تاثیر نیتروژن و کم آبی بر محتوای کلروفیل و پراکسیداسیون لیپیدی گیاه دارویی همیشه بهار (*Calendula officinalis* L.)

مریم اویسی عمران [۱*]، محسن زواره [۲]، عبدالله حاتم زاده [۳]، محمد حسن علی بیگلویی [۴]

۱- دانشجوی ارشد زراعت، دانشگاه گیلان، رشت. ۲- استادیار گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشگاه گیلان، رشت. ۳- استاد گروه علوم باغبانی، دانشگاه گیلان، رشت. ۴- استادیار گروه آبیاری، دانشگاه گیلان، رشت.* نویسنده مسئول: مریم اویسی عمران.

Oveysi.maryam@gmail.com

چکیده

به منظور بررسی تاثیر سطوح مختلف نیتروژن و کم آبی بر محتوای کلروفیل و پراکسیداسیون لیپیدی گیاه دارویی همیشه بهار (*Calendula officinalis* L)، آزمایشی به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۳ تکرار در دانشکده علوم کشاورزی دانشگاه گیلان انجام شد. تیمارها شامل ۴ سطح کم آبی شامل (رطوبت در حد ظرفیت زراعی ، ۲۵، ۵۰ و ۷۵ درصد تخلیه از ظرفیت زراعی) و ۵ سطح کودی شامل (صفر، ۱۵، ۳۰، ۴۵ و ۶۰ کیلو گرم در هکتار نیتروژن) بودند. نتایج نشان داد که افزایش کمبود آب سبب کاهش محتوای کلروفیل و کاروتنوئید و افزایش معنی‌دار میزان مالون‌دی‌آلدئید شده است.با این حال، افزایش میزان نیتروژن سبب افزایش محتوای کلروفیل و کاهش میزان مالون‌دی آلدئید گردید. بررسی برهمکنش کمبود آب و نیتروژن تفاوت معنی‌داری را در مورد صفات مورد مطالعه نشان داد. با توجه به مقایسه میانگین برهمکنش‌ها، بیشترین میزان کلروفیل a در۶۰ کیلوگرم نیتروژن و رطوبت FC، کلروفیل b در ۶۰ کیلوگرم نیتروژن و ۵۰ درصد تخلیه، کلروفیل کل و کاروتنوئید در ۶۰ کیلوگرم نیتروژن و رطوبت FC و در نهایت بیشترین میزان مالون‌دی‌آلدئید در ۳۰ کیلوگرم نیتروژن و ۷۵ درصد تخلیه ازFC مشاهده شد.

واژگان کلیدی: کمبود آب، کود نیتروژن، کاروتنوئید، مالون‌دی‌آلدئید، همیشه‌بهار

مقدمه

همیشه بهار (*Calendula officinalis* L.) گیاهی علفی، از خانواده آستراسه است (صمصام شریعت، ۱۳۸۳) که گل‌های آن ۲-۴٪ اسانس با ترکیباتی از جمله منتون، ایزو منتون، گاما تریپنین دارد (Cromack and Smith, 1998). خشکی و تنش ناشی از آن، عامل زیان بخش مهم و یکی از اساسی ترین مشکلاتی است که فشار دائمی بر تولیدات کشاورزی در بسیاری از کشورهای در حال توسعه وارد کرده و عامل اتلاف و یا کاهش تولید در کشورهای توسعه یافته به شمار می‌رود که می‌تواند گاهی قحطی و مرگ و میر را نیز به دنبال خود داشته باشد (امام و زواره، ۱۳۸۴). نیتروژن، که کمبود آن در بیشتر مناطق خشک و نیمه خشک مطرح است، از عناصر مهمی است که کمی یا زیادی آن در خاک و یا گیاه اختلالاتی را در فرآیند-های حیاتی گیاه موجب می‌شود (Breemhaar & Bouman, 1995). نیتروژن با تاثیری که بر رشد رویشی و زایشی گیاهان دارویی دارد، می تواند سبب تغییراتی در عملکرد کمی و کیفی آنها هم بشود (Grundwald & Buttel., 1996). شوکرانی و همکاران (۲۰۱۲) با آزمایش خود روی همیشه بهار به این نتیجه رسیدند که اثر نیتروژن روی سطح برگ و طول تک برگ ها معنی‌دار است؛ آنها هم‌چنین مشاهده کردند که برهمکنش قطع آبیاری و نیتروژن هم بر سطح برگ سایه انداز موثر و معنی دار بوده است اما بر محتوای پرولین برگ، کربوهیدرات محلول برگ، کلروفیل a، b، کل و کاروتنوئید ، محتوای نسبی آب برگ و شاخص کلروفیل (SPAD) تاثیر معنی‌دار نداشته است. آرگانوسا و همکاران (۲۰۰۰) در بررسی‌های خود روی همیشه بهار و با کاربرد سطوح صفر، ۲۰، ۴۰، ۶۰،۸۰ و ۱۰۰ کیلوگرم نیتروژن در هکتار دریافتند که بیشترین عملکرد بیولوژیک و عملکرد دانه با کاربرد ۸۰ کیلوگرم در هکتار نیتروژن به دست می آید. تنظیم مصرف نیتروژن در شرایط کم آبی به جهت تاثیری که در توسعه رویشی گیاه و فرآیندهای متابولیکی دارد حایز اهمیت است.

با توجه به نقش آب و نیتروژن در رشد و تولید همیشه بهار، این مطالعه با هدف بررسی اثر سطوح مختلف نیتروژن و کم آبی بر برخی ویژگی‌های بیوشیمیایی گیاه دارویی همیشه بهار صورت گرفت.

مواد و روش‌ها

برای رسیدن به اهداف مورد نظر، آزمایشی به صورت فاکتوریل بر پایه طرح کاملا تصادفی با سه تکرار در سال زراعی ۹۰- ۹۱ در دانشکده کشاورزی دانشگاه گیلان روی رقم گلدن صورت گرفت. گیاهان مورد مطالعه در گلدان‌هایی، حاوی خاک، ماسه و کمپوست هر کدام با نسبت (۱:۱:۲) کاشته شدند (جدول ۱) و سپس تیمارهای کودی (بدون نیتروژن، ۱۵، ۳۰، ۴۵ و ۶۰ کیلوگرم نیتروژن در هکتار)، در دو مرحله، پس از سبز شدن و پایان ساقه‌دهی و تیمارهای آبیاری (رطوبت در حد FC، ۲۵، ۵۰ و ۷۵ درصد تخلیه از FC)، پس از استقرار بوته‌ها، اعمال شدند. میزان کلروفیل برگ ها با روش Lichtenthaler ، (1994) و پراکسیداسیون اسیدهای چرب براساس غلظت مالون‌دی‌آلدئید (MAD) ، با استفاده از روش and packer Heath، (1968) اندازه‌گیری شدند. و تجزیه و تحلیل آماری داده‌های حاصل از آزمایش با استفاده از نرم افزار SAS نسخه ۹ و برای رسم نمودارها نیز از نرم افزار Excel استفاده شد. مقایسه میانگین‌ها با آزمون توکی در سطح ۱٪ انجام شدند.

جدول ۱- مشخصات فیزیکی و شیمیایی خاک استفاده شده برای کشت گیاه دارویی همیشه بهار

مشخصات خاک	هدایت الکتریکی EC. 10^3	اسیدیته گل اشباع	کربن آلی ٪O.C	ازت کل (٪)	فسفر قابل جذب p.p.m	پتاسیم قابل جذب p.p.m	درصد شن ٪Sand	درصد سیلت ٪Silt	درصد رس ٪Clay	بافت خاک
مقدار	۷/۸۴	۷/۰۵	۳/۳۱	۰/۴۰۹	۵۶/۷	۷۱۲	۵۴	۳۴	۱۲	SL

نتایج و بحث

خشکی یکی از مهم‌ترین تنش‌های محیطی است که منجر به تولید گونه‌های فعال اکسیژن شامل رادیکال سوپراکسید، پراکسید هیدروژن و رادیکال هیدروکسیل می شود (Arora et al., 2002). نتایج تجزیه واریانس داده ها نشان داد که کمبود آب، نیتروژن و برهمکنش آنها تاثیر بسیار معنی داری بر تمام ویژگی های مورد مطالعه داشته است (جدول ۲). مقایسه میانگین برهمکنش نیتروژن و کم آبی نشان داد که بیشترین (۸/۵) و کمترین (۴/۲۸) مقدار کلرفیل a به ترتیب در مقدار ۶۰ و ۴۵ کیلوگرم نیتروژن و در رطوبت شاهد و ۵۰ درصد تخلیه از FC به دست آمده است. در مورد کلروفیل b نیز بیشترین (۸/۶۳) و کمترین مقدار (۶/۹۲) به ترتیب در ۶۰ و ۴۵ کیلوگرم نیتروژن و تیمار کم آبی ۵۰ درصد تخلیه از رطوبت مزراه مشاهده شد. کلروفیل کل نیز بیشترین(۱۷/۱) و کمترین (۱۱/۲۱) مقدار خود را به ترتیب در ۶۰ و ۴۵ کیلوگرم نیتروژن و رطوبت در حدFC و ۵۰ درصد تخلیه داشت. در رابطه با کاروتنوئید مشاهده گردید که بیشترین (۳/۸۴) و کمترین (۰/۴۶) میزان آن به ترتیب در سطح ۶۰ و صفر کیلوگرم نیتروژن و تیمار FC و ۷۵ درصد تخلیه از FC به دست آمد. مقایسه میانگین سطح پراکسیداسیون لیپیدی براساس میزان مالون دی_آلدئید نشان داد که بیشترین (۰/۹۵) و کمترین (۰/۲۵) مقدار آن به ترتیب در ۳۰ و ۱۵ کیلوگرم نیتروژن و تیمار کم آبی ۷۵ درصد تخلیه و رطوبت در حد FC به دست آمد.

گونه های فعال اکسیژن (ROS ها) به‌طور بالقوه دارای پتانسیل واکنش با بسیاری از ترکیبات سلولی هستند که می تواند باعث خسارت به غشاء و سایر ماکرومولکول‌های ضروری مانند رنگدانه‌های فتوسنتزی، پروتئین‌ها، اسیدهای نوکلئیک و لیپیدها شود. بنابراین، مقدار آنها باید در سلول کنترل گردد (Blokhina et al., 2002). یکی از صدمات اکسیداتیو مهمی که در حضور این ترکیبات ایجاد می‌گردد، تخریب مولکول های کلروفیل است که به دنبال آن رنگیزه های دیگری از جمله

کاروتنوئیدها (گزانتوفیل، کاروتن، لیکوپن) و آنتوسیانین قابل رؤیت می شوند (Chalker-Scott., 2002). در این رابطه نتایج این آزمایش هم مشابه یافته های (Sohrabi et al., 2012)، (Lee et al., 2011) ، (Mafakheri et al., 2010) و (قربانلی و همکاران، ۱۳۹۰) بود. میزان پراکسیداسیون لیپیدی (MDA) به عنوان معرف میزان رادیکال آزاد مضر غشاء سلولی برای بررسی میزان صدمات غشاء تحت شرایط تنش استفاده می‌شود (Katsuhara et al., 2005؛ Jaleel et al., 2007). رادیکال-های آزاد موجود در سلول باعث صدمه به لیپیدها و اسیدهای چرب غشاء شده و رادیکال‌های لیپید و پراکسی و هیدروپراکسی تولید می‌کنند، رادیکال‌های جدید تولید شده می‌توانند به واکنش‌های اکسیداسیون لیپیدها سرعت بخشند. (Sofo et al., 2004). سلیمان‌زاده و همکاران در بررسی خود روی گیاه آفتابگردان دریافتند که تحت شرایط خشکی محتوای مالون دی‌آلدئید برگ‌ها در مقایسه با شرایط کنترل افزایش یافت، هم‌چنین افزایش میزان پتاسیم در تمامی سطوح آبی باعث کاهش محتوای مالون دی‌آلدئید شد (Soleimanzadeh et al., 2010). تحقیقات مختلفی از جمله لی پینگ و همکاران بر روی ذرت، قربانلی و همکاران بر روی گیاه کتان، اسفندیاری بر روی گندم و ژانگ روی ذرت نیز نشان دادند که با افزایش سطوح خشکی میزان مالون دی آلدئید افزایش یافت (Li-Ping et al., 2006؛ Esfandiari et al., 2007 ؛ Zhang et al., 2007؛ قربانلی و همکاران، ۱۳۹۰)

جدول ۲- تجزیه واریانس ویژگی‌های مورفولوژیک گیاه دارویی همیشه بهار تحت تیمارهای مختلف کم آبی و نیتروژن

	میانگین مربعات				
منابع تغییرات	Chlo a	Chlo b	Chlo a + Chlo b	Carotenoid	MDA
تنش	۱۰/۸۳۹۰**	۱/۶۰۶۳**	۱۹/۶۲۴۱**	۳۵/۳۲۳۵**	۰/۵۱۶۲**
نیتروژن	۱۱/۴۷۶۵**	۱/۷۵۰۶**	۲۲/۴۸۱۳**	۰/۸۹۱۷**	۰/۰۴۷۷**
تنش *نیتروژن	۲/۶۱۴۴**	۰/۶۶۴۶**	۵/۵۰۰۹**	۰/۲۶۴۶**	۰/۰۴۵۶۷**
خطا	۰/۱۰۸۲	۰/۰۷۲۶	۰/۰۲۷۸	۰/۰۲۷۸	۰/۰۰۳۷
ضریب تغییرات	۵/۸۲۳۲	۳/۵۹۸۰	۳/۹۶۶۳	۹/۰۰۴۴	۱۱/۵۲۸۴

منابع

امام، ی. و زواره، م. ۱۳۸۴. تحمل خشکی در گیاهان عالی: تحلیل‌های ژنتیکی، فیزیولوژیکی و زیست شناختی مولکولی. انتشارات مرکز نشر دانشگاهی، ۱۲۶ صفحه.

صمصام شریعت، ه و معطر، ف. ۱۳۸۳. گیاهان و داروهای طبیعی. نشر روزبهان.

قربانلی، م.، بخشی خانیکی، غ. ر.، ذاکری، ا. ۱۳۹۰. بررسی اثر تنش خشکی بر ترکیب‌های آنتی اکسیدان در گیاه دارویی کتان (*Linum usitatissimum* L). فصلنامه تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران. جلد (۲۷): شماره ۴: ۶۴۷-۶۵۸.

Arganosa, G.C., F.W. Sosulski, and A.E. Slikard. 1998. Effect of nitroge levels and harvesting management on quality of oil in Calendula officinalis. Indian Perfumer. 33(3): 182-195.

Arora, A., R.K. Sairam, and G.C. Srivastava. 2002. Oxidative stress and antioxidant system in plants. Plant Physiology. 82: 1227-1237.

Blokhina, O., E. Virolainen, and K. Fagested. 2002. Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress. Annual of Botany. 91: 179-194.

Breemhaar, H.G. and A. Bouman. 1995. Mechanical harvesting and cleaning of Calendula officinalis and Dimorphotheca pluvialis. Industrial Crops and Products. 4(3): 281-284.

Chalker-Scott, L. 2002. Do anthocyanins function as osmoregulators in leaf tissues?. Advances in Botanical Research. 37: 103-106.

Cromack, HTH. and J.M. Smith. 1998. Calendula officinalis – production potential and Crop agronomy in Southern England. Industrial crop and products. pub.London,England. pp.101-123.

Esfandiari, E., M.R. Shakiba. S.A. Mahboob. H. Alyari, and. M. Toorchi. 2007. Water stress, antioxidant

enzyme activity and lipid peroxidation in wheat seedling. Journal of Food, Agriculture & Environment. 5(1):149-153.
Grundwald, J., and K. Buttel. 1996. European phytotherapeutics market drugs made in germany. 39:6-11.
Inze, D., and M.V. Montagu. 2000. Oxidative Stress in Plant. Tj International Ltd, Padstow, Cornawall, Great Britain, 321p.
Jaleel, C.A., B. Gopi, P. Sankar, A. Manivannan, R.S. Kishorekumar, and L. Panneers. 2007. Studies on germination, seedling vigour, Lipid peroxidation and proline metabolism in Catharanthus *roseus* seedling under salt stress. South African Journal of Botany. 73(2): 190-195.
Katsuhara, M., T. Otsuka, and B. Ezaki. 2005. Salt stress-induced lipid peroxidation is reduced by glutathione S-transferase, but this reduction of lipid peroxidase is not enough for a recovery of root growth in *Arabidopsis*. Plant Science, 169(2): 369-373.
Lee, Y., C.M. Yang, K.W. Chang, and Y. Shen. 2011. Effects of nitrogen status on leaf anatomy, chlorophyll content and canopy reflectance of paddy rice. Botanical Studies, 52: 295-303.
Li-Ping, B., S. Fang-Gong, G. Ti-Da, S. Zhao-Hui, L. Yin-Yan, and Z. Guang-Sheng. 2006. Effect of Soil Drought Stress on Leaf Water Status, Membrane Permeability and Enzymatic Antioxidant System of Maize. Pedosphere. 16(3):326-332.
Lichtenthaler, H.K. and W.R. Welburn. 1994. Determination of total carotenoids and chlorophyils a and b of leaf extracts in different solvents. biochem. Soc. Tran. 11: 591 – 592.
Mafakheri, A., A. Siosemardeh, B. Bahramnejad, P.C. Struik, and Y. Sohrabi. 2010. Effect of drought stress on yield, proline and chlorophyll contents in three chickpea cultivars. Australian Journal of Crop Science, 4(8):580-585.
Shokrani F., A. Pirzad, and R. Darvishzadeh. 2012. Effect of irrigation disruption and biological nitrogen on some physiological and morphological characters of leaf in *Calendula officinalis* L. Journal of Medicinal Plants Research. 6(1): 79-87.
Sohrabi, Y., G.R. Heidari, W. Weisany, K. Ghasemi, and K. Mohammadi. 2012. Changes of antioxidative enzymes, lipid peroxidation and chlorophyll content in chickpea types colonized by different Glomus species under drought stress. Symbiosis. 56:5-18.
Sofo, A., B. Dichio, C. Xiloyannis, and A. Masia. 2004. Effects of different irradiance levels on some antioxidant enzymes and on malondealdehyde content during rewatering in olive tree. Plant Sciences. 166(2): 293-302.
Soleimanzadeh, H., D. Habibi, M.R. Ardakani, F. Paknejad, and F. Rejali. 2010. Effect of Potassium Levels on Antioxidant Enzymes and Malondialdehyde Content under Drought Stress in Sunflower (*Helianthus annuus* L.). American Journal of Agricultural and Biological Sciences. 5(1):56-61.
Zhang, L.X., S.X. Li, H. Zhang, and Z.S. Liang. 2007. Nitrogen Rates and Water Stress Effects on Production, Lipid Peroxidation and Antioxidative Enzyme Activities in Two Maize (Zea mays L.) Genotypes. Journal Agronomy & Crop Science. 193, 387-397.

Effect of Nitrogen and Water Deficit on the Chlorophyll Content and Lipid Peroxidation in the Calendula (*Calendula Officinalis* L.)

M. Oveysi Omran[1*], M. Zavareh[2], A. Hatam Zadeh[3], M. H. Ali Bigloee[4]
1, 2- Dept. of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agricultural Sciences, University of Guilan, Rasht, Iran. 3-Dept. of Horticultural Sciences, Faculty of Agricultural Sciences, University of Guilan, Rasht, Iran. 4- Dept. of Irrigation, Faculty of Agricultural Sciences, University of Guilan, Rasht, Iran
Corresponding author: Maryam Oveysi Omran. Oveysi.maryam@gmail.com

Abstract
In order to investigate the effect of different nitrogen levels and water deficit on the chlorophyll content and lipid peroxidation in the calendula (*Calendula officinalis* L), a CRD based factorial experiment with three replications was conducted at the Faculty of Agricultural Science, University of Guilan. Four levels of water deficit (Humidity at FC, 25, 50 and 75% discharge from FC) and five amount of nitrogen fertilizer (0, 15, 30, 45 and 60 Kg N/ha) were considered as treatments. The results showed that increase in water deficit causes significant reduction of chlorophyll and carotenoid content while it increased malondialdehyde contents, significantly. Higher amount of nitrogen also increased chlorophyll content and reduced malondialdehyde. Water deficit by nitrogen interaction was significant for all characteristics. The interaction means indicated that the highest content of chlorophyll a, total chlorophyll and carotenoid content were observed in plants treated with 60 Kg nitrogen under FC soil water content. However, the highest content of chlorophyll b was observed in plants grown with 60 Kg nitrogen and soil moisture of 50 % depletion of FC moisture content. The highest content of malondialdehyde was seen in 30 Kg nitrogen and %75 discharges of FC treatment.
Keywords: Water deficit, Nitrogen fertilizer, Carotenoid, malondialdehyde, Calendula