دوماهنامه علمی-پژوهشی تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران شناسه دیجیتال (DOI): 10.22092/ijmapr.2017.105627.1734
جلد ۳۳، شماره ۳، صفحه ۵۰۸-۴۹۲ (۱۳۹۶)

مطالعه اثر تنش خشکی بر صفات فیزیولوژیک و عملکردی همیشه‌بهار (*Calendula officinalis* L.)

مهدی ابراهیمی[1*]، غلامرضا زمانی[2] و زهره علیزاده[3]

۱*- نویسنده مسئول، دانش‌آموخته دکترا در رشته زراعت، گروه پژوهشی گیاهان دارویی، جهاد دانشگاهی خراسان جنوبی، ایران

پست الکترونیک: mahdiebrahimi@birjand.ac.ir

۲- دانشیار، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بیرجند، ایران

۳- استادیار، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بیرجند، ایران

تاریخ دریافت: فروردین ۱۳۹۵ تاریخ اصلاح نهایی: اسفند ۱۳۹۵ تاریخ پذیرش: اردیبهشت ۱۳۹۶

چکیده

با توجه به اهمیت گیاه دارویی همیشه‌بهار (*Calendula officinalis* L.) در صنایع مختلف ازجمله داروسازی، در این مطالعه تأثیرات تنش خشکی بر برخی صفات فیزیولوژیک و عملکردی این گیاه دارویی بررسی شد. این آزمایش در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی با ۳ تکرار طی سال‌های ۹۴-۱۳۹۳ در گلخانه تحقیقاتی دانشکده کشاورزی بیرجند انجام شد. فاکتورهای مورد مطالعه شامل تنش خشکی در چهار سطح (به‌ترتیب ۸۰، ۶۰، ۴۰ و ۲۰ درصد آب قابل‌استفاده خاک) و دو تیپ گیاه همیشه‌بهار (تیپ دارویی و تیپ زینتی) بود. نتایج آزمایش نشان داد که با افزایش تنش، از میزان فعالیت آنزیم آسکوربات پروکسیداز کاسته شد و فعالیت دو آنزیم سوپراکسیددسموتاز و کاتالاز نیز در ابتدا افزایش و بعد کاهش یافت. تجمع بیش‌ازحد گونه‌های اکسیژن فعال (ROS) و ناکارآمدی سیستم آنتی‌اکسیدانی گیاه در مواجهه با آن احتمالاً دلیل کاهش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در بالاترین سطح تنش بوده‌است. میزان پرولین با افزایش تنش افزایش یافت، به‌طوری‌که در بالاترین سطح تنش از ۴ برابر شاهد نیز بیشتر بود. با افزایش خشکی، میزان کاروتنوئیدها، کلروفیل a و b نیز به‌دلیل خسارت به غشاهای کلروپلاستی کاهش یافت. تنش خشکی علاوه‌بر خسارت به غشاء سلولی که سبب افزایش میزان MDA شد، کارایی فتوسیستم II را نیز کاهش داد. تنش خشکی همچنین وزن خشک (۲۷٪)، ارتفاع (۳۲٪)، تعداد شاخه جانبی (۳۳٪)، تعداد گل (۵۰٪) و عملکرد گل (۶۰٪) همیشه‌بهار را نیز کاهش داد. همچنین مشخص شد که پتانسیل تولید گل تیپ دارویی همیشه‌بهار (۸۲۴/۳ کیلوگرم در هکتار) از تیپ زینتی آن (۶۵۴/۹ کیلوگرم در هکتار) بیشتر است. در کل می‌توان نتیجه گرفت که سیستم آنتی‌اکسیدانی آنزیمی همیشه‌بهار از توانایی خوبی برای کاهش اثرات نامطلوب تنش خشکی برخوردار است. از این‌رو چنانچه فعالیت آنتی‌اکسیدانی همیشه‌بهار به نحوی افزایش یابد، احتمالاً توانایی این گیاه برای کاهش اثرات ناشی از تنش خشکی افزایش یافته و ممکن است منجر به بهبود عملکرد آن شود.

واژه‌های کلیدی: گونه‌های اکسیژن فعال، غشاء سلولی، پرولین، مالون دی‌آلدهید، عملکرد گل.

مقدمه

همیشه‌بهار (*Calendula officinalis* L.) گیاهی علفی، یک‌ساله و بندرت دو ساله با ساقه منشعب و سفت می‌باشد که منشأ آن نواحی مدیترانه‌ای بوده و به خانواده آستراسه تعلق دارد (Omidbeigi, 2000). انجام مطالعات گسترده در زمینه خواص دارویی همیشه‌بهار، تأثیرات مثبت این گیاه را در بسیاری از موارد ازجمله خواص آنژیوژنیک (Parente *et al*., 2011)، اثرات ضد درد (Behtash *et al*., 2010)، خواص ضدالتهابی (Preethi *et al*., 2009)، اثرات ضد ورم و استسقاء (Zitterl-Eglseer *et al*., 1997)، اثرات ضدمیکربی و باکتریایی (Goyal & Mathur, 2011)، تأثیر بر سرطان سینه (Pommier *et al*., 2004)، اثرات ضد سمّیت (Barajas-Farias *et al*., 2006) و محافظت کبدی (Preethi *et al*., 2009)، اثرات ضدویروسی (Bogdanova *et al*., 1970)، اثرات ضد ایدز (Kalvatchev *et al*., 1997)، بهبود سکته قلبی (Ray *et al*., 2010)، اثرات آنتی‌اکسیدانی (Braga *et al*., 2009) و بهبود زخم (Parente *et al*., 2012) به اثبات رسانده است.

بیش از ۴۵٪ زمین‌های کشاورزی جهان در معرض تنش خشکی دائم یا مکرر قرار دارند که ۳۸٪ جمعیت جهان در محدوده آن زندگی می‌کنند (Ashraf & Foolad, 2007). ازجمله دلایلی که تنش‌های محیطی ازجمله خشکی رشد و توانایی فتوسنتزی گیاه را کاهش می‌دهند، اختلال در تعادل بین تولید و حذف رادیکال‌های آزاد اکسیژن است که منجر به تجمع گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) و القای تنش اکسیداتیو، خسارت به پروتئین‌ها، لیپیدهای غشاء و سایر اجزای سلولی می‌شود (Fu & Huang, 2001). یکی از مکانیزم‌های دفاعی در مقابل تنش‌های گوناگون، تولید ترکیب‌های آنتی‌اکسیدان است. در واقع گیاهان با افزایش قابلیت روبش گونه‌های اکسیژن فعال از طریق آنزیم‌ها و مولکول‌های آنتی‌اکسیدان، از خود محافظت می‌کنند (Yildiz Aktas *et al*., 2007). مطالعات زیادی در این زمینه نشان داده‌اند که فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان با مقاومت گیاه به تنش‌های غیر زنده همبستگی دارد. از این‌رو می‌توان به پاسخ گندم (Hasheminasab *et al*., 2012) و برنج (Sharma & Dubey, 2004) به تنش خشکی اشاره کرد.

با وجود مطالعات گسترده‌ای که در مورد تنش‌های محیطی بر رشد و عملکرد گیاهان زراعی انجام شده است، اطلاعات در مورد واکنش گیاهان دارویی به این تنش‌ها بسیار اندک است (Amiri Deh Ahmadi *et al*., 2014).

با وجود بررسی اثر تنش خشکی بر برخی از صفات مورفولوژیک، فیزیولوژیک و عملکردی همیشه‌بهار ازجمله عملکرد گل (Metwally *et al*., 2013؛ Rahmani *et al*., 2009)، وزن خشک، وزن هزاردانه و عملکرد دانه (Rahmani *et al*., 2009)، وزن و تعداد طبق (Mousavi *et al*., 2012)، قطر طبق و تعداد دانه در طبق (Amoon *et al*., 2014) و نیز واکنش آنتی‌اکسیدانی این گیاه به سایر تنش‌های محیطی مثل شوری (Chaparzadeh *et al*., 2004)، اطلاعات اندکی در ارتباط با پاسخ آنتی‌اکسیدانی این گیاه دارویی به تنش اکسیداتیو ناشی از خشکی در دسترس است (Sedghi *et al*., 2012). از این‌رو در این مطالعه سعی شده است تا علاوه‌بر بررسی صفات فیزیولوژیکی و عملکردی همیشه‌بهار، جنبه‌هایی از مقاومت این گیاه دارویی که عمدتاً به توانایی آنتی‌اکسیدانی این گیاه در مواجهه با خشکی مربوط می‌شود نیز مورد مطالعه قرار گیرد.

مواد و روش‌ها

نحوه اجرای آزمایش

آزمایش به‌صورت فاکتوریل و در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی در گلخانه تحقیقاتی دانشکده کشاورزی دانشگاه بیرجند در سال ۹۴-۱۳۹۳ انجام شد. تیمارهای آزمایشی تحت تأثیر دو عامل نوع گیاه و تنش خشکی بودند و ۳ تکرار

نیز برای آنها در نظر گرفته شد. سطوح فاکتور تنش خشکی به‌ترتیب عبارت بودند از: حفظ رطوبت در ۸۰ (شاهد بدون تنش)، ۶۰ (تنش ملایم)، ۴۰ (تنش متوسط) و ۲۰ (تنش شدید) درصد آب قابل استفاده خاک. تعیین میزان رطوبت ظرفیت زراعی خاک (Field Capacity) با استفاده از روش صفحات فشاری (Richards & Fireman, 1943) انجام شد و نقطه پژمردگی دائم (Permanent Wilting Point) نیز معادل نصف ظرفیت زراعی در نظر گرفته شد (Hargreaves & Merkley, 1998). در این روش میزان رطوبتی که بین نقطه پژمردگی دائم و ظرفیت زراعی خاک قرار دارد در واقع همان آب قابل دسترس گیاه خواهد بود. دو نوع بذر گل همیشه‌بهار شامل تیپ دارویی (کم پَر) و تیپ زینتی (پُر پَر) از شرکت پاکان بذر اصفهان خریداری و در گلدان‌های پلاستیکی حاوی ۶/۷۵ کیلوگرم خاک کشت شدند و در هر تکرار ۸ گلدان قرار گرفتند. آبیاری روزانه گلدان‌ها پس از کاشت به‌صورت کامل و بر مبنای ظرفیت زراعی با وزن کردن هر گلدان انجام شد و این روال تا زمان اطمینان از استقرار مناسب بوته‌های مورد نظر ادامه یافت و بعد تنش خشکی اعمال گردید. حفظ رطوبت در حد مورد نظر با وزن کردن روزانه گلدان‌ها و افزودن میزان آب لازم برای دستیابی به هر یک از سطوح خشکی انجام شد و تا پایان دوره رشد گیاهان نیز ادامه یافت. میانگین درجه حرارت روز و شب در گلخانه به‌ترتیب ۲۵ و ۱۸ درجه سانتی‌گراد و رطوبت نسبی هوا نیز ۴۰٪ تنظیم شد. گلدان‌ها بر روی سکوهای متحرک فلزی با ارتفاع حدود ۱ متر از سطح زمین و در شرایط نور طبیعی داخل گلخانه قرار گرفته بودند.

اندازه‌گیری صفات مورد مطالعه

به‌منظور تعیین میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی، میزان رنگیزه‌های فتوسنتزی، غلظت پرولین و میزان مالون دی‌آلدهید (MDA)، پس از اینکه ۵۰٪ بوته‌های هر تیمار وارد مرحله گلدهی شدند، از هر واحد آزمایشی، آخرین برگ کاملاً توسعه‌یافته یکی از بوته‌ها که قبلاً به‌طور تصادفی انتخاب شده بود جدا گردید و بلافاصله داخل فویل آلومینیومی در ازت مایع قرار داده شد و بعد به فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد منتقل گردید. نمونه‌های برگی سپس با استفاده از ازت مایع در داخل هاون چینی کاملاً پودر شدند و با توجه به میزان مورد نیاز برای سنجش موارد مختلف در ویال‌های جداگانه‌ای قرار گرفته و دوباره در فریزر نگهداری شدند.

تعیین میزان پراکسیداسیون غشاء (آزمون MDA)

برای سنجش میزان پروکسیداسیون غشاء، غلظت مالون دی‌آلدهید به‌عنوان محصول نهایی این واکنش سنجیده شد. ۲۰۰ میلی‌گرم از نمونه‌های پودر شده گیاهی در محلول ۱۰٪ تری‌کلرو استیک اسید ساییده شد و پس از سانتریفیوژ کردن نمونه‌ها، به یک میلی‌لیتر بخش شناور رویی حاصل، تیوباربیتوریک اسید ۰/۲۵٪ افزوده شده و مخلوط حاصل در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ دقیقه قرار گرفت و بعد بلافاصله در یخ سرد شد. دانسیته نوری نمونه‌ها در طول موج ۵۳۲ و ۶۰۰ نانومتر تعیین گردید. میزان MDA با استفاده از ضریب جذب ثابت $۱۵۵ mM^{-1}cm^{-1}$ و تفاوت جذب در دو طول موج ذکرشده طبق رابطه زیر محاسبه شد (Health & Packer, 1968).

$$\text{MDA equivalents } (nm.ml^{-1}) = [(A532-A600)/155000]10^{6}$$

در رابطه بالا، A۵۳۲ نشان‌دهنده حداکثر جذب کمپلکس TBA-MDA، A۶۰۰ تصحیح کدورت غیراختصاصی و ۱۵۵۰۰۰ ضریب خاموشی مولار برای MDA است.

آنتی‌اکسیدان‌های آنزیمی

به‌منظور سنجش فعالیت آنتی‌اکسیدان‌های آنزیمی، ابتدا پروتئین تام از بافت‌های گیاهی استخراج و بعد غلظت پروتئین

در نمونه‌های مورداستفاده برای سنجش فعالیت آنتی‌اکسیدان‌های آنزیمی با استفاده از روش Bradford (۱۹۷۶) تعیین شد. میزان جذب محلول‌های استاندارد ساخته شده با پروتئین خالص (BSA) در طول موج ۵۹۰ نانومتر اندازه‌گیری شد و از اعداد بدست‌آمده برای ترسیم نمودار استاندارد پروتئین استفاده شد.

با قرار دادن میزان غلظت‌های استاندارد پروتئین روی محور yها و میزان جذب متناظر آن روی محور xها و برازش یک نمودار خطی بر نقاط بدست‌آمده، معادله خطی به‌صورت زیر بدست آمد که از آن برای محاسبه میزان پروتئین استفاده شد.

$$y=1152.8x-0.0314$$

برای محاسبه میزان پروتئین در هر یک از نمونه‌ها، به بافر استخراج حاوی نمونه گیاهی بافر برادفورد اضافه و میزان جذب محلول بدست‌آمده در طول موج ۵۹۰ نانومتر قرائت شد. با جایگذاری عدد مربوط به میزان جذب نمونه در معادله خط بدست‌آمده از نمودار استاندارد پروتئین، غلظت پروتئین نمونه برحسب میکروگرم بر میکرولیتر بدست آمد.

سوپر اکسید دیسموتاز (SOD)

میزان فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز (SOD) به روش فتوشیمیایی (Giannopolitis & Ries, 1977) تعیین شد. در این روش یک واحد فعالیت SOD به‌صورت مقدار آنزیم مورد نیاز برای ۵۰٪ بازدارندگی احیاء NBT در طول موج ۵۶۰ نانومتر تعیین می‌شود.

برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز (SOD)، نمونه‌های منجمد شده (۲۰۰ میلی‌گرم وزن تر)، در ۳ میلی‌لیتر بافر HEPES-KOH (pH=۷/۸) حاوی ۰/۱ میلی‌مول EDTA ساییده و بعد با سرعت ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ شدند (تمامی این مراحل در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد انجام شد). از بخش شناور رویی بدست‌آمده برای سنجش فعالیت آنزیم با روش فتوشیمیایی (Giannopolitis & Ries, 1977) استفاده گردید. سپس ۳ میلی‌لیتر مخلوط واکنش حاوی بافر HEPES-KOH (pH=۷/۸) ۵۰ میلی‌مولار، ۰/۱ میلی‌مولار EDTA، ۵۰ میلی‌مولار Na_2CO_3 (pH=۱۰/۲)، ۱۲ میلی‌مولار L–متیونین، ۷۵ میکرومولار NBT، یک میکرومولار ریبوفلاوین و ۳۰۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی تهیه شد. لوله‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در معرض نور قرار گرفتند و بعد دانسیته نوری آن توسط اسپکتروفتومتر در ۵۶۰ نانومتر قرائت گردید. یک واحد فعالیت SOD برابر مقدار آنزیم مورد نیاز برای مهار ۵۰٪ احیاء نیترو بلو تتروزولیوم بروماید (NBT) در نظر گرفته شد (Giannopolitis & Ries, 1977).

درنهایت به‌منظور تعیین میزان فعالیت آنزیم SOD از رابطه زیر استفاده شد:

$$\text{میزان فعالیت } SOD = \left(\frac{IH \times 1000}{50 \times mg\ protein}\right)$$

در رابطه فوق، IH درصد مهار احیاء NBT است. در زمان آماده‌سازی مخلوط واکنش، در یکی از کوت‌ها تمامی اجزاء مخلوط واکنش ازجمله عصاره آنزیمی ریخته شد و در کوت دیگر بجای عصاره آنزیمی، به همان میزان مخلوط استخراج اضافه گردید. در این زمان کوت‌ها داخل دستگاه اسپکتروفتومتر قرار گرفته و میزان جذب در طول موج ۵۶۰ نانومتر قرائت شد. کوت‌ها سپس به مدت ۱۰ دقیقه در مجاورت نور فلورسنت قرار گرفته و دوباره میزان جذب در طول موج ۵۶۰ نانومتر قرائت شد. اختلاف میزان جذب بین دو اندازه‌گیری تحت عنوان تغییرات جذب در طول موج ۵۶۰ نانومتر در نظر گرفته شد و IH با استفاده از رابطه زیر محاسبه گردید.

$$IH = \frac{\text{(تغییرات جذب در طول موج 560 نانومتر بدون آنزیم – تغییرات جذب در طول موج 560 نانومتر بدون آنزیم)}}{\text{تغییرات جذب در طول موج 560 نانومتر بدون آنزیم}}$$

کاتالاز (CAT)

به‌منظور اندازه‌گیری فعالیت آنزیم کاتالاز (CAT)، نمونه‌های منجمد شده (۲۰۰ میلی‌گرم وزن تر)، در ۳ میلی‌لیتر بافر فسفات سدیم ۲۵ میلی‌مولار (pH=۶/۸) ساییده و با سرعت ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ شد (این مراحل در ۴ درجه سانتی‌گراد انجام شد). از بخش شناور رویی حاصل برای سنجش فعالیت کاتالاز (CAT) استفاده شد. در ادامه ۳ میلی‌لیتر مخلوط واکنش حاوی بافر فسفات سدیم ۲۵ میلی‌مولار (pH=۶/۸)، ۱۰ میلی‌مولار H_2O_2 و عصاره آنزیم تهیه گردید و بعد روند واکنش با کاهش جذب در ۲۴۰ نانومتر در مدت ۳۰ ثانیه دنبال شد. فعالیت آنزیم برحسب تغییرات جذب به نسبت پروتئین عصاره بیان گردید (Cakmak & Horst, 1991). میزان فعالیت آنزیم CAT با استفاده از رابطه زیر محاسبه شد:

$$\text{میزان فعالیت } CAT = \left(\frac{\text{جذب ابتدایی – جذب انتهایی}}{mg\ protein}\right) \times 2000$$

به‌منظور تعیین میزان جذب ابتدایی و انتهایی در رابطه فوق، یک کوت حاوی بافر واکنش آنزیم SOD و H_2O_2 را داخل دستگاه اسپکتروفتومتر قرار داده و به آن عصاره آنزیمی استخراج‌شده را اضافه کردیم و بلافاصله میزان جذب را در طول موج ۲۴۰ نانومتر قرائت کردیم (جذب ابتدایی). سپس حدود ۳۰ ثانیه صبر کرده و دوباره میزان جذب را در همان طول موج قرائت کردیم (جذب انتهایی). اختلاف بین میزان جذب انتهایی و ابتدایی صورت کسر رابطه فوق بود. فعالیت آنزیم بر حسب تغییرات جذب به نسبت میلی‌گرم پروتئین عصاره بیان شد.

آسکوربات پروکسیداز (APX)

برای سنجش فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز (APX) ۲۰۰ میلی‌گرم از نمونه منجمد شده را در ۳ میلی‌لیتر بافر فسفات پتاسیم ۵۰ میلی‌مولار (pH=۶) حاوی ۰/۱ میلی‌مولار EDTA ساییده و بعد با سرعت ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ شد (تمامی مراحل فوق در ۴ درجه سانتی‌گراد انجام شد). بخش شناور رویی حاصل به‌منظور سنجش فعالیت APX استفاده گردید. ۳ میلی‌لیتر مخلوط واکنش شامل بافر فسفات پتاسیم ۵۰ میلی‌مولار (pH=۶) حاوی ۰/۱ میلی‌مولار EDTA، ۰/۵ میلی‌مولار آسکوربیک اسید، ۱ میلی‌مولار H_2O_2 و ۲۰۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی تهیه و اکسیداسیون آسکوربات در طول موج ۲۹۰ نانومتر به مدت یک دقیقه سنجیده شد. فعالیت آنزیم برحسب تغییرات جذب به نسبت میلی‌گرم پروتئین عصاره بیان گردید (Nakano & Assada, 1981). تعیین میزان فعالیت آنزیم APX با استفاده از رابطه زیر انجام شد:

$$\text{میزان فعالیت } APX = \left(\frac{\left(\text{جذب ابتدایی – جذب انتهایی}\right) * 20}{mg\ protein * 2.8}\right)$$

هنگامی که به کوت حاوی بافر واکنش آنزیم APX و H_2O_2 که در داخل محفظه دستگاه اسپکتروفتومتر قرار گرفته بود، عصاره آنزیمی اضافه شد، واکنش اکسیداسیون آسکوربات

آغاز گردید و میزان جذب در طول موج ۲۹۰ نانومتر بلافاصله قرائت و به‌عنوان جذب ابتدایی در نظر گرفته شد. پس از گذشت ۱ دقیقه از شروع واکنش و با توجه به اینکه با اکسیداسیون آسکوربات، میزان جذب کاهش می‌یابد، میزان جذب قرائت‌شده عدد کوچکتری خواهد بود که به‌عنوان جذب انتهایی در نظر گرفته شد. برای تعیین میزان فعالیت آنزیم APX، ضریب جذب ۲/۸ میلی‌مول بر سانتی‌متر می‌باشد. فعالیت آنزیم بر حسب تغییرات جذب به نسبت میلی‌گرم پروتئین عصاره بیان شد.

آنتی‌اکسیدان‌های غیر آنزیمی

کاروتنوئیدها

تعیین غلظت کاروتنوئیدها به‌عنوان یکی از عوامل دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانی، مطابق روش Arnon (۱۹۴۹) انجام شد. اندازه‌گیری غلظت کلروفیل a و b نیز با همین روش انجام شد. برای این منظور، میزان ۰/۵ گرم از نمونه‌های برگی که قبلاً پودر شده بود برداشته شد و بعد ۲۰ میلی‌لیتر استون ۸۰٪ به آن اضافه گردید. سپس نمونه در دستگاه سانتریفیوژ با سرعت ۶۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه قرار گرفت و عصاره جداشده فوقانی حاصل از این کار به بالن شیشه‌ای منتقل شد. مقداری از نمونه داخل بالن در کووت اسپکتوفتومتر ریخته شد و بعد به‌طور جداگانه در طول موج‌های ۶۶۳ نانومتر برای کلروفیل a، ۶۴۵ نانومتر برای کلروفیل b و ۴۷۰ نانومتر برای کاروتنوئیدها، دانسیته نوری (OD) قرائت گردید. در پایان با استفاده از رابطه‌های زیر، میزان کلروفیل a، کلروفیل b و کاروتنوئیدها برحسب میلی‌گرم بر گرم وزن تر نمونه بدست آمد.

$$\text{Chlorophyll a} = (19.3 * A663 - 0.86 * A645)\ V/100W$$

$$\text{Chlorophyll b} = (19.3 * A645 - 3.6 * A663)\ V/100W$$

$$\text{Carotenoides} = 100(A470) - 3.27(\text{mg chl. a}) - 104(\text{mg chl. b})/227$$

در رابطه‌های بالا، V حجم محلول فوقانی حاصل از سانتریفیوژ، A جذب نور در طول موج‌های مورد نظر و W وزن تر نمونه برحسب گرم است.

پرولین

برای تعیین مقدار پرولین، از روش Bates و همکاران (۱۹۷۳) استفاده شد و غلظت پرولین بر حسب میلی‌گرم بر گرم بافت تازه، با استفاده از منحنی استاندارد تعیین شد. در معادله خط بدست‌آمده از منحنی استاندارد پرولین که در زیر آمده است، چنانچه میزان جذب (OD) نمونه گیاهی بجای متغیر X جایگذاری شود، غلظت پرولین در ۰/۲ گرم از نمونه تازه بافت برگ بدست می‌آید که پس از تبدیل در نهایت برحسب میلی‌گرم در هر گرم بافت تازه گزارش شده‌است. برای تعیین غلظت پرولین برحسب میلی‌گرم در هر گرم بافت تازه برگ باید عدد بدست‌آمده از معادله منحنی را در ۵ ضرب کرد.

$$y=60.485x + 0.8583$$

فلورسانس کلروفیل

اندازه‌گیری شاخص‌های مرتبط با فلورسانس کلروفیل برای تعیین نسبت Fv/Fm با استفاده از دستگاه استرس‌سنج انجام شد. پارامتر Fv/Fm نشان‌دهنده حداکثر کارایی کوانتومی فتوسیستم II بوده و شاخص مهمی برای تعیین عملکرد فتوسنتزی گیاه می‌باشد (Maxwell & Johnson, 2000).

وزن خشک گیاه، ارتفاع و تعداد ساقه جانبی

در پایان دوره رشدی گیاه و زمانی که بوته‌ها تقریباً خشک شده بودند، به‌منظور بالا بردن دقت آزمایش، تعداد ۸ بوته از هر گلدان کف‌بر و پس از انتقال به آون فن‌دار در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت خشک شدند. بوته‌های خشک شده با استفاده از ترازوی دیجیتالی با دقت ۰/۰۱ گرم توزین شدند و وزن خشک گیاه بر مبنای گرم در هکتار محاسبه و گزارش شد. از همین ۸ بوته برای اندازه‌گیری ارتفاع و تعداد شاخه جانبی نیز استفاده شد.

عملکرد گل و تعداد گل

به‌منظور تعیین عملکرد گل، ۸ بوته از ابتدای آزمایش و به‌صورت تصادفی انتخاب شدند و به‌صورت روزانه نسبت به جمع‌آوری گل از این بوته‌ها و شمارش آنها اقدام شد. گل‌های جمع‌آوری شده در هر مرحله، با استفاده از جریان هوا و در تاریکی خشک شدند و بعد با استفاده از ترازوی با دقت ۰/۰۰۰۱ توزین گردیدند. عملکرد گل شامل مجموع عملکرد دوره گلدهی بود که بر حسب گرم عملکرد گل خشک در هکتار محاسبه و گزارش شد.

تجزیه و تحلیل داده‌ها

از نرم‌افزار SAS (نسخه ۸ برای ویندوز) برای تجزیه داده‌های آزمایش استفاده شد و مقایسه میانگین‌ها نیز براساس آزمون LSD انجام گردید. تجزیه همبستگی با کمک نرم‌افزار آماری سیگما پلات (نسخه ۱۱/۰) انجام شد.

نتایج

میزان پروکسیداسیون غشاء سلولی (غلظت MDA)

تجزیه واریانس غلظت مالون دی‌آلدهید نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار بین سطوح تنش خشکی بود، هر چند این تفاوت بین تیپ‌های گیاهی مورد آزمایش مشاهده نشد (جدول ۱). مقایسه میانگین غلظت MDA به‌طور کلی نمایانگر افزایش میزان این ماده با شدت گرفتن تنش خشکی بود (جدول ۲).

آنتی‌اکسیدان‌های آنزیمی

سوپراکسید دسموتاز (SOD) و کاتالاز (CAT)

نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده‌های آزمایش نشان داد که میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان گیاه به‌طور معنی‌داری تحت تأثیر تنش خشکی قرار گرفته است، هر چند که فعالیت آنتی‌اکسیدانی دو نوع همیشه‌بهار مورد آزمایش اختلاف معنی‌داری را نشان ندادند (جدول ۱). تنها زمانی که مقایسه میانگین بین ارقام انجام گردید مشخص شد که فعالیت آنزیم کاتالاز در تیپ زینتی (۳/۹۳ تغییرات جذب در طول موج ۲۴۰ نانومتر در میلی‌گرم پروتئین) بیشتر از تیپ دارویی (۲/۹۲ تغییرات جذب در طول موج ۲۴۰ نانومتر در میلی‌گرم پروتئین) بوده است (جدول ۲).

با افزایش شدت تنش خشکی از سطح شاهد (حفظ رطوبت خاک در ۸۰٪ آب قابل استفاده خاک) فعالیت دو آنزیم سوپر اکسید دسموتاز و کاتالاز نیز افزایش یافت، به‌طوری که در تنش ۴۰٪ آب قابل استفاده گیاه میزان فعالیت SOD و CAT به‌ترتیب ۲۸/۵٪ و ۳۰/۵٪ بیشتر از شاهد بدون تنش بود. اما با افزایش تنش به بالاترین سطح خود در این آزمایش، فعالیت هر دو آنزیم SOD و CAT به‌طور معنی‌داری کاهش یافت، به‌طوری که میزان آن حتی از شاهد بدون تنش نیز کمتر بود (به‌ترتیب ۲۴٪ و ۲۹٪ کاهش نسبت تیمار شاهد بدون تنش).

آسکوربات پروکسیداز (APX)

نتایج تجزیه واریانس فعالیت آنزیم آسکوربات پروکسیداز نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار بین سطوح تنش خشکی بود. در حالی‌که سطح فعالیت این آنزیم در دو تیپ مورد بررسی گیاه همیشه‌بهار تفاوتی نداشت (جدول ۱). مقایسه میانگین سطوح

تنش خشکی به‌طور کلی نشان‌دهنده کاهش فعالیت این آنزیم با افزایش میزان خشکی بود. این میزان کاهش در بالاترین سطح تنش خشکی بیش از ۲ برابر شاهد بدون تنش بود (جدول ۲).

آنتی‌اکسیدان‌های غیر آنزیمی

پرولین

در این مطالعه میزان اسید آمینه پرولین در گیاهان تحت تنش به‌طور مستمر افزایش یافت، به‌طوری که میزان آن در بالاترین سطح تنش (حفظ رطوبت در ۲۰٪ آب قابل استفاده گیاه) به بیش از ۴ برابر میزان آن در تیمار شاهد بدون تنش رسید. با وجود این اختلافی در میزان پرولین دو نوع همیشه‌بهار مورد مطالعه وجود نداشت (جدول ۱ و ۲).

کاروتنوئیدها

الگوی تغییر غلظت کاروتنوئیدها با افزایش شدت خشکی کاهشی بود، به‌طوری که تیمار شاهد بدون تنش بیشترین و تیمار تنش شدید کمترین میزان این رنگیزه را نشان دادند. به‌علاوه اینکه میزان کاروتنوئیدهای تیپ دارویی و تیپ زینتی با هم اختلاف معنی‌داری نداشتند. میزان کلروفیل a و b همگام با افزایش شدت خشکی، کاهش پیدا کردند و کمترین میزان هر دو رنگیزه مورد مطالعه در بالاترین سطح تنش خشکی بدست آمد. اما میزان رنگیزه‌های فتوسنتزی در دو تیپ همیشه‌بهار باهم اختلافی نداشت (جدول ۱ و ۲).

فلورسانس کلروفیل

بررسی تجزیه واریانس شاخص کارایی فتوشیمیایی فتوسیستم II (Fv/Fm) نشان‌دهنده عدم اختلاف بین دو نوع همیشه‌بهار مورد بررسی بود، گرچه سطوح تنش خشکی از نظر این شاخص اختلاف معنی‌داری داشتند (جدول ۱ و ۲).

عملکرد گل و صفات مرتبط با آن

نتایج تجزیه واریانس عملکرد گل و صفات مرتبط با عملکرد گیاه ازجمله ارتفاع، تعداد شاخه جانبی، وزن خشک گیاه و تعداد گل، نشان‌دهنده تأثیر معنی‌دار تنش خشکی بر این صفات بود (جدول ۱). با افزایش تنش خشکی به بالاترین میزان آن در این آزمایش، وزن خشک گیاه حدود ۲۷٪ کاهش یافت و متوسط تعداد شاخه‌های جانبی از ۵/۴۳ در تیمار بدون تنش به ۳/۶۴ شاخه در تیمار تنش شدید رسید (جدول ۲). به‌علاوه همبستگی بالایی بین تعداد گل با تعداد شاخه جانبی تولیدشده در هر بوته نیز وجود داشت (**۰/۸۵).

با افزایش تنش خشکی، عملکرد گل با شیب معینی کاهش یافت، به‌طوری که بیشترین (۱۰۵۳ کیلوگرم در هکتار) و کمترین (۴۲۷ کیلوگرم در هکتار) میزان عملکرد گل به‌ترتیب متعلق به تیمار بدون تنش و تیمار تنش شدید (جدول ۲) بود. از طرفی همبستگی معنی‌داری بین عملکرد گل با تمامی صفات مرتبط با عملکرد ازجمله ارتفاع (**۰/۷۶)، تعداد شاخه‌های جانبی (**۰/۷۲)، تعداد گل (*۰/۸۲) و وزن خشک (**۰/۶۸) گیاه مشاهده گردید.

اما طبق نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده‌ها، دو تیپ همیشه‌بهار مورد تحقیق از نظر صفت عملکرد گل و صفات مرتبط با آن اختلاف معنی‌داری با هم داشتند (جدول ۱). عملکرد گل در تیپ دارویی (۸۲۴ کیلوگرم در هکتار) نسبت به تیپ زینتی (۶۵۴ کیلوگرم در هکتار) حدود ۲۴٪ بیشتر بود (جدول ۲). این برتری در تیپ دارویی نسبت به تیپ زینتی در اغلب صفات ازجمله ارتفاع (۱۴٪)، تعداد شاخه جانبی (۳۴٪)، تعداد گل (۷۳٪) و شاخص برداشت (۳۵٪) نیز مشاهده شد. این نتایج در حالی بدست آمد که وزن خشک تیپ زینتی (۴۶۶۰ کیلوگرم در هکتار) نسبت به تیپ دارویی (۴۳۰۰ کیلوگرم در هکتار) حدود ۸٪ بیشتر بود.

جدول ۱- میانگین مربعات (MS) میزان فعالیت سوپر اکسید دسموتاز (SOD)، کاتالاز (CAT)، آسکوربات پروکسیداز (APX)، میزان مالون دی‌آلدهید (MDA)، پرولین، کاروتنوئید، میزان کلروفیل، فلورسانس کلروفیل، ارتفاع، تعداد شاخه جانبی، تعداد گل، وزن خشک و عملکرد گل همیشه بهار

منابع تغییر	درجه	میانگین مربعات (MS)											
S.O.V	آزادی	SOD	CAT	APX	MDA	پرولین	کاروتنوئید	کلروفیل a	کلروفیلb	فلورسانس کلروفیل	ارتفاع	تعداد شاخه جانبی	تعداد گل در هر بوته	وزن خشک در هکتار	عملکرد گل در هکتار
بلوک	۲	۷/۳۲ ns	۲/۰۶ ns	۰/۳۲ ns	۰/۷۲	۴/۵۵ ns	۱/۶۱ *	۵/۵۰ *	۰/۲۰ ns	ns۰/۰۰۰۲۴	۵/۲۰ ns	۰/۷۰ ns	۰/۶۳ ns	۲۳۶۴۰۰۰ **	۱۰۳۶۹۴ *
تنش خشکی	۳	۱۲/۳۰ *	۴/۱۱ *	۲/۴۳ **	۱۵۶/۲۶ **	۱۳۸۸/۴۶ **	۱/۴۴ *	۱۲/۰۶ **	۰/۸۶ **	۰/۰۱۶۳۹ **	۴۸/۲۷ **	۳/۶۰ *	۳/۶۳ *	۲۵۰۴۰۰۰ **	۴۳۱۰۶۶ **
نوع گیاه	۱	۱۲/۴۲ ns	۶/۱۳ *	۰/۸۳ ns	۱۰/۱۲ ns	۱/۱۰ ns	۱/۱۷ ns	۳/۰۷ ns	۰/۰۱ ns	۰/۰۰۲۹۲ ns	۳۲/۷۹ *	۱۰/۴۴ **	۱۳/۶۸ **	۷۸۴۰۰۰ *	۱۷۲۲۸۴ *
اثر متقابل	۳	۶/۴۷ ns	۲/۰۶ ns	۰/۵۵ ns	۲۲/۹۹	۱/۵۹ ns	۰/۲۷ ns	۰/۴۶ ns	۰/۱۰ ns	۰/۰۰۰۹۳ ns	۱/۴۳ ns	۱/۲۱ ns	۰/۲۹ ns	۶۰۰۰۰ ns	۲۸۵۰۰ ns
خطا	۱۴	۲/۹۷	۰/۹۱	۰/۲۷	۲۰/۷۲	۴/۳۰	۰/۳۸	۰/۹۷	۰/۰۶	۰/۰۰۱۲۵	۶/۳۹	۰/۷۳	۰/۶۵	۱۵۶۰۰۰	۲۲۳۴۳

ns، * و **: به‌ترتیب نشان‌دهنده عدم معنی‌داری، معنی‌داری در سطح احتمال ۵٪ و ۱٪ می‌باشند.

جدول ۲- مقایسه میانگین اثر تنش خشکی و تیپ گیاه بر میزان فعالیت سوپر اکسید دسموتاز (SOD)، کاتالاز (CAT)، آسکوربات پروکسیداز (APX)، میزان مالون دی‌آلدهید (MDA)، پرولین، کاروتنوئید، میزان کلروفیل، فلورسانس کلروفیل، ارتفاع، تعداد شاخه جانبی، تعداد گل، وزن خشک و عملکرد گل همیشه بهار

تیمار	SOD ($u.mg^{-1}$ protein)	CAT ($\Delta A240.mg^{-1}$ protein)	APX ($\Delta A290.mg^{-1}$ protein)	MDA ($mmol.gr^{-1}$ fresh weight)	پرولین	کاروتنوئید	کلروفیل a	کلروفیل b	فلورسانس کلروفیل	ارتفاع (cm)	تعداد شاخه جانبی	تعداد گل در هر بوته	وزن خشک ($kg.ha^{-1}$)	عملکرد گل در هر بوته $kg.ha^{-1}$
					($mg.g^{-1}$ fresh weight)									
خشکی														
۸۰٪ آب قابل استفاده	۶/۶۸ ab	۳/۴۱ ab	۲/۷۳ a	۱۷/۹۷ a	۸/۵۰ b	۴/۵ a	۹/۷۳ a	۲/۱۱ a	۰/۵۶۸ a	۲۱/۰۶ a	۵/۴۳ a	۳/۷۹ a	۵۰۶۰ a	۱۰۵۳ a
۶۰٪ آب قابل استفاده	۶/۸۲ab	۳/۴۳ ab	۱/۶۱ bc	۲۸/۶۸ b	۱۰/۱۶ b	۳/۹۶ ab	۸/۶۴ ab	۱/۸۹ a	۰/۵۰۹ b	۱۸/۸۶ ab	۴/۷۷ ab	۲/۹۱ ab	۴۹۴۰ a	۸۳۷ b
۴۰٪ آب قابل استفاده	۸/۵۸ a	۴/۴۵ a	۲/۲۳ ab	۲۳/۵۷ ab	۳۵/۱۲ a	۳/۸۵ ab	۷/۴۴ bc	۱/۸۶ a	۰/۴۸۸ b	۱۷/۶۷ b	۴/۱۶ b	۲/۷۰ bc	۴۲۲۰ b	۶۴۰ c
۲۰٪ آب قابل استفاده	۵/۰۸ b	۲/۴۲ b	۱/۳۱ c	۲۸/۶۷ b	۳۶/۱۷ a	۳/۳ b	۶/۴۸ c	۱/۲۳ b	۰/۴۴۲ c	۱۴/۲۷ c	۳/۶۴ c	۱/۸۹ c	۳۶۸۰ c	۴۲۷ d
نوع گیاه														
تیپ دارویی	۶/۰۷ a	۲/۹۲ b	۱/۷۸ a	۲۵/۳۷ a	۲۲/۲۷ a	۳/۶۸ a	۷/۷۱ a	۱/۷۵ a	۰/۴۹ a	۱۹/۱۳ a	۵/۱۶ a	۳/۵۸ a	۴۳۰۰ b	۸۲۴ a
تیپ زینتی	۷/۵۱ a	۳/۹۳ a	۲/۱۵ a	۲۴/۰۷ a	۲۲/۷۰ a	۴/۱۲ a	۸/۴۳ a	۱/۷۹ a	۰/۵۱ a	۱۶/۷۹ b	۳/۸۴ b	۲/۰۷ b	۴۶۶۰ a	۶۵۴ b

در هر ستون میانگین‌های دارای حداقل یک حرف مشترک، براساس آزمون کمترین اختلاف معنی‌دار (LSD)، به لحاظ آماری در سطح احتمال ۵٪ با هم تفاوتی ندارند.

بحث

میزان پروکسیداسیون غشاء سلولی (غلظت MDA)

افزایش میزان MDA با افزایش شدت تنش خشکی، توسط بسیاری از محققان گزارش شده است. ازجمله Mirzaee و همکاران (۲۰۱۳) افزایش میزان این ماده را با افزایش غلظت PEG در ریشه و اندام هوایی کلزا گزارش کردند. افزایش غلظت MDA تحت شرایط تنشی مختلف نشان می‌دهد که تنش خشکی می‌تواند منجر به القای پراکسیداسیون غشاء به‌وسیله گونه‌های اکسیژن آزاد شود (Moussa & Abdel-Aziz, 2008). در آزمایش ما هر چند بین افزایش میزان تنش و غلظت MDA هماهنگی وجود داشت، اما در تیمار تنش متوسط (حفظ رطوبت در ۴۰٪ آب قابل استفاده خاک) دوباره غلظت این ماده کاهش پیدا کرد، به‌طوری که به لحاظ آماری با تیمار بدون تنش اختلافی نداشت. البته کاهش غلظت MDA پس از یک دوره افزایش را شاید بتوان به تأثیر سیستم آنتی‌اکسیدانی آنزیمی گیاه بر کاهش اثرات ناشی از تنش اکسیداتیو نسبت داد. به عبارت دیگر در هر سطحی از تنش خشکی که سیستم آنتی‌اکسیدانی آنزیمی گیاه فعالیت بالاتری داشته و موفق‌تر عمل کرده‌است، میزان MDA و در نتیجه خسارت سلولی نیز پایین‌تر بوده است (جدول ۲). ارتباط بین فعالیت سیستم آنتی‌اکسیدان آنزیمی گیاه و خسارت سلولی که اغلب خود را به‌صورت افزایش میزان پراکسیداسیون غشاء سلولی و در نتیجه افزایش تولید MDA نشان می‌دهد، قبلاً در ذرت نیز گزارش شده است (Li-Ping *et al*., 2006).

آنتی‌اکسیدان‌های آنزیمی

سوپر اکسید دسموتاز (SOD) و کاتالاز (CAT)

آنزیم SOD که اولین سطح چرخه آب–آب را کنترل می‌کند (Asada, 1999) و در فرونشانی اکسیژن فعال نیز نقشی کلیدی دارد (Fu & Huang, 2001)، به‌عنوان کاتالیزور تبدیل O_2^- به H_2O_2 عمل می‌نماید که در ادامه این ترکیب‌ها توسط CAT، POD و دیگر آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان حذف می‌شود. از این‌رو هماهنگی مشاهده شده بین فعالیت دو آنزیم SOD و CAT در این مطالعه، می‌تواند نشان‌دهنده این باشد که افزایش نیاز برای فرونشانی H_2O_2 منجر به هماهنگی بین افزایش فعالیت آنزیم CAT با SOD شده است. از این جهت با افزایش همزمان فعالیت SOD و CAT گیاه سعی می‌کند از میزان خسارت عوامل آسیب‌رسان سلولی ازجمله H_2O_2 بکاهد. اما کاهش فعالیت آنتی‌اکسیدانی (SOD و CAT) در بالاترین سطح تنش خشکی پس از یک دوره افزایش (جدول ۲)، همگی نشان‌دهنده بروز خسارت سلولی‌اند (Li-Ping *et al*., 2006). البته ارتباط بین کاهش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان SOD، CAT و POD با تجمع MDA قبلاً نیز به اثبات رسیده است (Li *et al*., 1998). کاهش فعالیت این آنزیم‌ها باعث تجمع سطوح بالای H_2O_2 می‌شود و با افزایش پراکسیداسیون غشاء سلولی میزان MDA را افزایش داده و موجب خسارت غشاء خواهد شد (Li-Ping *et al*., 2006).

آسکوربات پروکسیداز (APX)

کاهش فعالیت آنزیم APX با افزایش شدت تنش خشکی در مطالعه ما در حالی اتفاق افتاده بود که اغلب مطالعات قبلی در گیاهان مختلف افزایش فعالیت این آنزیم را در شرایط خشکی گزارش کرده بودند. به‌عنوان مثال نتایج بررسی اثر تنش اکسیداتیو بر گیاهچه‌های برنج توسط Sharma و Dubey (۲۰۰۴) بر افزایش فعالیت آنزیم‌های چرخه آسکوربات– گلوتاتیون دلالت داشت. تمامی آنزیم‌های این چرخه ازجمله APX، MDHAR، DHAR و GR با القای تنش خشکی افزایش یافتند. با توجه به اینکه میل ترکیبی آنزیم CAT برای واکنش با H_2O_2 بسیار کمتر از APX است و از طرفی آنزیم کاتالاز در حضور نور ابتدا غیرفعال و بعد تخریب می‌شود (Hertwig *et al*., 1992)، افزایش فعالیت آنزیم کاتالاز با افزایش میزان تنش خشکی و همراه با آن کاهش میزان فعالیت آنزیم آسکوربات پروکسیداز در این تحقیق (جدول ۲)، می‌تواند نشان‌دهنده نامناسب بودن شرایط برای فعالیت چرخه آسکوربات–

گلوتاتیون برای مقابله با H_2O_2 باشد. زیرا چنانچه شرایط لازم برای فعالیت این چرخه فراهم باشد، سهم آنزیم کاتالاز در روبش این ترکیب اکسیدان به‌مراتب کمتر از آنزیم آسکوربات پروکسیداز خواهد بود.

آنتی‌اکسیدان‌های غیر آنزیمی

پرولین

تأثیر تنش خشکی بر افزایش میزان اسید آمینه پرولین توسط Manuchehri و Salehi (۲۰۱۴) نیز گزارش شده است. این محققان با بررسی تنش شوری و خشکی روی گیاه دارویی پنجه مرغی (*Cynodon dactylon* [L.] Pers.) دریافتند که با افزایش شدت این دو نوع تنش، میزان اسید آمینه پرولین نیز افزایش خواهد یافت. با توجه به اینکه تجمع پرولین آزاد به‌عنوان یک سازگاری عمومی برای کاهش شدت اغلب تنش‌های غیر زنده در گیاهان آلی شناخته می‌شود (Gzik, 1996)، از این‌رو شاید بتوان گفت، به همین دلیل هم کاهش فعالیت سیستم آنتی‌اکسیدانی آنزیمی گیاه در سطوح بالای تنش خشکی نیز تأثیری بر روند افزایشی فعالیت پرولین در شدت بالای تنش خشکی در مطالعه ما نداشته است.

کاروتنوئید و کلروفیل

کاروتنوئیدها به‌منظور حفاظت نوری از فتوسنتز ضروری‌اند و به‌عنوان پیشگام سیستم انتقال پیام طی مراحل توسعه گیاهی تحت تنش‌های زنده و غیر زنده نقش مهمی را ایفاء می‌کنند. نقش کاروتنوئیدها در روبش گونه‌های اکسیژن فعال بخوبی مورد مطالعه قرار گرفته است (Verma & Mishra, 2005). اما بر خلاف نتایج تحقیق ما، در مطالعه دیگری روی گیاه همیشه‌بهار (Jafarzadeh *et al.*, 2014)، مشخص شد که تنش خشکی بر روی افزایش کاروتنوئیدها تأثیر معنی‌داری داشته است. میزان کاروتنوئید با افزایش تنش خشکی به‌طور مستمر افزایش یافت، به‌طوری‌که بیشترین (۳/۳۶ میلی‌گرم بر گرم وزن تر گلبرگ) و کمترین میزان این رنگیزه (۰/۹۶ میلی‌گرم بر گرم وزن تر گلبرگ) به‌ترتیب در بالاترین (۱۰ اتمسفر) و پایین‌ترین (ظرفیت زراعی) سطح تنش خشکی بدست آمد.

در تحقیقی که Munné-Bosch و Peñuelas (۲۰۰۴) در مورد تنش اکسیداتیو ناشی از تنش خشکی روی گیاه درخت توت فرنگی (*Arbutus unedo* L.) انجام دادند، میزان لوتئین و بتا-کاروتن تحت تنش خشکی متوسط تغییری نکرد اما هنگامی که شدت تنش افزایش یافت، این دو کاروتنوئید به‌ترتیب ۶۱٪ و ۷۵٪ کاهش یافتند. بتا-کاروتن در روبش کلروفیل سه‌تایی در کمپلکس‌های آنتن‌ها بسیار مؤثر عمل می‌کند (Cogdell & Frank, 1988) و در روبش اکسیژن یکتایی تولید شده در مرکز واکنش فتوسیستم II نیز به آلفا-توکوفرول کمک می‌کند (Trebst *et al.*, 2002). از این‌رو تخریب بتا-کاروتن می‌تواند با افزایش تولید اکسیژن یکتایی در تیلاکوئیدها ارتباط داشته باشد. بنابراین گرچه در این تحقیق تفکیکی بین انواع مختلف کاروتنوئیدها انجام نشده است اما با توجه به آنچه گفته شد می‌توان نتیجه گرفت که کاهش میزان کل کاروتنوئیدها به‌عنوان یک عامل آنتی‌اکسیدان غیر آنزیمی مهم در مقابله با تنش اکسیداتیو می‌تواند نشان‌دهنده تخریب بیشتر این دسته از رنگیزه‌های گیاهی در شدت‌های بالای تنش اکسیداتیو ناشی از تنش خشکی باشد. از طرفی فعالیت‌های فتواکسیداتیو درون کلروپلاست در شدت بالای تنش خشکی می‌تواند منجر به آسیب به غشاهای کلروپلاست و در نتیجه تخریب رنگیزه‌های مستقر بر روی این غشاءها شده باشد (Kannan & Kulandaivelu, 2011).

فلورسانس کلروفیل

کاهش کارایی فتوشیمیایی فتوسیستم II با افزایش شدت تنش خشکی، در مطالعات سایر محققان نیز بیان شده است. ازجمله Mamnoei و Sharifi (۲۰۱۰) با مطالعه روی ۶ ژنوتیپ جو به این نتیجه رسیدند که در تیمارهای مختلف آبیاری با افزایش محدودیت آب، نسبت Fv/Fm کاهش یافت. یعنی با محدودیت آبی، کارایی فتوسیستم II به‌دلیل بازدارندگی نوری کم شده است. کلروپلاست به‌دلیل داشتن

ترکیب‌های آنزیمی روبشی مختلف و نیز نوع متابولیت‌هایی که دارد، یک واحد مقاوم در برابر ROSها می‌باشد (Asada, 1999). گرچه تحت شرایط تنش خشکی، یکی از تهدیداتی که کلروپلاست با آن روبروست، تولید رادیکال هیدروکسیل در تیلاکوئیدها از طریق احیاء H_2O_2 توسط آنزیم SOD (به‌واسطه یون آهن) و آسکوربات است. تجمع رادیکال هیدروکسیل به‌طور اجتناب‌ناپذیری منجر به ایجاد واکنش‌های مخرب می‌شود که درنهایت سبب بروز خسارت به غشاءهای تیلاکوئیدی و دستگاه فتوسنتزی خواهد شد (Vranová *et al*., 2002). در این تحقیق نیز همگام شدن کاهش محتوی رنگیزه‌های فتوسنتزی با افزایش میزان پراکسیداسیون غشاء سلولی (افزایش میزان MDA) نشان‌دهنده آسیب به غشاءهای سلولی و ازجمله آن غشاء تیلاکوئیدی است که این آسیب می‌تواند خود را به‌صورت کاهش کارایی فتوسیستم II (کاهش Fv/Fm) نشان دهد.

عملکرد گل و صفات مرتبط با آن

تنش خشکی در گیاهان می‌تواند منجر به بی‌نظمی‌های فیزیولوژیکی شود که کاهش در فتوسنتز و تعرق ازجمله این تغییرات است (Sarker *et al*., 2005). از این‌رو با قطعیت بالایی می‌توان گفت که محدود شدن ویژگی‌های مرتبط با عملکرد همیشه‌بهار تحت شرایط کمبود آب می‌تواند به‌دلیل قرارگیری در معرض سطوح خسارت‌زای خشکی باشد که منجر به کاهش آماس و در نتیجه کاهش رشد و محدود شدن توسعه سلول‌ها خواهد شد (Scalia *et al*., 2009).

در مطالعه پاسخ فیزیولوژیکی و فتوشیمیایی به کمبود رطوبت، تنش خشکی منجر به کاهش معنی‌دار ارتفاع، عملکرد گل و بیومس اندام هوایی گیاه بابونه شد (Baghalian *et al*., 2011). بنابراین به نظر می‌رسد که این کاهش در صفات عملکردی گیاه نتیجه برهم خوردن روابط آب در گیاه بخصوص توان تورژسانس باشد (Hussain *et al*., 2009). این بدین معناست که کاهش جذب آب از خاک باعث کاهش محتوی آب و آماس بافت شده است، از این‌رو در چنین شرایطی طویل شدن سلولی در گیاهان بدلیل کاهش فشار تورژسانس محدود می‌شود. به‌علاوه تنش خشکی اسیمیلاسیون نوری و ساخت متابولیت‌های لازم برای تقسیم سلولی را نیز کاهش می‌دهد. چنین تغییراتی منجر به اختلال در تقسیم میتوز و نیز طویل شدن و توسعه سلولی می‌شود که ارتفاع و رشد گیاه کاهش پیدا می‌کند (Farooq *et al*., 2009).

در این تحقیق همبستگی معنی‌داری بین عملکرد گل با تمامی صفات مرتبط با عملکرد ازجمله ارتفاع (۰/۷۶**)، تعداد شاخه‌های جانبی (۰/۷۲**)، تعداد گل (۰/۸۲*) و وزن خشک (۰/۶۸**) گیاه مشاهده گردید. البته تأثیرپذیری عملکرد گل از صفاتی که ارتباط مستقیم با میزان گلدهی دارد، در گیاهان دارویی که گل آنها مورداستفاده اصلی گیاه است توسط دیگر محققان نیز گزارش‌شده است. در گیاه دارویی بابونه (Ahmadian *et al*., 2011)، همبستگی مثبت و معنی‌داری ($P<001$) بین عملکرد گل خشک با تعداد گل، ارتفاع، تعداد شاخه و بیومس گیاه در هر دو سال مورد بررسی مشاهده گردید. به‌علاوه مطابق با نتایج تحقیق ما، عملکرد گل، ارتفاع، تعداد شاخه‌های جانبی و بیومس گیاه با افزایش شدت تنش خشکی (سطوح تنش خشکی شامل حفظ رطوبت در ۵۰، ۷۰ و ۹۰ درصد ظرفیت زراعی بوده است) در هر دو سال آزمایش در گیاه بابونه نیز کاهش یافته است. از این‌رو شاید بتوان این‌طور نتیجه گرفت که خسارت وارده به عملکرد گل که بخش مورداستفاده دارویی همیشه‌بهار است، درنتیجه نقصان صفات مرتبط با عملکرد گیاه بوده که خود به‌دلیل کاهش رشد گیاه در شرایط محدودیت آب بوده است.

در یک نتیجه‌گیری کلی مشخص می‌شود که تنش خشکی در همیشه‌بهار می‌تواند با تحت تأثیر قرار دادن فیزیولوژی گیاه، در نهایت منجر به کاهش رشد و عملکرد این گیاه دارویی شود. در این میان سیستم آنتی‌اکسیدانی گیاه قادر است در سطوح پایین تنش خشکی با ترکیب‌های اکسیداتیو تولید شده مقابله کند و از شدت خسارت تنش خشکی بکاهد. اما هنگامی که خشکی شدت می‌گیرد، میزان تولید ROSها از توانایی روبندگی سیستم آنتی‌اکسیدانی گیاه

بیشتر می‌شود که نتیجه آن خسارت شدید به رشد و تولید همیشه‌بهار خواهد بود. از این‌رو، این احتمال وجود دارد که اگر فعالیت آنتی‌اکسیدانی همیشه‌بهار در مواجهه با تنش خشکی به‌نحوی افزایش یابد، توانایی این گیاه برای کاهش اثرات ناشی از تنش اکسیداتیو افزایش یافته و می‌تواند منجر به بهبود عملکرد آن شود که البته اثبات این موضوع نیاز به انجام مطالعات بیشتری در این زمینه دارد.

با وجود اینکه تیپ دارویی همیشه‌بهار نسبت به تیپ زینتی آن از برتری نسبی در برخی صفات مورفولوژیکی و عملکردی برخوردار بود و از این نظر می‌تواند گزینه مناسب‌تری برای دستیابی به عملکرد بالاتر توسط بهره‌برداران باشد، اما این دو تیپ در اغلب صفات فیزیولوژیکی مورد بررسی با هم اختلافی نداشتند. این موضوع نشان می‌دهد که با وجود تفاوت‌های ظاهری، این دو نوع همیشه‌بهار به لحاظ فیزیولوژیکی شباهت زیادی به هم دارند.

سپاسگزاری

نویسندگان لازم می‌دانند قدردانی خود را از مسئولان محترم دانشگاه بیرجند برای حمایت مالی از انجام این طرح اعلام کنند. در ضمن بدین وسیله از آقایان دکتر مجید جامی‌الاحمدی، دکتر علی‌اله رسانی و مهندس علیرضا نخعی و همین‌طور سرکار خانم مهندس سهیلا بهروش برای راهنمایی در انجام آزمایش‌ها و کمک در فراهم‌آوری تجهیزات آزمایشگاهی تشکر می‌شود.

منابع مورد استفاده

- Ahmadian, A., Tavassoli, A. and Amir, E., 2011. The interaction of water stress and manure on yield components. Essential oil and chemical compositions of cumin (*Cminum cyminum*). African Journal of Agricultural Research, 6: 2309-2315.
- Amiri Deh Ahmadi, S.R., Parsa, M., Bannayan, M., Nassiri Mahallati, M. and Deihimfard, R., 2014. Yield gap analysis of chickpea under semi-arid conditions: A simulation study. Journal of Plant Production, 8: 531-548.
- Amoon, S.A., Ramah, G.H. and Radmehr, P.R.A., 2014. Outcomes of irrigation regimes and nitrogen fertilizer on seed yield of calendula (*Calendula officinalis* L.). International Scholars Journals, 2: 144-147.
- Arnon, D.I., 1949. Copper enzymes in isolated chloroplasts, polyphenoloxidases in *Beta vulgaris*. Plant Physiology, 24: 1-15.
- Asada, K., 1999. The water-water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygens and dissipation of excess photons. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology, 50: 601-639.
- Ashraf, M. and Foolad, M., 2007. Roles of glycine betaine and proline in improving plant abiotic stress resistance. Environmental and Experimental Botany, 59: 206-216.
- Baghalian, K., Abdoshah, S., Khalighi-Sigaroodi, F. and Paknejad, F., 2011. Physiological and phytochemical response to drought stress of German chamomile (*Matricaria recutita* L.). Plant Physiology and Biochemistry, 49: 201-207.
- Barajas-Farias, L.M., Pérez-Carreón, J.I., Arce-Popoca, E., Fattel-Fazenda, S., Alemán-Lazarini, L., Hernández-García, S. and Villa-Treviño, S.A., 2006. Dual and opposite effect of *C. officinalis* flower extract: chemoprotector and promoter in a rat hepatocarcinogenesis model. Planta Medica, 72(3): 217-222.
- Bates, L.S., Waldern, R.P. and Teave, I.D., 1973. Rapid determination of free proline for water stress studies. Plant and Soil, 39: 205-207.
- Behtash, N., Shafaroudi, H. and Nazari, Z., 2010. Khorasgani analgesic effect of *C. officinalis* flowers extract in mice. Toxicology, 196(17): 251.
- Bogdanova, N.S., Nikolaeva, I.S., Shcherbakova, L.I., Tolstova, T.I., Moskalenko, N.I. and Pershin, G.N., 1970. Study of antiviral properties of *Calendula officinalis*. Farmakol Toksikol Moscow, 33: 349-355.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry, 72: 248-254.
- Braga, P., Dal Sasso, M., Culici, M., Spallino, A., Falchi, M., Bertelli, A. and Lo Scalzo, R., 2009. Antioxidant Activity of *Calendula officinalis* Extract: Inhibitory Effects on Chemiluminescence of Human neutrophil Bursts and Electron Paramagnetic Resonance Spectroscopy. Pharmacology, 83(6): 348-355.
- Cakmak, I. and Horst, W., 1991. Effect of aluminum on lipid peroxidation, superoxide dismutase, catalase

Journal of Agronomy and Crop Science, 195: 98-109.
- Jafarzadeh, L., Omidi, H. and Bostani, A.A., 2014. The study of drought stress and bio fertilizer of nitrogen on some biochemical traits of Marigold medicinal plant (*Calendula officinalis* L.). Iranian Journal of Biology, 27: 180-193.
- Kalvatchev, Z., Walder, R. and Garzaro, D., 1997. Anti-HIV activity of extracts from *Calendula officinalis* flowers. Biomedicine & Pharmacotherapy, 51: 176-180.
- Kannan, N.D. and Kulandaivelu, G., 2011. Drought induced changes in physiological, biochemical and phytochemical properties of *Withania somnifera* Dun. Journal of Medicinal Plants Research, 5: 3929-3935.
- Li, L., Staden, J. and Jager, A.K., 1998. Effects of plant growth regulators on the antioxidant system in seedlings of two maize cultivars subjected to water stress. Plant Growth Regulation, 25: 81-87.
- Li-Ping, B., Fang-Gong, S., Ti-Da, G., Zhao-Hui, S., Yin-Yan, L. and Guang-Sheng, Z., 2006. Effect of soil drought stress on leaf water status, membrane permeability and enzymatic antioxidant system of maize. Pedosphere, 16: 326-332.
- Mamnoei, E. and Sharifi, R.S., 2010. Study the effects of water deficit on chlorophyll fluorescence indices and the amount of proline in six barley genotypes and its relation with canopy temperature and yield. Journal of Plant Biology, 2: 51-62.
- Manuchehri, R. and Salehi, H., 2014. Physiological and biochemical changes of common bermudagrass (*Cynodon dactylon* [L.] Pers.) under combined salinity and deficit irrigation stresses. South African Journal of Botany, 92: 83-88.
- Maxwell, K. and Johnson, G.N., 2000. Chlorophyll fluorescence-a practical guide. Journal of Experimental Botany, 51: 659-668.
- Metwally, S.A., Khalid, A.K. and Abou-Leila, B.H., 2013. Effect of water regime on the growth, flower yield, essential oil and proline contents of *Calendula officinalis.* Bioscience, 5: 65-69.
- Mirzaee, M., Moieni, A. and Ghanati, F., 2013. Effects of drought stress on the lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities in two canola (*Brassica napus* L.) cultivars. Journal of Agricultural Science and Technology, 15: 593-602.
- Mousavi, S.G.R., Seghatoleslami, M.J., Ansarinia, E. and Javadi, H., 2012. The effect of water deficit stress and nitrogen fertilizer on yield and water use effeciency of *Calendula officinalis* L. Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants, 28(3): 493-508.

and peroxidase activities in root tip of soybean (*Glysin max*). Plant Physiology, 83: 463-468.
- Chaparzadeh, N., Lucia D'Amico, M., Khavar-Nejad, R.A., Izzo, R. and Navari-Izzo, F., 2004. Antioxidative responses of *Calendula officinalis* under salinity conditions. Plant Physiology and Biochemistry, 42: 695-701.
- Cogdell, R. and Frank, H.A., 1988. How carotenoids function in photosynthetic bacteria. Biochimica et Biophysica Acta, 895: 63-79.
- Farooq, M., Wahid, A., Kobayashi, N., Fujita, D. and Basra, S.M.A., 2009. Plant drought stress: effects, mechanisms and management. Agronomy for Sustainable Development, 29: 185-212.
- Fu, J. and Huang, B., 2001. Involvement of antioxidants and lipid peroxidation in the adaptation of two cool-season grasses to localized drought stress. Environmental and Experimental Botany, 45: 105-114.
- Giannopolitis, C.N. and Ries, S.K., 1977. Superoxide dismutase. I. Occurrence in higher plants. Plant Physiology, 59: 309-314.
- Goyal, M. and Mathur, R., 2011. Antimicrobial effects of *Calendula officinalis* against human pathogenic microorganisms. Herbal Medicine and Toxicology, 5(1): 97-101.
- Gzik, A., 1996. Accumulation of proline and pattern of α-amino acids in sugar beet plants in response to osmotic, water and salt stress. Environmental and Experimental Botany, 36: 29-38.
- Hargreaves, G.H. and Merkley, G.P., 1998. Irrigation Fundamentals: An Applied Technology Text for Teaching Irrigation at the Intermediate Level. Water Resources Publications, Colorado, USA, 198p.
- Hasheminasab, H., Assad, M.T., Aliakbari, A. and Sahhafi, R., 2012. Influence of drought stress on oxidative damage and antioxidant defense systems in tolerant and susceptible wheat genotypes. Journal of Agricultural Science, 4: 20-30.
- Health, R.L. and Packer, L., 1968. Photoperoxidation in isolated chloroplasts 1. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidatoin. Archives of Biochemistry and Biophysics, 125: 189-198.
- Hertwig, B., Streb, P. and Feierabend, J., 1992. Light dependence of catalase synthesis and degradation in leaves and the influence of interfering stress conditions. Plant Physiology, 100: 1547-1553.
- Hussain, M., Malik, M.A., Farooq, M., Khan, M.B., Akram, M. and Saleem, M.F., 2009. Exogenous glycinebetaine and salicylic acid application improves water relations, allometry and quality of hybrid sunflower under water deficit conditions.

- Moussa, H. and Abdel-Aziz, S.M., 2008. Comparative response of drought tolerant and drought sensitive maize genotypes to water stress. Australian Journal of Crop Science, 1: 31-36.
- Munné-Bosch, S. and Peñuelas, J., 2004. Drought-induced oxidative stress in strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) growing in Mediterranean field conditions. Plant Science, 166: 1105-1110.
- Nakano, Y. and Assada, K., 1981. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate specific peroxidase in spinach chloroplasts. Plant and Cell Physiology, 22: 867-880.
- Omidbeigi, R., 2000. Approaches to Production and Processing of Medicinal Plants (Vol. 2). Astan Ghods Razavi publications, Mashhad, 438p.
- Parente, L.M., Andrade, M.A., Brito, L.A., Moura, V.M., Miguel, M.P., Lino-Júnior Rde, S. and Paulo, N.M. 2011. Angiogenic activity of *Calendula officinalis* flowers in rats. Acta Cirurgica Brasileira, 26(1): 19-24.
- Parente, L.M., Lino, J.R.S., Tresvenzol, L.M., Vinaud, M.C., de Paula, J.R. and Paulo, N.M., 2012. Wound healing and anti-inflammatory effect in animal models of *Calendula officinalis* L. growing in Brazil. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 2012: 375671.
- Pommier, P., Gomez, F. and Sunyach, M.P., 2004. Phase III randomized trial of *Calendula officinalis* compared with tromaline for the prevention of acute dermatitis during irradiation for breast cancer. Oncology, 22: 1447-1453.
- Preethi, K.C., Kuttan, G. and Kuttan, R., 2009. Anti-inflammatory activity of flower extract of *Calendula officinalis* L. and it's possible mechanism of action. Indian Journal of Experimental Biology, 47(2): 113-120.
- Rahmani, N., Daneshian, J. and Aliabadi Farahani, H., 2009. Effects of nitrogen fertilizer and irrigation regimes on seed yield of calendula (*Calendula officinalis* L.). Journal of Agricultural Biotechnology and Sustainable Development, 1: 24-28.
- Ray, D., Mukherjee, S., Falchi, M., Bertelli, A. and Das, D.K., 2010. Amelioration of myocardial ischemic reperfusion injury with *Calendula officinalis*. Current Pharmaceutical Biotechnology, 11(8): 849-854.
- Richards, L.A. and Fireman, M., 1943. Pressure-plate apparatus for measuring moisture sorption and transmission by soils. Soil Science, 56: 395-404.
- Sarker, B.C., Hara, M. and Uemura, M., 2005. Proline synthesis, physiological responses and biomass yield of eggplants during and after repetitive soil moisture stress. Scientia Horticulturae, 103: 387-402.
- Scalia, R., Oddo, E., Saiano, F. and Grisafi, F., 2009. Effect of salinity an *Puccinellellia distans* (L.) Parl. treated with NaCl and foliarly applied glycine betaine. Plant Stress, 3: 49-54.
- Sedghi, M., Seyed Sharifi, R., Pirzad, A.R. and Amanpour-Balaneji, B., 2012. Phytohormonal regulation of antioxidant systems in petals of drought stressed pot marigold (*Calendula officinalis* L.). Journal of Agricultural Science and Technology, 14: 869-878.
- Sharma, P. and Dubey, R.S., 2004. Ascorbate peroxidase from rice seedlings: properties of enzyme isoforms, effects of stresses and protective roles of osmolytes. Plant Science, 167: 541-550.
- Trebst, A., Depka, B. and Holländer-Czytko, H., 2002. A specific role for tocopherol and of chemical singlet oxygen quenchers in the maintenance of photosystem II structure and function in *Chlamydomonas reinhardtii*. FEBS Letters, 516: 156-160.
- Verma, S. and Mishra, S.N., 2005. Putrescine alleviation of growth in salt stressed *Brassica juncea* by inducing antioxidative defense system. Journal of Plant Physiology, 162: 669-677.
- Vranová, V., Inzé, D. and Van Breusegem, F., 2002. Signal transduction during oxidative stress. Journal of Experimental Botany, 53: 1227-1236.
- Yildiz Aktas, L., Turkyilmaz, B., Akca, H. and Parlak, S., 2007. Role of abscisic acid and proline treatment on induction of antioxidant enzyme activities and drought tolerance responses of *Laurus nobilis* L. seedlings. Fen Bilimleri Dergisi, 28: 14-27.
- Zitterl-Eglseer, K., Sosa, S., Jurenitsch, J., Schubert-Zsilavecz, M., Della Loggia, R., Tubaro, A. and Franz, C., 1997. Anti-oedematous activities of the main triterpendiol esters of Marigold (*Calendula officinalis* L.). Ethnopharmacology, 57(2): 139-144.

A study on the effects of water deficit on physiological and yield-related traits of pot marigold (*Calendula officinalis* L.)

M. Ebrahimi[1*], Gh.R. Zamani[2] and Z. Alizadeh[2]

1*- Corresponding author, Research Group of Medicinal Plants, Jahad Daneshgahi of Southern Khorasan, Birjand, Iran
E-mail: mahdiebrahimi@birjand.ac.ir
2- Department of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, University of Birjand, Birjand, Iran

Received: April 2016 Revised: February 2017 Accepted: May 2017

Abstract

As an important medicinal plant in some industries such as pharmaceutical industry, the antioxidant capacity of pot marigold (*Calendula officinalis* L.) in conferring drought stress, as well as physiological and yield-related traits were studied. A complete randomized block design with three replications was carried out in the research greenhouse of Birjand University during 2014, 2015. Four levels of drought stress (including 80, 60, 40 and 20 percent of the available soil water content) and two plant types (medicinal and ornamental) were considered in this study. According to the results, with increasing drought severity, APX activity decreased and SOD and CAT activity initially increased and then decreased. Over accumulation of reactive oxygen species along with inefficiency of the antioxidant system had possibly resulted in the impaired enzymatic antioxidant efficiency in the highest level of drought stress. Proline content increased along with increasing drought intensity, so that it was up to fourfold in the highest level of drought stress, compared to non-stressed control. Although proline is an antioxidant compound, no relationship was found between proline accumulation with antioxidant enzymes. Carotenoids, chlorophyll content and chlorophyll index all decrease, and MDA content increased with increasing drought intensity, as a result of damages to chloroplast membranes. Reduced photochemical efficiency of photosystem II was another consequence of intensified water deficit. Drought stress also negatively affected yield related traits, so that dry weight (27%), height (32%), number of lateral branches (33%) and flowers (50%) and flower yield (60%) decreased. We also found that medicinal pot marigold (824.3 $kg.ha^{-1}$) produced more flower than ornamental one (654.9 $kg.ha^{-1}$). In conclusion, we found that enzymatic antioxidant system of pot marigold conferred a suitable ability to reduce adverse effects of drought-induced oxidative stress. Hence, increasing pot marigold's antioxidant activity could result in increasing its physiological resistant to drought stress and consequently improves its yield components performance.

Keywords: Reactive oxygen species, cell membrane, proline, malondialdehyde, flower yield.