

بررسی تنش خشکی و کود زیستی نیتروژنه بر برخی ویژگی‌های بیوشیمیایی گیاه دارویی همیشه بهار (*Calendula officinalis* L.)

لیلا جعفرزاده، حشمت امید* و عبدالامیر بستانی

تهران، دانشگاه شاهد، دانشکده کشاورزی

تاریخ دریافت: ۹۰/۸/۱۳ تاریخ پذیرش: ۹۱/۹/۱

چکیده

به منظور بررسی اثرات تنش خشکی و کود زیستی نیتروژن بر عملکرد گل، محتوی ترکیبات محلول و شاخص‌های بیوشیمیایی گیاه دارویی همیشه بهار (*Calendula officinalis* L.)، مطالعه‌ای در مزرعه تحقیقاتی دانشکده کشاورزی دانشگاه شاهد تهران انجام شد. این آزمایش بصورت اسپلیت پلات در قالب طرح پایه بلوک‌های کامل تصادفی در ۳ تکرار و در سال زراعی ۸۹-۹۰ اجرا گردید. فاکتورهای آزمایش شامل سطوح مختلف خشکی در مرحله چهار برگی به‌عنوان فاکتور اصلی (پتانسیل رطوبت خاک ۰/۵ اتمسفر به‌عنوان شاهد (FC (ظرفیت زراعی))، پتانسیل ۳/۵ اتمسفر به‌عنوان تنش ملایم، پتانسیل ۶/۵ اتمسفر به‌عنوان تنش نسبتاً شدید و پتانسیل ۱۰ اتمسفر به‌عنوان تنش شدید) و سطوح کود زیستی نیتروژن به‌عنوان فاکتور فرعی (شاهد (بدون اعمال تیمار)، اختلاط دو لیتر کود زیستی نیتروژنه همراه با آب آبیاری و اختلاط دو لیتر کود زیستی نیتروژنه بصورت بذرمال) در نظر گرفته شدند. در این تحقیق، ویژگی‌های ارتفاع بوته، طول و وزن ریشه، عملکرد گل، محتوی آنتوسیانین، کاروتنوئید، قند محلول، رنگیزه‌های فتوستتزی، محتوی پرولین آزاد و مقدار عصاره در ۱۰۰ گرم گل خشک اندازه‌گیری شد. نتایج نشان داد که خشکی، کود زیستی نیتروژن و اثر برهم‌کنش آنها بر تمام صفات بجز ارتفاع بوته و وزن ریشه تأثیر معنی‌داری داشت ($P < 0.01$). به‌طوری‌که با افزایش سطح خشکی طول ریشه (۱۶٪)، محتوی آنتوسیانین (۲۳٪)، کاروتنوئید (۷۱٪)، قندهای محلول (۳۶٪)، محتوی پرولین (۴۷٪) و رنگیزه‌های فتوستتزی (۶۳٪) افزایش یافت. اما افزایش آنها مانع کاهش عملکرد گل و عصاره نشد، به‌طوری‌که بیشترین میزان عملکرد گل و عصاره در آبیاری مطلوب حاصل شد؛ بنابراین تحت تنش شدید عملکرد گل به ۲۰ درصد و میزان عصاره زمانی حاصل شد که از کود زیستی بصورت بذرمال استفاده شد. ضرایب همبستگی نشان داد که بین عملکرد گل با محتوی آنتوسیانین، کاروتنوئید و رنگیزه‌های فتوستتزی همبستگی منفی و معنی‌داری ($P < 0.01$) وجود دارد. بطور کلی نتایج نشان داد که گیاه همیشه بهار می‌تواند همراه با کاربرد ۲ لیتر کود زیستی نیتروکسین سطوح نسبتاً بالای خشکی (۶/۵ اتمسفر) را تحمل نماید.

واژه‌های کلیدی: همیشه بهار، مقدار عصاره، رنگدانه‌های فتوستتزی، قند محلول، آنتوسیانین، پرولین

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۹۱۲۲۸۷۶۲۹۵۰، پست الکترونیکی: heshmatomidi@yahoo.com

مقدمه

قرار می‌گیرد. به‌طوری‌که عوامل محیطی باعث تغییراتی در رشد گیاهان دارویی و نیز در مقدار و کیفیت مواد مؤثره آن‌ها نظیر آلکالوئیدها، گلیکوزیدها، استروئیدها، روغن‌های فرار (اسانس‌ها) و امثال آن می‌گردد. محصول زراعی یک

گیاهان دارویی مخازن غنی از متابولیت‌های ثانویه یعنی مواد اولیه اساسی بسیاری از داروها می‌باشند. اگرچه مواد مذکور اساساً با هدایت فرایندهای ژنتیکی ساخته می‌شوند، ولی ساخت آنها بطور بارزی تحت تأثیر عوامل محیطی

نگهداری آب و بهبود عملیات آبیاری و قابلیت تحمل گیاه به کمبود آب در کشاورزیست (۳۲).

بطور کلی بقاء گیاه در شرایط تنش مستلزم توانایی آن در برابر شرایط اسمزی شدید حاصل از خشکی می‌باشد (۳). تنظیم اسمزی به‌عنوان جزئی مهم از مکانیسم تحمل به تنش خشکی در گیاهان در نظر گرفته می‌شود (۴ و ۵). گیاهان در شرایط محیطی متفاوت، برای تنظیم پتانسیل اسمزی درون سلول، مواد محلول با وزن مولکولی کم و سازگار را تولید و تجمع می‌دهند (۳). این مواد عموماً شامل اسیدهای آمینه، قندهای محلول و اسیدهای آلی می‌باشد که در بین آنها احتمالاً پرولین گسترده‌ترین نوع اسمولیت است که بنظر می‌رسد تجمع آن در سازگاری به خشکی در بسیاری از گیاهان دخالت دارد (۳ و ۱۴). نقش و اهمیت تجمع قندها نیز به این دلیل می‌باشد که تجمع این مواد سبب تنظیم فشار اسمزی و کاهش از دست دادن آب سلول و نگهداری آماس می‌شود (۵ و ۱۰).

طیف وسیعی از اختلالات مولکولی که منجر به ایجاد آسیب‌های فیزیولوژیکی در گیاهان تحت تنش خشکی می‌شوند را می‌توان ناشی از تولید رادیکال‌های فعال و مخرب اکسیژن دانست. این رادیکال‌ها واکنش‌هایی را هدایت می‌کنند که سبب نابودی DNA، پراکسیداسیون چربی‌ها، تخریب پروتئین‌های غشایی و ماکروپروتئین‌ها در سلول از جمله رنگریزه‌های کلروفیل و آنزیم‌ها می‌شوند (۱۵).

آنتوسیانین موجود در گیاه نیز به‌عنوان گیرنده رادیکال‌های آزاد عمل می‌کند و گیاهان را در برابر تنش‌های اکسیداتیو محافظت می‌کند. آنتوسیانین‌ها در جذب حشرات گرده‌افشان، پراکنندگی دانه، حفاظت در برابر آسیب‌های اشعه ماوراءبنفش نور، و حمله پاتوژن درگیرند. به تازگی، پژوهش در زمینه آنتوسیانین‌ها بدلیل منافع بالقوه آنها در سلامت انسان، از جمله حفاظت در برابر سرطان، التهاب و بیماری‌های عروق کرونر قلب گسترش یافته است (۲۹).

گیاه دارویی از نظر اقتصادی وقتی مقرون به صرفه است که مقدار متابولیت‌های ثانویه آن به حد مطلوب رسیده باشد. در نتیجه با انتخاب عوامل محیطی و ارقام گیاهی مناسب می‌توان به حداکثر مقدار محصول دست یافت (۹).

گیاه دارویی همیشه بهار با نام علمی (*Calendula officinalis* L.)، گیاهی بوته‌ای از خانواده کاسنی (Asteracea) است؛ که به اسامی همیشه بهار باغی، همیشه بار، آذرگون، زبیده و قرمهان معروف می‌باشد (۸). هدف از کشت این گیاه، تولید دارو و مواد مؤثره موجود در گل‌ها و مخصوصاً در گلبرگ‌ها می‌باشد (۳۰).

همیشه بهار در درمان زخم معده و روده (۲۱)، سوختگی، ناراحتی‌های پوستی و درمان کبودی مؤثر است (۲۰). از پماد آن برای درمان زخم، تب‌خال و سرمازدگی (۳۱) و از گل‌های آن به‌عنوان رنگ‌های خوراکی استفاده می‌شود (۲۱).

خشکی یکی از مهمترین عوامل محدودکننده رشد گیاهان در سرتاسر جهان و شایعترین تنش محیطی است (۳ و ۱۶). به خوبی مشخص شده که اثر تنش آبی بر رشد و عملکرد بستگی به ژنوتیپ گیاه دارد (۱۸). اما شرایط محیطی (۳۸) و مدیریت گیاه (۳۴) نیز تعیین کننده عملکرد کمی و کیفی در گیاهان می‌باشد (۲۷). کشور ایران با متوسط بارندگی ۲۴۰ میلی‌متر (معادل یک سوم میانگین جهانی) جزء مناطق خشک و نیمه‌خشک محسوب می‌گردد (۲۳). در نتیجه شرایط محیطی از جمله عوامل تغییر دهنده عملکرد گیاهان می‌باشد (۲۵).

آب یکی از مهمترین عوامل محیطی است که تأثیر عمده‌ای بر رشد و نمو و مواد مؤثره‌ی گیاهان دارویی دارد (۲۵). کمبود آب در جریان تولید گیاهان می‌تواند صدمات فراوانی به رشد و نمو و همچنین بر مواد مؤثره‌ی دارویی گیاهان وارد نماید (۲). شناسایی زمان بحرانی و زمان‌بندی بر مبنای یک برنامه دقیق و اساسی برای گیاه، کلیدی برای

در تولید گیاهان دارویی به سمت استقرار این سیستم و بکارگیری روش‌های مدیریتی آنها می‌باشد که یکی از این روش‌ها، استفاده از کودهای زیستی است.

اگرچه مطالعاتی برای ارزیابی تحمل به خشکی گونه‌های گیاهی انجام شده است، ولی تاکنون بمنظور ارزیابی اثر خشکی و کاربرد کودهای زیستی بر خواص بیوشیمیایی گیاه همیشه بهار پژوهش‌های کمی صورت گرفته است. با توجه به اهمیت این گیاه و نقش آن در تأمین سلامت جامعه، هدف از این تحقیق، بررسی تأثیر خشکی و کاربرد کودزیستی نیتروژن بر ویژگی‌های بیوشیمیایی گیاه دارویی همیشه بهار می‌باشد.

مواد و روشها

به‌منظور بررسی تأثیر تنش خشکی و کود زیستی نیتروژن بر ویژگی‌های بیوشیمیایی گیاه دارویی همیشه بهار (*Calendula officinalis* L.) آزمایشی در مزرعه تحقیقاتی دانشگاه شاهد طی سال زراعی ۹۰-۸۹ انجام شد. مشخصات مزرعه تحقیقاتی در جدول ۱ و ۲ نشان داده شده است.

جدول ۱- مشخصات مزرعه تحقیقاتی دانشکده کشاورزی شاهد

میانگین سالیانه بارندگی (mm)	عرض جغرافیایی	طول جغرافیایی	ارتفاع از سطح دریا (m)	میانگین سالیانه دما (°C)
۲۱۶	۳۴' و ۳۵°	۸' و ۵۱°	۱۱۹۰	۱۷/۱

جدول ۲- خصوصیات فیزیکی و شیمیایی خاک مزرعه تحقیقاتی

Soil T	Texture			K (mg/kg)	P (mg/kg)	N (%)	O.C (%)	اسیدیته (pH)	شوری (dS/m)
	Sand (%)	Silt (%)	Clay (%)						
لومی	۴۴/۰	۳۶/۰	۲۰/۰	۲۷۰	۷/۶	۰/۰۵	۰/۵۷	۷/۷۱	۱/۲

رطوبت خاک در حد ۰/۵ اتمسفر به‌عنوان شاهد (FC) (ظرفیت زراعی))، ۲- پتانسیل رطوبت خاک حدود ۳/۵ اتمسفر به‌عنوان تنش ملایم، ۳- پتانسیل رطوبت خاک حدود ۶/۵ اتمسفر به‌عنوان تنش نسبتاً شدید و ۴- پتانسیل

امروزه بکارگیری جانداران مفید خاک‌زی تحت عنوان کودهای بیولوژیک به‌عنوان طبیعی‌ترین و مطلوبترین راه‌حل برای زنده و فعال نگه داشتن سیستم حیاتی خاک در اراضی کشاورزی مطرح می‌باشد. کودهای زیستی شامل مواد نگهدارنده‌ای با جمعیت متراکم یک یا چند نوع ارگانیسم مفید خاک‌زی و یا بصورت فراورده متابولیکی این موجودات می‌باشند که بمنظور تأمین عناصر غذایی مورد نیاز گیاه در یک اکوسیستم زراعی بکار می‌روند (۶). چنانچه نیتروژن در دسترس، کمتر یا بیشتر از حد مطلوب رشد گیاه باشد، موجب اختلال در فرایندهای حیاتی گیاه می‌شود که ممکن است سبب کاهش تعرق و یا حتی توقف رشد زایشی شود (۳۵).

از آنجایی که تأکید عمده کشاورزی پایدار بر روی افزایش کیفیت و پایداری عملکرد محصولات کشاورزی می‌باشد و نیز مطالعات انجام شده بر روی گیاهان دارویی در اکوسیستم‌های طبیعی و زراعی گویای آن است که استفاده از نظام کشاورزی پایدار بهترین شرایط را برای تولید این گیاهان فراهم می‌آورد و حداکثر عملکرد کمی و کیفی در چنین شرایطی حاصل می‌گردد (۱)؛ بنابراین رویکرد جهانی

این آزمایش بصورت اسپلیت پلات و در قالب طرح پایه بلوک‌های کامل تصادفی و در ۳ تکرار اجرا گردید. فاکتورهای آزمایش شامل ۴ سطح خشکی در مرحله چهارم برگی به بعد به‌عنوان فاکتور اصلی (۱- متوسط پتانسیل

$$C_T = 20.2 (A645) + 8.02 (A663) \times V/1000W$$

$$\text{Carotenoid} = 7.6 (A480) - 14.9 (A510) \times V/1000W$$

برای عصاره‌گیری از گیاه، ۱۰۰ گرم از پودر خشک گل را در ۱ لیتر اتانول ۸۰ درصد بمدت ۴۸ ساعت خیسانده و پس از سانتریفیوژ، عصاره الکلی حاصل را در پتری قرار داده تا اتانول آن تبخیر شود؛ اختلاف بین وزن پتری حاوی عصاره و پتری خالی وزن عصاره را نشان داد.

غلظت آنتوسیانین به روش Wanger (1979) اندازه گرفته شد. برای سنجش میزان آنتوسیانین ۰/۱ گرم برگ تر با دقت وزن شده، در هاونی که حاوی ۵ میلی لیتر متانول اسیدی (متانول ۹۹/۵ اسید کلریدریک خالص به نسبت ۹۹ به ۱) بود، خوب ساییده شد. سپس ۵ میلی لیتر دیگر متانول اسیدی به آن اضافه شد. عصاره حاصل به لوله آزمایش در پیچ‌دار منتقل گردید و درب آن محکم بسته شد و بمدت ۲۴ ساعت در تاریکی در دمای آزمایشگاه قرار گرفت و عصاره حاصل پس از ۲۴ ساعت بمدت ۱۰ دقیقه با دور ۴۰۰۰g سانتریفوژ گردید. ۳ میلی لیتر از محلول رویی را در کووت ریخته و شدت جذب آن در طول موج ۵۵۰ نانومتر توسط اسپکتروفتومتر خوانده شد. برای محاسبه غلظت آنتوسیانین از ضریب خاموشی معادل $1 \text{ cm}^{-1} \text{ mM}^{-1}$ استفاده شد. برای محاسبه غلظت با استفاده از ضریب خاموشی از رابطه زیر استفاده شد. در این فرمول A میزان جذب خوانده شده در ۵۵۰ نانومتر، ε ضریب خاموشی و B عرض کووت (۱ cm) می‌باشد.

$$A = \epsilon BC$$

برای اندازه‌گیری کربوهیدرات‌های محلول، ۰/۱ میلی‌لیتر عصاره الکلی با ۳ میلی‌لیتر آنترون تازه تهیه شده (۱۵۰ میلی‌گرم آنترون + ۱۰۰ میلی‌لیتر سولفوریک اسید ۷۲٪) مخلوط گردید. این محلول ده دقیقه در حمام آب‌جوش قرار داده شد تا واکنش انجام و رنگی شود، سپس میزان جذب آن با اسپکتروفتومتر در طول موج ۶۲۵ نانومتر قرائت و مقدار قندهای محلول محاسبه شد (۳۳).

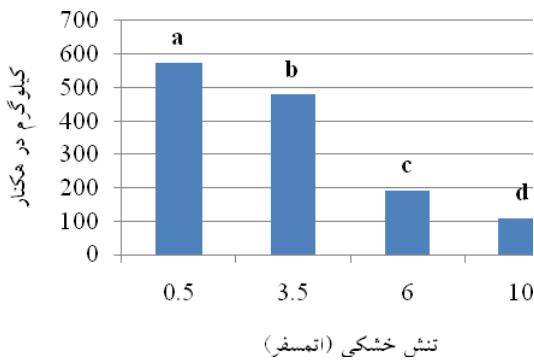
رطوبت خاک حدود ۱۰ اتمسفر به‌عنوان تنش شدید) و روش استفاده از کود زیستی نیتروژن به‌عنوان فاکتور فرعی (۱- شاهد (بدون اعمال تیمار)، ۲- اختلاط دو لیتر کود زیستی نیتروژن همراه با آب آبیاری و ۳- کاربرد دو لیتر کود زیستی نیتروژن بصورت بذرمال) بود.

در نیمه دوم اردیبهشت ماه ۱۳۹۰، در کرت‌هایی به مساحت ۶ متر مربع، با آرایش کاشت 40×15 ، تمام کرت-های گیاه همیشه بهار بطور همزمان کشت شدند. فاصله هر کرت با کرت مجاور ۱ متر در نظر گرفته شد. از آنجایی‌که در سال اول حداکثر ۳۰ درصد نیتروژن مورد نیاز گیاه توسط نیتروکسین قابل تأمین است، بنابراین با توجه به کمبود نیتروژن خاک، مقدار ۲۴۰ کیلوگرم در هکتار نیتروژن و ۳۳۰ کیلوگرم سوپر فسفات تریپل به مزرعه داده شد. در مرحله ۴ برگی، اعمال سطوح تنش شروع شد. اعمال تیمار نیتروکسین نیز بصورت تقسیط در مرحله ۸ برگی به بعد بمنظور کارایی بیشتر انجام گردید. به‌منظور کاربرد کود زیستی بصورت پیش تیمار بذرمال قبل از کشت، بذرها با کود زیستی حاوی باکتری‌های نیتروژنه بمدت ۲۴ ساعت در دمای ۱۷ درجه سانتیگراد خیس شدند، سپس نگهداری و پس از کاهش رطوبت اقدام به کشت آنها گردید. در طی آزمایش عملیات معمولی زراعی شامل تنک کردن، وجین، سله‌شکنی و مبارزه با آفات انجام و تا زمان سبز شدن کامل گیاهان تمام کرت‌ها بطور یکنواخت آبیاری شد. البته از زمان گلدهی کامل نیز گل‌ها در سه چین برداشت شدند.

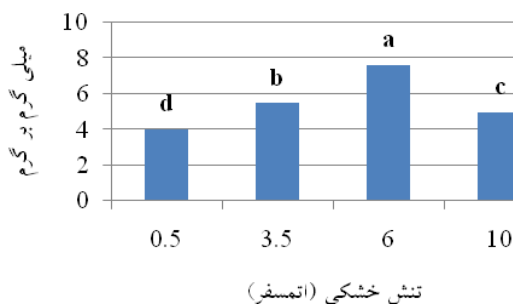
ارتفاع بوته و طول ریشه با استفاده از خط‌کش میلی‌متری محاسبه شد. برای اندازه‌گیری پرولین از روش Bates (1973) و برای تعیین میزان کلروفیل a، b و کل و محتوی کاروتنوئید بر حسب میلی‌گرم بر گرم وزن تر برگ از روش Arnon (1949) استفاده شد. در این رابطه، V حجم محلول و W وزن نمونه برگ می‌باشد.

$$C_a = 12.7 (A663) - 2.69 (A645) \times V/1000W$$

$$C_b = 22.9 (A645) - 2.69 (A663) \times V/1000W$$



نمودار ۱- تاثیر تنش خشکی بر عملکرد گل



نمودار ۲- تاثیر تنش خشکی بر محتوی پروکلین

وزن ریشه: نتایج نشان داد که خشکی بر وزن ریشه معنی-دار ($P<0.01$) است (جدول ۳). با افزایش خشکی تا تنش نسبتاً شدید بر وزن ریشه افزوده شد اما در تنش شدید مجدداً کاهش یافت (جدول ۴). جدول اثر متقابل تنش و کاربرد نیتروکسین نیز نشان داد که بیشترین وزن ریشه در تنش نسبتاً شدید و در هر ۳ سطح نیتروکسین حاصل می‌شود (جدول ۶). البته بین وزن ریشه و محتوی قندهای محلول، کلروفیل b و کلروفیل کل همبستگی مثبت و معنی‌داری وجود داشت (جدول ۷).

عملکرد گل: عملکرد گل تحت تأثیر تنش خشکی قرار گرفت ($P<0.01$) به‌طوری که بالاترین عملکرد گل ($574/46$ کیلوگرم در هکتار) در شرایط مطلوب حاصل شد (جدول ۳ و نمودار ۱).

تجزیه واریانس داده‌ها با نرم‌افزار آماری SAS و مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون LSD در سطح احتمال پنج درصد انجام گردید.

نتایج

ارتفاع بوته: خشکی و اثر برهم‌کنش آن با کاربرد نیتروکسین تأثیر معنی‌داری ($P<0.01$) بر ارتفاع بوته داشت (جدول ۳)؛ به‌طوری‌که بیشترین ارتفاع بوته در تنش ملایم (۲۷/۱۱ سانتیمتر) و کمترین آن در تنش شدید (۱۹/۵۵ سانتیمتر) مشاهده شد. با این حال، نتایج تفاوت معنی‌داری را بین شاهد و سطوح میانی خشکی نشان نداد (جدول ۴). همچنین در شرایط بدون تنش و تنش ملایم، استفاده از کود نیتروکسین همراه با آب آبیاری مفید بود (جدول ۶). همبستگی بین ارتفاع بوته با طول ریشه ($P<0.05$) و کلروفیل a ($P<0.01$) منفی و با عملکرد گل ($P<0.05$) مثبت و معنی‌دار بود (جدول ۷).

طول ریشه: خشکی، کاربرد نیتروکسین و اثر متقابل آنها بر طول ریشه گیاه تأثیر معنی‌داری ($P<0.01$) داشت (جدول ۳). نتایج نشان داد که با افزایش تنش طول ریشه نیز افزایش می‌یابد؛ به‌طوری‌که بیشترین و کمترین طول ریشه به‌ترتیب در تنش شدید (۲۱/۲۱ سانتی‌متر) و آبیاری مطلوب (۱۷/۷۳ سانتی‌متر) حاصل شد (جدول ۴). کاربرد کود نیتروکسین نیز همراه با آب آبیاری باعث افزایش طول ریشه (۲۰/۵۷ سانتی‌متر) شد؛ اما با عدم مصرف نیتروکسین تفاوت معنی‌داری نداشت (جدول ۵). البته اثر متقابل نشان داد که در تنش نسبتاً شدید و عدم کاربرد کود، بیشترین طول ریشه (۲۳/۱۶ سانتی‌متر) حاصل می‌شود (جدول ۶). جدول ضرایب همبستگی نشان داد که طول ریشه با عملکرد گل و درصد عصاره همبستگی منفی و با آنتوسیانین، کاروتنوئید و کلروفیل a همبستگی مثبت و معنی‌داری ($P<0.01$) دارد (جدول ۷).

جدول ۳- تجزیه واریانس میانگین مربعات ویژگی های زراعی همیشه بهار در سطوح مختلف خشکی و کود زیستی.

عصاره گل خشک (/)	محتوی پروبین	محتوی رنگیزه‌های فتوسنتزی			قندهای محلول	کارتنوئید	آنتوسیانین	عملکرد گل	وزن خشک ریشه	طول ریشه	ارتفاع بوته	درجه آزادی	منابع تغییر
		a+b	a	b									
۰/۳۳	۰/۱۷	۰/۰۰	۰/۰۰	۰/۰۰	۳۵۹۳۷/۱۰ ^{۰۰}	۰/۰۱	۰/۰۰	۹۱۷/۷۸	۱/۸۳ ^{۰۰}	۰/۳۴	۵/۴۴	۲	تکرار
۲۰/۱۵۰ ^{۰۰}	۲۰/۸۱ ^{۰۰}	۲۵۶/۶۷ ^{۰۰}	۱۲۰/۱۷ ^{۰۰}	۱۵۴/۸۰ ^{۰۰}	۱۱۳/۳۵ ^{۰۰}	۹/۱۶ ^{۰۰}	۱/۵۷ ^{۰۰}	۴۱۰۵۰۸/۰۸ ^{۰۰}	۱/۱۴ ^{۰۰}	۲۱/۳۷ ^{۰۰}	۹۶/۳۳ ^{۰۰}	۳	خشکی
۰/۰۳	۰/۰۸	۰/۰۰۳	۰/۰۰۲	۰/۰۰۲	۴۶۹۹/۱۳ ^{۰۰}	۰/۰۰۴	۰/۰۰	۹۷۲/۱۳	۰/۸۳ ^{۰۰}	۱/۵۰	۱۳/۸۸ ^۰	۶	خطا
۹۵/۳۴ ^{۰۰}	۵/۲۶ ^{۰۰}	۴۱/۶۵ ^{۰۰}	۲۷/۶۳ ^{۰۰}	۳۵/۴۸ ^{۰۰}	۳۵۰/۳۹ ^{۰۰}	۹/۳۴ ^{۰۰}	۰/۹۹ ^{۰۰}	۱۲۲۷۶۸/۹۸ ^{۰۰}	۰/۰۰۷	۳۰/۰۱ ^{۰۰}	۰/۳۶	۲	نیتروکسین
۶۰/۰۴ ^{۰۰}	۲۸۸۴ ^{۰۰}	۳۳/۱۱ ^{۰۰}	۹/۶۶ ^{۰۰}	۱۲/۴۶ ^{۰۰}	۵۷/۱۷ ^{۰۰}	۳/۶۰ ^{۰۰}	۱/۲۲ ^{۰۰}	۲۱۳۶۴/۹۱ ^{۰۰}	۰/۰۰۲	۱۶/۸۴ ^{۰۰}	۵۴/۱۳ ^{۰۰}	۶	خشکی * نیتروکسین
۰/۲۷	۰/۰۶	۰/۰۰۲	۰/۰۰۱	۰/۰۰۱	۴۱/۲۱	۰/۰۰۵	۰/۰۰	۸۲۶/۸۸	۰/۰۰۳	۰/۹۲	۳/۹	۱۶	خطا

۱۵

* و ** به ترتیب معنی دار در سطح احتمال ۵ و ۱ درصد

جدول ۴- مقایسه میانگین ویژگی های زراعی و کیفی همیشه بهار تحت تاثیر خشکی

عصاره گل خشک (/)	محتوی رنگیزه‌های فتوسنتزی			محل (mg/g)	قندهای محلول (mg/g)	کارتنوئید (mg/g)	آنتوسیانین (mM/g)	وزن خشک (g)	طول ریشه (cm)	طول بوته (cm)	ارتفاع بوته (cm)	میزان تنش (atm)
	a+b	a	b									
۲۷/۷۹a	۱۱/۷۵d	۵/۱۴d	۵/۸۴d	۱۶۷/۲۹b	۲/۱۶c	۳/۱۱d	۱/۰۸c	۱۷/۷۳c	۲۵/۲۲a	۱۷/۳۳c	۲۵/۲۲a	آیاری مطلوب (۰/۵)
۱۱/۴۰d	۱۷/۷۱c	۸/۱۳c	۹/۲۴c	۱۶۵/۶۳b	۰/۹۶d	۳/۴۷c	۱/۴۲b	۱۸/۴۷c	۲۷/۱۱a	۱۸/۴۷c	۲۷/۱۱a	تنش ملایم (۳/۵)
۱۷/۹۶b	۲۷/۶۴a	۱۳/۹۲a	۱۵/۸۱a	۲۶۰/۴۲a	۲/۶۵b	۳/۸۹b	۱/۸۵a	۱۹/۹۸b	۲۵/۲۲a	۱۹/۹۸b	۲۵/۲۲a	تنش نسبتاً شدید (۶)
۱۵/۸۱c	۲۴/۶۲b	۹/۴۱b	۱۰/۶۹b	۱۶۵/۹۴b	۳/۳۶a	۴/۰۲a	۱/۱۲c	۲۱/۲۱a	۱۹/۵۵b	۲۱/۲۱a	۱۹/۵۵b	تنش شدید (۱۰)

میانگین های دارای حروف مشترک در هر ستون مطابق آزمون چند دامنه ای دانکن در سطح ۵ درصد اختلاف معنی دار ندارند

جدول ۵- مقایسه میانگین ویژگی‌های زراعی و کیفی همیشه بهار تحت تاثیر کود زیستی

نوع کود زیستی نیتروژنه	ارتفاع (cm)	طول ریشه (cm)	وزن خشک (g)	عملکرد گل (kg/ha)	آنتوسیانین (mM/g)	محتوی رنگیزه‌های فتوسنتزی			ارتفاع (cm)	طول ریشه (cm)	وزن خشک (g)	عملکرد گل (kg/ha)	آنتوسیانین (mM/g)	کاروتنوئید (mg/g)	قندمای محلول (mg/g)
						a+b	a	b							
بدون کود زیستی	۲۴/۰۸۸	۱۹/۹۱۸	۱/۳۹۸	۲۹۷/۱۵۵	۳/۳۳۴	۳/۲۹۸	۱۸۲/۲۹۵	۱۰/۷۵۸	۹/۸۹۵	۸/۶۸۵	۲۰/۶۲۵	۵/۶۲۵	۱۳/۷۴	۲/۰۶۲	۱۸۴/۵۸
بدرمال دولیتروکودزیستی	۲۴/۴۱۸	۱۷/۵۶۵	۱/۳۸۸	۴۴۶/۱۲۸	۳/۶۲۵	۱/۶۵۴	۱۹۰/۱۱۸	۹/۸۷۵	۱۲/۳۲۸	۱۰/۸۵۸	۲۲/۱۹۸	۶/۱۵۸	۱۸/۷۸۸	۲/۰۶۲	۱۸۴/۵۸
دولیتروکودزیستی با آبیاری	۲۴/۳۳۸	۲۰/۵۷۸	۱/۳۳۸	۲۵۳/۱۱۴	۳/۹۱۸	۱/۹۱۵	۱۹۵/۰۹۸	۹/۰۰۴	۷/۹۳۴	۱۸/۴۸۴	۲/۸۲۴	۱۸/۴۵۸	۲/۸۲۴	۷/۹۳۴	۱۸/۴۵۸

میانگین‌های دارای حروف مشترک در هر ستون مطابق آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح ۵ درصد اختلاف معنی‌دار ندارند

جدول ۶- مقایسه میانگین برهمکنش کاربرد کود زیستی و خشکی بر ویژگی‌های زراعی و کیفی همیشه بهار

نوع کود زیستی	کاربرد کود زیستی (لیتر در هکتار)	ارتفاع (cm)	طول ریشه (cm)	وزن خشک (g)	عملکرد گل (kg/ha)	آنتوسیانین (mM/g)	کاروتنوئید (mg/g)	قندمای محلول (mg/g)	محتوی رنگیزه‌های فتوسنتزی			ارتفاع (cm)	طول ریشه (cm)	وزن خشک (g)	عملکرد گل (kg/ha)	آنتوسیانین (mM/g)	کاروتنوئید (mg/g)	قندمای محلول (mg/g)	محتوی پروتئین (%)	خشک‌گلی (%)	
									a+b	a	b										
بدون نیتروکسین	۲ لیتر بدرمال	۲۱/۶۶۵	۱۸/۰۰۵	۱/۰۵۴	۴۵۷/۶۵۴	۳/۰۴۱	۲/۷۷۴	۱۶۵/۰۷۴	۹/۱۳۴	۸/۰۷۸	۷/۱۰۸	۴/۵۲۵	۲۱/۸۱۴	۲/۰۶۲	۱۸۴/۵۸	۲/۰۶۲	۱۸۲/۲۹۵	۱۰/۷۵۸	۹/۸۹۵	۱۳/۷۴	۲/۰۶۲
		۲۴/۶۶۵	۱۴/۵۶۴	۱/۱۶۵	۷۸۰/۷۳۸	۲/۶۷۴	۰/۹۳۸	۱۶۵/۷۹۴	۲/۸۸۴	۶/۳۳۴	۵/۶۲۴	۱۱/۶۶۴	۲۲/۳۳۴	۲/۰۶۲	۱۸۴/۵۸	۲/۰۶۲	۱۸۲/۲۹۵	۱۰/۷۵۸	۹/۸۹۵	۱۳/۷۴	۲/۰۶۲
۲ لیتر همراه با آبیاری	۲ لیتر همراه با آبیاری	۲۹/۳۳۸	۲۰/۶۳۴	۱/۰۳۴	۴۰۴/۰۰۵	۳/۶۲۴	۲/۷۸۴	۱۷۱/۰۱۴	۳/۷۴۱	۳/۰۶۱	۲/۶۹۱	۲/۷۶۵	۲۲/۲۲۸	۲/۰۶۲	۱۸۴/۵۸	۲/۰۶۲	۱۸۲/۲۹۵	۱۰/۷۵۸	۹/۸۹۵	۱۳/۷۴	۲/۰۶۲
		۳۰/۳۳۸	۱۶/۰۰۴	۱/۲۷۵	۴۸۲/۴۸۴	۲/۸۲۴	۰/۹۸۸	۱۶۳/۹۹۴	۸/۱۶۴	۶/۹۲۴	۶/۰۹۲	۱۵/۰۰۴	۲/۶۵۵	۲۲/۲۲۸	۲/۰۶۲	۱۸۴/۵۸	۲/۰۶۲	۱۸۲/۲۹۵	۱۰/۷۵۸	۹/۸۹۵	۱۳/۷۴
بدون نیتروکسین	۲ لیتر بدرمال	۲۳/۶۶۵	۱۸/۵۰۵	۱/۵۲۵	۵۹۸/۷۱۵	۳/۸۱۸	۰/۵۱۱	۱۶۶/۲۶۵	۸/۲۲۱	۱۳/۶۳۵	۱۲/۰۱۵	۲۱/۸۶۴	۱۱/۶۳۴	۲۲/۳۳۴	۲/۰۶۲	۱۸۴/۵۸	۲/۰۶۲	۱۸۲/۲۹۵	۱۰/۷۵۸	۹/۸۹۵	۱۳/۷۴
		۲۷/۳۳۸	۲۰/۹۲۵	۱/۲۹۵	۳۵۲/۹۷۴	۴/۶۶۸	۱/۴۰۴	۱۶۶/۷۳۴	۹/۰۰۸	۶/۳۱۱	۷/۱۸۱	۱۶/۸۸۱	۷/۷۶۵	۲۲/۳۳۴	۲/۰۶۲	۱۸۴/۵۸	۲/۰۶۲	۱۸۲/۲۹۵	۱۰/۷۵۸	۹/۸۹۵	۱۳/۷۴
بدون نیتروکسین	۲ لیتر همراه با آبیاری	۲۶/۳۳۴	۲۲/۱۶۸	۱/۹۳۸	۱۳۱/۶۸۸	۳/۹۶۵	۳/۷۱۵	۲۵۱/۹۲۵	۱۲/۹۶۴	۱۴/۷۵۴	۱۲/۸۷۴	۲۷/۰۶۷۸	۲۲/۳۳۴	۲/۰۶۲	۱۸۴/۵۸	۲/۰۶۲	۱۸۲/۲۹۵	۱۰/۷۵۸	۹/۸۹۵	۱۳/۷۴	۲/۰۶۲
		۲۶/۳۳۴	۱۸/۰۰۴	۱/۱۰۴	۱۱۴/۸۱۸	۳/۵۲۴	۵/۷۲۸	۱۵۶/۲۹۵	۱۲/۷۷۵	۹/۷۲۴	۸/۵۵۴	۲۲/۲۹۴	۸/۵۲۵	۲۲/۳۳۴	۲/۰۶۲	۱۸۴/۵۸	۲/۰۶۲	۱۸۲/۲۹۵	۱۰/۷۵۸	۹/۸۹۵	۱۳/۷۴
بدون نیتروکسین	۲ لیتر بدرمال	۲۴/۰۰۵	۱۸/۲۲۵	۱/۷۵۵	۲۵۹/۱۵۴	۴/۶۶۸	۲/۴۵۵	۲۵۸/۰۰۵	۱۱/۶۶۴	۱۷/۵۷۸	۱۱/۶۶۴	۲۹/۲۱۸	۲۲/۳۳۴	۲/۰۶۲	۱۸۴/۵۸	۲/۰۶۲	۱۸۲/۲۹۵	۱۰/۷۵۸	۹/۸۹۵	۱۳/۷۴	۲/۰۶۲
		۲۵/۳۳۴	۱۸/۹۶۵	۱/۰۹۴	۱۶۵/۸۹۸	۴/۳۳۴	۲/۷۷۴	۱۶۹/۵۸۴	۱۴/۷۳۸	۱۱/۶۶۴	۱۰/۳۰۴	۲۶/۳۳۴	۲۲/۳۳۴	۲/۰۶۲	۱۸۴/۵۸	۲/۰۶۲	۱۸۲/۲۹۵	۱۰/۷۵۸	۹/۸۹۵	۱۳/۷۴	۲/۰۶۲
شدید (۶)	۲ لیتر همراه با آبیاری	۲۵/۳۳۴	۱۸/۵۶۵	۱/۸۸۸	۱۸۷/۸۸۴	۳/۷۵۴	۱/۸۱۴	۱۷۰/۶۷۸	۱۰/۸۷۴	۱۵/۱۲۵	۱۰/۶۷۴	۲۴/۹۳۴	۲۲/۳۳۴	۲/۰۶۲	۱۸۴/۵۸	۲/۰۶۲	۱۸۲/۲۹۵	۱۰/۷۵۸	۹/۸۹۵	۱۳/۷۴	۲/۰۶۲
		۱۸/۰۰۴	۲۲/۵۰۸	۱/۱۰۴	۱۱۴/۸۱۸	۳/۵۲۴	۵/۷۲۸	۱۵۶/۲۹۵	۱۲/۷۷۵	۹/۷۲۴	۸/۵۵۴	۲۲/۲۹۴	۸/۵۲۵	۲۲/۳۳۴	۲/۰۶۲	۱۸۴/۵۸	۲/۰۶۲	۱۸۲/۲۹۵	۱۰/۷۵۸	۹/۸۹۵	۱۳/۷۴
شدید (۱۰)	۲ لیتر بدرمال	۲۵/۳۳۴	۱۸/۹۶۵	۱/۰۹۴	۱۶۵/۸۹۸	۴/۳۳۴	۲/۷۷۴	۱۶۹/۵۸۴	۱۴/۷۳۸	۱۱/۶۶۴	۱۰/۳۰۴	۲۶/۳۳۴	۲۲/۳۳۴	۲/۰۶۲	۱۸۴/۵۸	۲/۰۶۲	۱۸۲/۲۹۵	۱۰/۷۵۸	۹/۸۹۵	۱۳/۷۴	۲/۰۶۲
		۱۵/۳۳۴	۲۲/۱۶۸	۱/۱۷۵	۱۶۷/۵۸۱	۴/۳۳۴	۱/۶۵۴	۱۷۱/۹۶۴	۱۴/۲۷۵	۱۰/۶۷۴	۹/۳۹۴	۲۴/۹۳۴	۲۲/۳۳۴	۲/۰۶۲	۱۸۴/۵۸	۲/۰۶۲	۱۸۲/۲۹۵	۱۰/۷۵۸	۹/۸۹۵	۱۳/۷۴	۲/۰۶۲

میانگین‌های دارای حروف مشترک در هر ستون مطابق آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح ۵ درصد اختلاف معنی‌دار ندارند

جدول ۷ - ضرایب همبستگی بین صفات مورد مطالعه در همیشه بهار تحت تنش خشکی و کود زیستی

	۱	۲	۳	۴	۵	۶	۷	۸	۹	۱۰	۱۱	۱۲
۱. ارتفاع بوته	۱											
۲. طول ریشه	-۰/۳۵*	۱										
۳. وزن خشک ریشه	۰/۰۹	۰/۱۴	۱									
۴. عملکرد گل	۰/۳۳*	-۰/۸۲**	-۰/۰۹	۱								
۵. آنتوسیانین	-۰/۱۶	۰/۵۹**	۰/۰۳	-۰/۶۸**	۱							
۶. کاروتنوئید	-۰/۲۸	۰/۵۸**	-۰/۰۶	-۰/۵۹**	۰/۲۳	۱						
۷. قندهای محلول	۰/۱۱	۰/۱۱	۰/۵۵**	-۰/۲۳	۰/۱۵	۰/۰۶	۱					
۸. کلروفیل a	-۰/۴۷**	۰/۴۸**	۰/۱۲	-۰/۸۳**	۰/۵۸**	۰/۴۱*	۰/۱۷	۱				
۹. کلروفیل b	-۰/۲۲	۰/۱۵	۰/۴۰*	-۰/۴۳**	۰/۳۳*	۰/۰۸	۰/۴۵**	۰/۶۴**	۱			
۱۰. کلروفیل کل	-۰/۲۲	۰/۱۵	۰/۴۰*	-۰/۴۳**	۰/۳۳*	۰/۰۸	۰/۴۵**	۰/۶۴**	۱/۰۰**	۱		
۱۱. محتوی پروتئین a+b	-۰/۳۶*	۰/۳۳*	۰/۳۰	-۰/۶۷**	۰/۴۹**	۰/۲۵	۰/۳۶*	۰/۸۸**	۰/۹۲**	۰/۹۲**	۱	
۱۲. در صد عصاره گل	-۰/۰۴	۰/۱۳	۰/۱۴	-۰/۲۰	۰/۴۶**	۰/۳۱	۰/۱۹	۰/۱۵	۰/۳۵*	۰/۳۵*	۰/۲۹	۱
	-۰/۰۲	-۰/۳۳*	-۰/۱۲	۰/۱۶	-۰/۱۰	۰/۰۵	۰/۰۹	-۰/۳۳*	-۰/۱۰	-۰/۱۰	-۰/۲۳	۰/۱۷

* و ** به ترتیب نشانه عدم همبستگی و همبستگی معنی دار در سطح احتمال ۵ و ۱ درصد

کاربرد نیتروکسین بر عملکرد گل تأثیر معنی‌داری گذاشت؛ به‌طوری‌که با مصرف نیتروکسین بصورت بذرمال بیشترین عملکرد حاصل شد (جدول ۵). اثر برهم‌کنش دو تیمار نیز همین نتایج را نشان می‌داد و در شرایط مطلوب آبیاری و کاربرد نیتروکسین بصورت بذرمال بیشترین عملکرد حاصل شد (جدول ۶). جدول ضرایب همبستگی نشان داد که بین عملکرد گل و محتوی آنتوسیانین، کاروتنوئید و رنگیزه‌های فتوستتزی همبستگی منفی و معنی‌داری ($P < 0.01$) وجود دارد (جدول ۷).

محتوی آنتوسیانین: خشکی، کاربرد نیتروکسین و اثر متقابل آنها بر محتوی آنتوسیانین اثر معنی‌داری ($P < 0.01$) داشت (جدول ۳)؛ به‌طوری‌که بیشترین ($4/02$ میلی‌مولار بر گرم وزن تر) و کمترین ($3/11$ میلی‌مولار بر گرم وزن تر) میزان به‌ترتیب در تنش شدید و آبیاری مطلوب حاصل شد (جدول ۴). همچنین کاربرد نیتروکسین همراه با آب آبیاری باعث افزایش آنتوسیانین در گیاه نسبت به بقیه تیمارهای کودی شد (جدول ۵). اثر متقابل نیز نشان داد که تنش نسبتاً شدید همراه با کاربرد نیتروکسین بصورت بذرمال سبب تولید بیشترین میزان آنتوسیانین در برگ شد (جدول ۶). افزایش محتوی آنتوسیانین برگ گیاه باعث افزایش محتوی رنگیزه‌های فتوستتزی و پرولین شده و بین آنها همبستگی مثبت و معنی‌داری وجود داشت (جدول ۷).

محتوی رنگیزه‌های فتوستتزی: نتایج نشان داد که تنش خشکی، کاربرد نیتروکسین و اثر متقابل آنها تأثیر معنی‌داری ($P < 0.01$) بر محتوی رنگیزه‌های فتوستتزی داشت (جدول ۳)؛ به‌طوری‌که بیشترین مقدار کلروفیل a در تنش شدید ($13/92$ میلی‌گرم بر گرم وزن تر برگ) و بیشترین مقدار کلروفیل b و کلروفیل کل در تنش نسبتاً شدید حاصل شد. کمترین محتوی رنگیزه‌های فتوستتزی نیز در آبیاری مطلوب حاصل شد (جدول ۴). با مصرف نیتروکسین همراه با آب آبیاری کمترین محتوی رنگیزه‌های فتوستتزی حاصل شد (جدول ۵). اثر برهم‌کنش دو تیمار هم نشان داد که کلروفیل a در تنش شدید با مصرف نیتروکسین بصورت بذرمال و کلروفیل b و کلروفیل کل در تنش نسبتاً شدید با همان تیمار کودی، به بیشترین میزان رسید (جدول ۶).

محتوی پرولین: محتوی پرولین تحت تأثیر تنش خشکی ($P < 0.01$) قرار گرفت (جدول ۳) و با افزایش تنش تا سطح نسبتاً شدید افزایش یافت، اما پس از آن بطور معنی‌داری کاهش نشان داد (نمودار ۲). کاربرد نیتروکسین نیز تأثیر معنی‌داری ($P < 0.01$) بر محتوی پرولین داشت و استفاده بصورت بذرمال، بیشترین میزان پرولین ($6/15$ میلی‌گرم بر گرم وزن تر برگ) را در گیاه ایجاد کرد

محتوی کاروتنوئید: تنش خشکی، کاربرد نیتروکسین و اثر متقابل آنها بر محتوی کاروتنوئید گلبرگ‌ها ($P < 0.01$) معنی‌دار بود (جدول ۳) و بیشترین میزان آن در تنش شدید ($3/36$ میلی‌گرم بر گرم وزن تر گلبرگ) و کمترین میزان در تنش ملایم ($0/96$ میلی‌گرم بر گرم وزن تر گلبرگ) حاصل شد (جدول ۴). عدم کاربرد نیتروکسین نیز باعث افزایش کاروتنوئید شد (جدول ۵).

محتوی قندهای محلول: نتایج نشان داد که آزمایش بر محتوی قندهای محلول تأثیر معنی‌داری ($P < 0.01$) داشت (جدول ۳). بیشترین میزان قند در تنش نسبتاً شدید

بیشترین عملکرد کل گل در شرایط مطلوب آبیاری حاصل شد و با افزایش تنش خشکی عملکرد گل کاهش یافت (جدول ۳ و ۴)؛ بنظر می‌رسد که کاهش مواد فتوسنتزی به علت کاهش سطح برگ و انتقال مواد آسمیلاتی به سمت گل‌ها سبب کاهش وزن آنها شده است. این نتایج با نتایج Shubhra و همکاران (2004) بر همیشه بهار مطابقت دارد.

کاربرد نیتروکسین نیز بر عملکرد گل مؤثر بود و بیشترین عملکرد با مصرف نیتروکسین بصورت بذرمال حاصل شد (جدول ۳ و ۵). نتیجه آزمایش فریبرزی (۱۳۷۸) روی گیاه بابونه نشان داد که اثر نیتروژن روی عملکرد گل بابونه در سطح ۵ درصد معنی‌دار بود. Kapoor و همکاران (2004) هم گزارش کردند که همزیستی رازیانه با دو گونه قارچ VAM بطور معنی‌داری سبب بهبود عملکرد و اجزای عملکرد رازیانه شد. به‌رحال تحریک رشد گیاهان توسط باکتری‌های ریزوسفری از طریق تثبیت اتمسفر، افزایش قابلیت دسترسی عناصر غذایی در ناحیه ریزوسفر، افزایش سطح تماس ریشه، تولید تنظیم‌کننده‌های رشد و بهبود همزیستی مفید با گیاه میزبان در مراحل مختلف رشد انجام می‌گیرد.

آنتوسیانین‌ها رنگدانه‌هایی محلول در آب هستند که متعلق به خانواده فلاونوئیدها می‌باشند. تحقیق حاضر نشان داد که با افزایش تنش خشکی میزان آنتوسیانین در گیاه زیاد می‌شود (جدول ۴). تحقیقات نیز نشان می‌دهد که این رنگدانه در برابر استرس‌های محیطی مانند اشعه ماوراءبنفش، خشکی و درجه حرارت پایین افزایش می‌یابد و گیاه را در برابر رادیکال‌های آزاد محافظت می‌کند (۳۷). این نتایج با نتایج آزمایش‌ها بر روی سیب‌زمینی (۴۰) و نیز گیاه *Cistus clusii* (۲۲) در یک راستاست. در واقع، این نتایج نشان‌دهنده افزایش مسیر اصلی تولید فلاونوئید است که منجر به تولید آنتوسیانین می‌شود (۴۰).

نتایج نشان داد با افزایش تنش تا تنش نسبتاً شدید بر میزان کاروتنوئید گلبرگ‌ها افزوده شد (جدول ۴). از جمله

(جدول ۵)؛ همچنین جدول مقایسه میانگین اثرات برهم‌کنش تیمارها نشان داد که بیشترین میزان پرولین در تنش نسبتاً شدید و استفاده از نیتروکسین بصورت بذرمال حاصل شد (جدول ۶).

مقدار عصاره در ۱۰۰ گرم گل خشک (درصد عصاره گل خشک): تجزیه واریانس نشان داد که خشکی، کاربرد نیتروکسین و اثر برهم‌کنش آنها بر مقدار عصاره گل تأثیر معنی‌داری ($P < 0.01$) داشت. به‌طوری‌که بیشترین و کمترین مقدار آن به‌ترتیب در شرایط مطلوب آبیاری (۲۲/۷۹ درصد) و تنش ملایم (۱۱/۴۰ درصد) حاصل شد (جدول ۳ و ۴). همچنین بهترین روش استفاده از نیتروکسین، بصورت بذرمال بود؛ اما بین تیمار بذرمال و استفاده از نیتروکسین با آب آبیاری تفاوت معنی‌داری وجود نداشت (جدول ۵). اثر برهم‌کنش آنها نیز نشان داد که بهترین تیمار آبیاری بصورت مطلوب و استفاده از نیتروکسین با آب آبیاری است؛ اما بین این ترکیب و استفاده از نیتروکسین بصورت بذرمال تنش نسبتاً شدید تفاوت معنی‌داری وجود نداشت (جدول ۶).

بحث

نتایج نشان داد که تنش خشکی تا حدی باعث افزایش ارتفاع بوته و بعد باعث کاهش آن می‌شود. اما طول ریشه با افزایش تنش افزایش یافت (جدول ۴). ریشه به‌عنوان جزء اصلی گیاه در استقرار و پایداری آن از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. اثرات نامطلوب خشکی بر رشد گیاهان می‌تواند با توسعه ریشه جبران شده و باعث افزایش جذب آب توسط گیاه شود. این فرایند با عمیق‌تر شدن ریشه‌ها، تغییر توزیع سیستم ریشه و یا تغییر اندازه آوندهای ریشه صورت می‌گیرد (۷). این نتایج با نتایج راد و همکاران (۱۳۸۷) روی گیاه تاغ مطابقت داشت، اما علی‌آبادی و همکاران (۱۳۸۷) نشان دادند که طول ریشه گیاه گشنیز در تنش خشکی کاهش می‌یابد.

گرفتند که با افزایش تنش، بیشتر ترکیبات اسانس گیاه افزایش می‌یابد. همچنین نتایج تحقیقی روی گیاه همیشه بهار نشان داد که تش ملایم (۱۴۰ میلی‌متر تبخیر از تشتک کلاس A)، باعث تولید بیشترین عملکرد ماده خشک و عصاره شد (۲۵).

نتیجه‌گیری

با توجه به نتایج می‌توان چنین نتیجه گرفت که گیاهان در هنگام تنش خشکی با ایجاد تغییرات در برخی از خصوصیات فیزیولوژیکی خود به تنش پاسخ می‌دهند؛ از جمله این پاسخ‌ها می‌توان به افزایش طول ریشه، محتوی آنتوسیانین، کاروتنوئید و پرولین در گیاه اشاره کرد که باعث دوام گیاه دارویی همیشه بهار در تنش‌های بسیار شدید شده و در خشکی ۱۰ اتمسفر نیز تولید عملکردی پایین را می‌نماید. استفاده از کود زیستی نیتروکسین نیز باعث افزایش عملکرد گل و میزان عصاره شد. استفاده از نیتروکسین بصورت بذرمال سبب شد که گیاه در تنش نسبتاً شدید بتواند تولید عصاره‌ای در حد میزان عصاره تولید شده در سطح آبیاری مطلوب داشته باشد. البته باید گفت احتمالاً افزایش عصاره در تنش نسبتاً شدید بدلیل افزایش آنتوسیانین، محتوی رنگیزه‌های فتوسنتزی و محتوی پرولین در این سطح می‌باشد.

نقش‌های مهم کاروتنوئید محافظت از غشاهای تیلاکوئیدی و جلوگیری از فتواکسیداسیون کلروفیل‌ها می‌باشد. Jeyaramraja و همکاران (۲۰۰۵) مشاهده کردند که تنش ملایم آب سبب افزایش کاروتنوئیدها می‌شود، در حالی که کمبود شدید آب موجب کم شدن کاروتنوئیدها علاوه بر کاهش کلروفیل شد. اما در این تحقیق، مشاهده شد که محتوی کاروتنوئید همیشه بهار همراه با افزایش خشکی افزایش می‌یابد.

نتایج بدست آمده حکایت از آن دارد که مقدار پرولین و قندهای محلول در شرایط تنش کم آبی تا تنش نسبتاً شدید در گیاه همیشه بهار افزایش می‌یابد. بنابراین، مطابق با نتایج بدست‌آمده توسط سایر پژوهشگران (۴ و ۱۳) می‌توان بیان نمود که اسمولیت‌ها در سیتوزول برای تعدیل فشار اسمزی تجمع یافته‌اند. همچنین این روند افزایش در مقدار قندهای محلول همسو با پرولین است که این نتیجه نیز مطابق با گزارش‌هایی مبنی بر ارتباط این دو در شرایط تنش می‌باشد (۲۶).

مقدار عصاره گل در شرایط مطلوب آبیاری و استفاده از کود نیتروکسین به بیشترین مقدار رسید (جدولهای ۳، ۴، ۵ و ۶). برخلاف نتایج این تحقیق، Jiquan و همکاران (۲۰۰۰) در تحقیقی روی گیاه *Acer negundo* نتیجه

منابع

۱. اکبرنیا، ا.، بررسی عملکرد و ماده موثره زنیان در سیستم‌های کشاورزی متداول ارگانیک و تلفیقی، رساله دکتری زراعت، ۱۳۸۲، دانشکده کشاورزی دانشگاه تربیت مدرس.
۲. امیدبیگی، ر.، ۱۳۷۹. رهیافت‌های تولید و فرآوری گیاهان دارویی. جلد اول، چاپ دوم، انتشارات طراحان نشر، تهران، ۲۸۳ صفحه.
۳. امیدبیگی، ح.، موحدی پویا، ف.، موحدی پویا، ش. ۱۳۹۰. اثر هورمون سالیسیلیک‌اسید و خراش‌دهی بر ویژگی‌های جوانه‌زنی و محتوی پرولین، پروتئین و کربوهیدرات محلول گیاهچه کهورک (*Prosopis farcta L.*) در شرایط شوری. تحقیقات مرتع و بیابان ایران زمستان ۱۸(۴): ۶۰۸-۶۲۳.
۴. ثمن م، سپهری ع، احمدوند گ. ۱۳۹۰. تجمع ماده خشک و تولید متابولیت‌های سازگار در شش ژنوتیپ نخود تحت سطح مختلف رطوبت خاک. مجله زیست‌شناسی ایران. ۲۴(۳): ۳۷۳-۳۸۹.
۵. چاوشی م، آروین م ج، منوچهری کلانتری خ، ۱۳۸۹. مطالعه اثر متیل ژاسمونات بر رنگیزه‌های فتوسنتزی، پروتئین، یونهای سدیم و پتاسیم و برخی پارامترهای رشد در گیاه گلرنگ (*Carthamus tinctorius L.*) تحت تنش شوری. مجله زیست‌شناسی ایران. ۲۳(۳): ۳۹۷-۴۰۸.
۶. درزی، م. ت.، قلاوند، ا. و رجالی، ف.، ۱۳۸۸. تاثیر مصرف کودهای بیولوژیک بر روی جذب عناصر K, P, N و عملکرد دانه در گیاه دارویی رازیانه (*Foeniculum Vulgare Mill.*). تحقیقات گیاهان

- دارویی و معطر ایران. ۱۲۵(۱): ۱-۱۹.
۷. راد، م. ه.، میرحسینی، ر.، مشکوه، م. ع. و سلطانی، م. ۱۳۸۷. بررسی تاثیر رطوبت خاک بر چگونگی توسعه ریشه گیاه تاغ (*Haloxylon spp.*). تحقیقات جنگل و صنوبر ایران. ۱۶(۱): ۱۱۲-۱۲۳.
۸. صمصام شریعت، ه. و معطف، ۱۳۸۳. گیاهان داروهای طبیعی. نشر روزبهان.
۹. عامری، ع. ا.، نصیری محلاتی، م. و رضوانی مقدم، پ. ۱۳۸۶. اثر مقادیر مختلف نیتروژن و تراکم بر کارایی مصرف نیتروژن، عملکرد گل و مواد موثره همیشه بهار (*Calendula officinalis L.*). مجله پژوهش‌های زراعی ایران. ۲۵(۲): ۳۱۵-۳۲۵.
۱۰. عباس‌زاده، ب.، شریفی عاشورآبادی، ا.، لباسچی، م. ح.، نادری حاجی باقر کندی، م. و مقدمی، ف. ۱۳۸۶. اثر تنش خشکی بر میزان پرولین، قندهای محلول، کلروفیل و آب نسبی (RWC) بادرنجوبیه (*Melissa officinalis L.*). تحقیقات گیاهان دارویی و معطرایران. ۲۳(۴): ۵۰۴-۵۱۳.
۱۱. علی‌آبادی فراهانی، ح.، ارباب، ع. و عباس‌زاده، ب. ۱۳۸۷. تأثیر سوپر فسفات تریپل، تنش کم آبی و کود بیولوژیک *Glomus hoi* بر تعدادی از صفات کمی و کیفی گیاه دارویی Fertilizer on Yield, Yield Components and Various Traits of *Calendula officinalis*. American-Eurasian J. Agric. & Environ. Sci., 8 (6): 672-679.
۲۲. Hernandez, I., Alegre, L. and Munne-Bosch, S., 2004. Drought-induced changes in flavonoids and other low molecular weight antioxidants in *Cistus clusii* grown under Mediterranean field conditions. Tree Physiology, 24: 1303-1311.
۲۳. Jajarmi, V. (2009). Effect of water stress on germination indices in seven wheat cultivar. World Acad Sci Eng Technol, 49; 105-106. In vitro evaluation of osmotic stress tolerance using a novel root recovery assay. Plant Cell, 95 (1); 101-106.
۲۴. Jeyaramraja, P.R., Meenakshi, S.N., Kumar, R.S., Joshi, S.D. and Ramasubramanian, B., 2005. Water deficit induced oxidative damage in tea (*Camelia sinensis*) plants. Plant Physiology, 162: 413-419
۲۵. Jafarzadeh, L., Omidi, H and N Jafari, N., 2010. The effect of drought stress on vegetative growth, essential oil and proline content of *Calendula officinalis L.*, 4th International Conference of Biology, Iran. 1261-1262
۲۶. Jiquan, L., Gougu, G., Ying Bai, S. and Shenys, ۱۲. فریبری، ع. ۱۳۷۸. اثر کود ازت و تاریخ برداشت گل بر عملکرد و میزان اسانس در گیاه بابونه (*Matricaria chamomilla L.*). پایان نامه کارشناسی ارشد. دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد.
۱۳. معین، م.، و شریعتی، م. ۱۳۸۹. اثر همزمان سالیسیلیک اسید و تنش شوری بر روی رشد (تقسیم سلولی)، رنگیزه های فتوسنتزی و مقدار بتا- کاروتن در جلبک تک سلولی *Dunaliella salina Teod*. مجله زیست‌شناسی ایران. ۲۳(۵): ۶۳۸-۶۴۷.
۱۴. موحدی دهنوی، م.، مدرس ثانی، ع. م.، سروش‌زاده، ع. و جلالی، م. ۱۳۸۳. تغییرات میزان پرولین، قندهای محلول کل، کلروفیل (SPAD) و فلورسانس کلروفیل در ارقام گلرنگ پانزده تحت تنش خشکی و محلول‌پاشی روی و منگنز. بیابان. ۱۹(۱): ۹۳-۱۰۹.
۱۵. همراهی، س.، جبیبی، د.، مدنی، ح. و مشهدی اکبر بوجار، م. ۱۳۸۷. اثر سایکوسل و عناصر ریز مغذی بر میزان آنزیمهای آنتی اکسیدانت بعنوان شاخصهای مقاومت به تنش خشکی در کلزا. یافته‌های نوین کشاورزی. ۲(۳): ۳۱۶-۳۲۹.
16. Abedi, T., Pakniyat, H., 2010. Antioxidant enzyme changes in response to drought stress in ten cultivars of oilseed rape (*Brassica napus L.*). Czech J. Genet. Plant Breed. 46 (1): 27-34.
17. Arnon, D. I. 1949. Determination of chlorophyll concentration in leaf tissues of plants. Plant Physiol. 24:1.
18. Bannayan, M., Nadjafi, F., Azizi, M., Tabrizi, L. and Rastgoo, M. 2008. Yield and seed quality of *Plantago ovata* and *Nigella sativa* under different irrigation treatments. industrial crops and products. 17: 11-16.
19. Bates, L. 1973. Rapid determination of free Proline for water stress studies. palant and soil, 39: 205-207.
20. Fonseca, Y. M., Catini, C. D., Vicentini, F., Nomizo, A., Gerlach, R. F. & Fonseca, M., 2010. Protective effect of *Calendula officinalis* extract against UVB-induced oxidative stress in skin: Evaluation of reduced glutathione levels and matrix metalloproteinase secretion. Ethnopharmacology, 127(3): 596-601.
21. Ganjali, H. R., yeneh Band, A., Heidari Sharif Abad, H. and Moussavi Nik, M., 2010. Effects of Sowing Date, Plant Density and Nitrogen

- L.J.G., 2000. Changes of volatiles from drought stressed ash leaf maple (*Acer negundo*) in July and August. forestry studies in China, 2(2): 27-33.
27. Kamkar, B., Daneshmand, A.R., Ghooshchi, F., Shiranirad, A.H. & Safahani Langeroudi A.R. 2011. The effects of irrigation regimes and nitrogen rates on some agronomic traits of canola under a semiarid environment. Agricultural Water Management. 1-8.
28. Kapoor R, Giri B, Mukerji KG. 2004. Improved growth and essential oil yield and quality in *Foeniculum vulgare* mill on mycorrhizal inoculation supplemented with P-fertilizer. Bioresource Technol. 93: 307 – 11.
29. Lin-Wang, K., Bolitho, K., Grafton, K., Kortstee, A., Karunairetnam, S., McGhie, T., Espley, R., Hellens, R. and Allan, A., 2010. An R2R3 MYB transcription factor associated with regulation of the anthocyanin biosynthetic pathway in Rosaceae. Plant Biology. 1-17.
30. Martin, R. J. Deo, B. 1999. Effect of plant population on *Calendula* flower production. Newzealand journal of crop and Horticultural science. Abstracts. Vol:28.
31. Muley, B. P., Khadabadi, s. s. and Banarase, N. B., 2009. Phytochemical Constituents and Pharmacological Activities of *Calendula officinalis* Linn (Asteraceae): A Review. Tropical Journal of Pharmaceutical Research. 8 (5): 455-465.
32. Ngouajio, M., Wang, G. and Goldy, R., 2007. Withholding of drip irrigation between transplanting and flowering increases the yield of field-grown tomato under plastic mulch. Agricultural water management, 87: 285-291.
33. Paquin, R., and Lechasseur, P. 1979. Observations sur une methode dosage de la proline libre dans les extraits de plantes. Can. Bot., 57:1851-1854.
34. Rathke, G.-W., Behrens, T., Diepenbrock, W., 2006. Integrated nitrogen management strategies to improve seed yield, oil content and nitrogen efficiency of winter oilseed rape (*Brassica napus* L.): a review. Agric. Ecosyst. Environ. 117, 80–108.
35. Rios-Gonzalez, K., Erdei, L., and Lips, S.H. 2002. The activity of antioxidant enzymes in maize and sunflower seedlings as affected by salinity and different nitrogen sources. Plant Sci. 162: 923-930.
36. Shubhra, K., Dayal, J., Goswami, C. L. and Munjal, R. 2004. Effects of water-deficit on oil of *Calendula* aerial parts. Biologia Plantarum, 48(3): 445-448.
37. Tahkorpi, M., 2010. Anthocyanins under drought and droughtrelanted stresses in Bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.). Academic dissertation to be presented with the assent of the Faculty of Science of the University of Oulu.
38. Tesfamariam, E.H., Annandale, J.G., Steyn, J.M., 2010. Water stress effects on winter canola growth and yield. Agron. J. 102, 658–666.
39. Wanger, G. J. 1979. Content and vacuole/ extra vacuole distribution of neutral sugars, free amino acids, and anthocyanins in protoplast. Plant Physiology 64: 88-93.
40. Watkinson, J.I., Hendricks, L., Sioson, A.A., Vasquez- Robinet, C., Verlyn, S., Heath, L.S., Schuler, M., Bohnert, H.J., Bonierbale, M. and Grene, R., 2006. Accessions of *Solanum toberosum* spp. Andigena show differences in photosynthetic recovery after drought stress as reflected in gene expression profiles. Plant Science, 1-14.

The study of drought stress and Bio fertilizer of nitrogen on some biochemical traits of Marigold medicinal plant (*Calendula officinalis L.*)

Jafarzadeh L., Omidi H. and Bostani A.A.

Faculty of Agriculture, Shahed University, Tehran, I.R. of Iran

Abstract

To determine the effects of drought stress and nitrogen bio-fertilizer on flower yield, content of soluble compounds and biochemical indices of medicinal plant of *Calendula officinalis L.*, an experiment was carry out at research farm of Collage of Agriculture in Shahed University, Tehran. This study was conducted using split plot design based on randomized complete block (RCBD) with three replications in 2010-2011. The experiment factors including of different levels of drought stress at forth leaflet stages as main factor (applying soil water potential of 0.5 atm as Control ((FC) field capacity), soil water potential of 3.5 atm as moderate stress, soil water potential of 6.5 atm as highly severe stress, and applying soil water potential of 10 atm as severe stress) and levels of nitrogen bio-fertilizer as sub factor were consist of (Control (no applying nitrogen bio fertilizer), incorporation of 2 Liter/ha nitrogen bio fertilizer with water irrigation and inoculation of 2 Liter/ha nitrogen bio-fertilizer with seed treatment), were considered in sub plots. In this research, the characters of plant height, length and weight of root, flower yield, anthocyanin content, carotenoid, soluble sugars, photosynthesis pigments content, free proline content and rate of extract in one hundred gram of flower dry weight were estimated. The results showed that drought stress, nitrogen bio-fertilizer and its interaction had significant effect on all characters except for plant height and root weight ($P < 0.01$). In which with rising of drought stress, length roots (16%), anthocyanins content (23%), carotenoids content (71%), and soluble sugars (36%), proline content (47%) and photosynthetic pigments content (63%) increased. But their increasing could not prevent decreasing yield of flower and extract, in that the greatest of flower yield and extract obtained in field capacity irrigation, and so under severe stress flower yield and the extract amount decrease to 20% and 50% respectively. The most of plant height, flower yield, photosynthesis pigments content, proline content and yield of flower extract were obtained when nitrogen of bio-fertilizer was used in case of seeding. Correlation coefficients showed that between flower yield with anthocyanin content, carotenoid content and photosynthetic pigments content there were a meaningful negative correlations ($P < 0.01$). Overall results showed that *Calendula* can endure relatively high level of drought with applying tow liter of bio-fertilizer.

Key words: *Calendula*, Extract, photosynthesis pigments, soluble sugars