chemistriy, Ardabil Branch, Islamic Azad University, Ardabil, Iran.
* *Corresponding Author: khhemati@yahoo.com*