تنش‌های محیطی در علوم زراعی
Environmental Stresses in Crop Sciences
جلد چهاردهم، شماره دوم، تابستان ۱۴۰۰
۴۳۹-۴۴۸
http://dx.doi.org/10.22077/escs.2019.2610.1682

مقاله پژوهشی

تأثیر تنش خشکی بر صفات مورفولوژیک، میزان پرولین و ترکیبات فنلی گیاه دارویی رزماری (*Rosmarinus officinalis* L.)

لیلا تمدن کوشکی[۱]، مهرناز ریاست[۲*]

۱. دانشجوی کارشناسی ارشد گروه علوم باغبانی، واحد شیراز، دانشگاه آزاد اسلامی، شیراز

۲. عضو هیئت‌علمی مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان فارس. سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، فارس

تاریخ دریافت: ۹۸/۰۴/۰۲؛ تاریخ پذیرش: ۹۸/۰۷/۱۰

چکیده

وجود تنش‌های غیرزنده محیطی به‌ویژه تنش خشکی یکی از مهم‌ترین مشکلات مناطق خشک و نیمه‌خشک است. تنش خشکی زمانی در گیاه حادث می‌شود که میزان آب دریافتی گیاه کمتر از تلفات آن باشد. این تحقیق به‌منظور بررسی تأثیر تنش خشکی بر صفات مورفولوژیک، میزان پرولین و ترکیبات فنلی گیاه دارویی رزماری در قالب طرح کاملاً تصادفی در ۳ تکرار در گلخانه تحقیقاتی مرکز بعثت شیراز انجام شد. تنش خشکی در چهار سطح (۱۰۰٪، ۷۵٪، ۵۰٪، ۲۵٪ ظرفیت زراعی) اعمال گردید. صفات مورداندازه‌گیری عبارت بودند از: وزن تر و خشک اندام‌های هوایی و ریشه، سطح برگ، تعداد برگ، طول گیاه، میزان پرولین برگ و ترکیبات فنولی. در این تحقیق مشخص شد گیاه رزماری در شرایط تنش خشکی با شدت ۷۵٪ ظرفیت مزرعه از نظر وزن تر و خشک اندام هوایی، وزن تر ریشه، طول اندام هوایی با شرایط نرمال (FC 100%) تفاوت معنی‌داری نداشتند. همچنین در شرایط تنش خشکی با شدت ۷۵٪ ظرفیت مزرعه، طول ریشه به ۲۷/۶۷ سانتی‌متر افزایش یافت. وزن خشک ریشه، سطح و تعداد برگ در شرایط تنش خشکی به‌طور معنی‌داری کاهش یافت. در شرایط تنش خشکی با شدت ۲۵٪ ظرفیت مزرعه، میزان ترکیبات کئورستین (۴۳۹/۰۴ mg/L)، ترانس فرولیک اسید (۷۲/۴۸ mg/L)، هسپردین (۶۲ /۴۰۷ mg/L)، اوژنول (۶۵/۳۶ mg/L)، هسپرتین (۱۰۷/۳۴ mg/L)، رزمارنیک اسید (۱۱۳۳/۳۴ mg/L) به‌طور قابل‌توجهی افزایش یافت. همچنین محتوای پرولین در شرایط تنش خشکی با شدت ۲۵٪ ظرفیت مزرعه به ۷۹/۷۲ µm/g رسید.

***واژه‌های کلیدی:* اندام هوایی، ترکیبات فنلی، ظرفیت زراعی، کمبود آب**

مقدمه

تنش‌های محیطی جزء مهم‌ترین عوامل کاهش عملکرد گیاهان به شمار می‌روند. این در حالی است که در مورد برخی از گیاهان دارویی، استفاده از تنش‌های محیطی می‌تواند روشی برای افزایش عملکرد گیاه باشد (Walpola and Arunakumara, 2017). عوامل محیطی ازیک‌طرف باعث تغییراتی در رشد گیاهان دارویی و از طرف دیگر موجب تغییر در مقدار و کیفیت مواد مؤثره آن‌ها نظیر آلکالوئیدها، گلیکوزیدها، استروئیدها و روغن‌های فرار (اسانس‌ها) می‌گردند. عملکرد یک گیاه دارویی وقتی مقرون‌به‌صرفه است که مقدار متابولیت‌های اولیه و ثانویه به حد مطلوب رسیده باشد؛ بنابراین، با مدیریت عوامل محیطی می‌توان به حداکثر محصول دست یافت (Kusano et al., 2008). کایا و همکاران (Kaya et al., 2006) در تحقیقات خود نشان دادند که شوری عملکرد اسانس در گیاهان خانواده نعنائیان را کاهش می‌دهد و از طرفی استرس خشکی می‌تواند باعث افزایش درصد روغن‌های ضروری اکثر گیاهان دارویی شود، زیرا در این حالت متابولیت‌های بیشتری تولیدشده و این مواد باعث جلوگیری از عمل اکسیداسیون در سلول می‌شوند.

* نگارنده پاسخگو: مهرناز ریاست. پست الکترونیک: riasat.mehrnaz@yahoo.com

همچنین گزارش‌های فراوانی از انواع خواص بیولوژیکی و دارویی ترکیبات فنولی گیاهان این خانواده گیاهی وجود دارد که ازجمله آن‌ها می‌توان به خواص آنتی‌اکسیدانی، ضد سرطانی، ضد باکتری، ضدویروسی، ضدالتهابی و غیره اشاره کرد (Huang et al., 2009). تحقیقات نشان داده که یکی از مهم‌ترین عوامل تأثیرگذار در میزان متابولیت‌های ثانویه موجود در گیاهان، تنش‌های محیطی اعمال‌شده بر آن‌هاست. در حقیقت یکی از بااهمیت‌ترین وظایف متابولیت‌های ثانویه در گیاهان نقش محافظتی آن‌ها در شرایط تنش است. این ترکیبات به گیاهان کمک می‌کنند تا بتوانند در مقابل عوامل مزاحم خارجی (مانند آفات و پاتوژن‌ها) و شرایط نامساعد محیطی (مانند خشکی و یا شرایط نامساعد خاک) مقاومت کنند و به حیات خود ادامه دهند. شواهد زیادی بر افزایش چند برابری متابولیت‌های ثانویه تحت تنش‌های محیطی وجود دارد، اما برخی تحقیقات نیز نشان می‌دهد که این تأثیر همیشگی نیست و در مواردی حتی کاهش میزان متابولیت-های ثانویه تحت شرایط تنش‌های محیطی دیده می‌شود (Walpola and Arunakumara, 2017; Akula and Ravishankar, 2011). بررسی و به دست آوردن بهترین شرایط محیط کشت که بتواند منجر به تولید گیاهی با بیشترین درصد متابولیت‌های ثانویه گردد از مهم‌ترین اهداف در تحقیقات مربوط به کشت گیاهان دارویی است (Jaafar et al., 2012).

گیاه دارویی اکلیل کوهی با نام عمومی رزماری و نام علمی *Rosmarinus officinalis* L. گیاهی از تیره نعناع است. از نظر ساختار، گیاهی است علفی، پایا، دارای ساقه‌ای چوبی به ارتفاع نیم تا یک متر، برگ‌های سبز دائمی و بسیار معطر با آرایش متقابل با کناره برگشته، باریک، دراز و نوک‌تیز سطح فوقانی برگ آن به رنگ سبز و سطح تحتانی به علت وجود کرک‌ها سبز مایل به سفید است (Mozafarian, 1998). اهمیت این‌گونه گیاهی بیشتر به خاطر اسانس موجود در آن است که تقریباً در تمام اندام‌های آن البته با نسبت‌های متفاوت وجود دارد. رشد و تولید روغن‌های ضروری گیاهان دارویی می‌تواند تحت تأثیر تنش‌های محیطی قرار بگیرد. سوامی و همکاران و والترز و همکاران (Swamy et al., 2008; Walters et al., 2016) نشان دادند که با کاربرد تنش، رشد گیاه به‌طور معنی‌داری افزایش یافت و با کاربرد سطوح پایین تنش، محتوای روغن ضروری به‌طور معنی‌داری افزایش یافت. در تحقیق دیگر تاراف و ابراهیم (Tarraf and Ibrahim, 1999) دریافتند که میزان روغن‌های ضروری رزماری با کاربرد تنش‌های محیطی افزایش معنی‌داری یافت. ازآنجایی‌که تنش‌های محیطی و به‌ویژه تنش خشکی و شوری یکی از موانع اصلی در کاهش تولید محصولات گیاهان دارویی در بسیاری از نقاط دنیا به‌ویژه در مناطق خشک و نیمه‌خشک مانند ایران محسوب می‌شوند، از طرف دیگر ازآنجایی‌که ترکیبات تولیدشده در گیاهان دارویی تحت تأثیر تنش‌های محیطی ممکن است افزایش یابند؛ بنابراین انجام آزمایش‌های مربوطه، شناسایی کاهش اثرات سوء و همچنین اثرات احتمالی مثبت تنش‌ها برای حصول آستانه‌های اقتصادی عملکرد گیاهان دارویی مهم به نظر می‌رسد.

مواد و روش‌ها

این تحقیق در بهار سال ۱۳۹۷ در گلخانه تحقیقاتی مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان فارس مجهز به سیستم‌های کنترل رطوبت، درجه حرارت و تهویه بر روی گیاه دارویی رزماری در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار انجام شد. تیمارهای مورد آزمایش عبارت بودند از تنش خشکی در چهار سطح ۱۰۰٪، ۷۵٪، ۵۰٪ و ۲۵٪ ظرفیت مزرعه. ابتدا گلدان‌هایی از جنس PVC انتخاب و جهت ضدعفونی، با آب و اتانول ۹۵ درصد شسته شده و جهت ایجاد زهکشی مناسب در ته گلدان‌ها چندین سوراخ ایجاد شد. سپس اقدام به پر کردن گلدان‌های ۷ کیلوگرمی که دارای قطر ۲۲ سانتی‌متر و ارتفاع ۱۸ سانتی‌متر بودند، گردید. در هر گلدان که حاوی خاک مزرعه، شن و خاک‌برگ به نسبت ۱:۱:۱ بود، تعداد ۱۲ گلدان آماده گردید و درون هرکدام ۶/۵ کیلوگرم خاک آماده‌شده ریخته شد. تعداد دو قلمه یک‌ساله در هر گلدان کاشته شد. بعد از گذشت یک ماه از کاشت قلمه‌ها، اعمال تیمارهای تنش خشکی روی آن‌ها انجام گرفت. بدین منظور، تیمارهای آبیاری با توزین روزانه گلدان‌ها و اضافه نمودن آب مصرفی براثر تبخیر و تعرق (کاهش وزن هرکدام از گلدان‌ها) اعمال شد. بر اساس محاسبات انجام‌شده وزن هر گلدان برای هر ۴ تیمار (۱۰۰٪، ۷۵٪، ۵۰٪، ۲۵٪ ظرفیت زراعی) محاسبه گردید. برای تعیین آب خاک در حالت ظرفیت زراعی، ابتدا ۱۰ گلدان کاملاً مشابه با گلدان-های آزمایشی تا حد اشباع آبیاری شده و پس از گذشت ۲۴ ساعت گلدان‌ها هر دو ساعت یک‌بار توزین شدند. در زمان ثابت شدن وزن گلدان‌ها از هر گلدان نمونه خاک تهیه، توزین و سپس به مدت ۴۸ ساعت به آون با دمای ۱۰۳ درجه

سانتی‌گراد منتقل شدند. درصد آب خاک در حالت ظرفیت مزرعه از طریق معادله زیر تعیین شد:

= درصد آب خاک

۱۰۰× (وزن‌خشک خاک / (وزن‌خشک خاک –وزن‌تر خاک)) [۱]

برای اعمال تیمارهای آبیاری، هر گلدان در حالت ظرفیت زراعی توزین شد و بر اساس درصد آب خاک در این حالت و بسته به میزان آب موردنیاز در هرکدام تیمارهای مربوطه، وزن گلدان مشخص شد. سپس گلدان‌ها به‌صورت روزانه توزین شدند و کاهش وزن هر گلدان نسبت به وزن آن در تیمار مربوطه، با تأمین مقدار آب لازم جبران شد. در پایان دوره رشد رویشی اقدام به برداشت گیاهان سبز شده در هر گلدان به‌طور جداگانه گردید. صفات موردراندازه‌گیری عبارت بودند از: وزن تر و خشک اندام‌های هوایی و ریشه، سطح برگ، تعداد برگ، طول گیاه، میزان پرولین برگ و ترکیبات فنولی. جهت اندازه‌گیری صفات رویشی، گیاهان از بستر خاک خارج و برای زدودن بقایای خاک از سطح ریشه گیاهان، ریشه‌ها با آب جاری به‌خوبی شستشو داده شدند و خشک گردیدند بعد از خشک شدن سطحی ریشه‌ها، اندام هوایی و ریشه‌ها از محل طوقه در کلیه گیاهان جداشده و وزن تر و خشک و همچنین طول اندام هوایی و ریشه به تفکیک تیمارها توسط خط‌کش و ترازو اندازه‌گیری شد. همچنین سطح برگ با استفاده از دستگاه Leaf Aria Meter مدل AM200 اندازه‌گیری شد.

عصاره‌گیری از نمونه‌ها با روش ماسراسیون: برای آماده‌سازی نمونه‌های گیاهی جهت عصاره‌گیری ابتدا اندام‌های گیاهی (شامل برگ و ساقه) در دمای اتاق و در تاریکی خشک گردیدند. سپس ۱۰ گرم از ماده خشک گیاهی که به‌خوبی پودر شده بود توسط ۲۰ میلی‌لیتر حلال استخراجی (۸۰ درصد اتانول و ۲۰ درصد آب) تحت عصاره‌گیری قرار گرفت (Farhani et al., 2013). فرآیند استخراج به مدت ۱۵۰ دقیقه در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد بر روی شیکر ادامه یافت. درنهایت پس از تکمیل فرآیند عصاره‌گیری، محلول با استفاده از کاغذ واتمن صاف گردید و پس از سانتریفوژ کردن (به مدت ۵ دقیقه با سرعت ۴۰۰ دور بر دقیقه) محلول عصاره به صورتی کاملاً صاف و شفاف به دست آمد. این محلول با استفاده از دستگاه تبخیرکننده چرخان خشک و متناسب با وزن عصاره به‌دست‌آمده از هر نمونه محلول‌های استوک (1000 ppm)، با استفاده از حلال متانول تهیه شد که از این محلول‌ها جهت اندازه‌گیری ترکیبات فنلی استفاده گردید (Mišan et al., 2011).

اندازه‌گیری ترکیبات فنولی با HPLC: برای اندازه‌گیری ترکیبات فنلی از روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC) استفاده شد. برای این منظور ۲۰ میکرولیتر از عصاره تهیه‌شده به دستگاه HPLC (مدل Agilent 1200 series) تزریق گردید. آنالیز کیفی هر کدام از ترکیبات موردنظر با استفاده از مقایسه زمان بازداری پیک‌های موجود در کروماتوگرام با زمان بازداری پیک مربوط به ماده خالص استاندارد انجام گرفت. همچنین جهت آنالیز کمی ترکیبات فنلی، با تزریق محلول استاندارد با غلظت معین و به دست آوردن سطح زیر پیک هرکدام منحنی کالیبراسیون مربوط به هر ترکیب رسم شد و با استفاده از معادله خطی این منحنی کالیبراسیون، میزان کلی هرکدام از مواد موردنظر در عصاره تعیین گردید (Mišan et al., 2011).

اندازه‌گیری محتوای پرولین: اندازه‌گیری مقدار پرولین طبق روش بیتس و همکاران (Bates et al., 1973) انجام گرفت و جذب در طول‌موج ۵۲۳ نانومتر خوانده شد و با استفاده از منحنی استاندارد پرولین، مقدار این ماده محاسبه و برحسب میکرومولار بر گرم وزن تر گزارش گردید.

تجزیه‌وتحلیل داده‌ها برای تمامی صفات موردمطالعه با استفاده از نرم‌افزار آماری SAS و مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون دانکن در سطح ۵ درصد صورت گرفت.

نتایج و بحث

نتایج تجزیه واریانس نشان‌دهنده تأثیر معنی‌دار تنش خشکی بر وزن تر اندام هوایی بود. به‌طورکلی با افزایش تنش خشکی، میانگین وزن تر اندام هوایی روند کاهشی نشان داد و از این‌نظر تفاوت بین تیمارهای خشکی معنی‌دار بود. بیشترین میانگین وزن تر اندام هوایی با ۲۹/۶۷ گرم مربوط به ۱۰۰٪ ظرفیت زراعی بود که اختلاف آن با تیمار ۷۵٪ ظرفیت زراعی معنی‌دار نبود و کمترین میانگین وزن تر اندام هوایی با ۱۵/۳۳ گرم مربوط به تیمار ۲۵٪ ظرفیت زراعی بود که اختلاف آن با تیمار ۵۰٪ ظرفیت زراعی معنی‌دار نبود (جدول ۱). این نتایج با تحقیقات گذشته مطابقت دارد (Mira et al., 2016). آن‌ها از مهم‌ترین دلایل کاهش در وزن گیاه در طول دوره تنش را اثرات سوء تنش بر رشد و فیزیولوژی گیاه شامل رشد رویشی، سیستم فتوسنتزی، جذب عناصر غذایی و متابولیسم نیتروژن اعلام کردند. رشد رویشی در گیاهان تحت تأثیر

عوامل متعددی قرار می‌گیرد که از مهم‌ترین این عوامل میزان آب در دسترس است. یکی از اولین نشانه‌های کمبود آب، کاهش آماس و درنتیجه کاهش تقسیم و توسعه سلول به‌ویژه در ساقه و برگ‌ها است و به همین دلیل است که اولین اثر محسوس کم‌آبی بر روی گیاهان را می‌توان از اندازه کوچک‌تر برگ‌ها یا ارتفاع گیاهان تشخیص داد (Salahvarzi et al., 2008). در این پژوهش نیز، با کاهش ارتفاع و کوچک‌تر شدن برگ‌ها وزن اندام هوایی نیز کاهش یافت.

نتایج این آزمایش نشان داد، وزن خشک اندام هوایی تحت تأثیر سطوح مختلف تنش خشکی قرار گرفت. به‌طوری‌که با افزایش تنش خشکی، میانگین وزن خشک اندام هوایی روند کاهشی نشان داد و از این نظر تفاوت بین تیمارهای خشکی معنی‌دار بود. بیشترین میانگین وزن خشک اندام هوایی با ۱۱/۱۵ گرم مربوط به ۱۰۰٪ ظرفیت زراعی بود و کمترین میانگین وزن خشک اندام هوایی با ۶/۷۶ گرم مربوط به تیمار تنش خشکی ۲۵٪ ظرفیت زراعی بود (جدول ۱). لذا به نظر می‌رسد که در تیمارهایی که آب کافی دریافت کرده‌اند به دلیل رشد بهتر اندام‌های هوایی و تأمین سطح فتوسنتزی کارآمد، تولید ماده خشک به نحو مطلوبی صورت گرفته است. به‌طوری‌که ماده خشک تولید بین اعضای مختلف گیاه توزیع گردیده و تعیین‌کننده میزان عملکرد اقتصادی است. در شرایط تنش، کاهش ماده خشک می‌تواند به دلیل فشار آماس سلولی ناشی از کاهش سطح برگ گیاه باشد (Luvaha et al., 2010). باهرنیک و همکاران (Bahernik et al., 2003) با بررسی اثر تنش خشکی بر عملکرد بوته و اسانس گیاه مرزه به این نتیجه رسیدند که وزن تر و خشک کل تحت تنش تأثیر تنش خشکی کاهش یافت. طبق نظر سرایوالی و همکاران (Sreevalli et al., 2000) کاهش ماده خشک تولید طی افزایش سطح تنش خشکی می‌تواند مربوط به کاهش ارتفاع بوته، کاهش سطح برگ و افزایش اختصاصی مواد فتوسنتزی به ریشه نسبت به بخش هوایی گیاه باشد.

تنش خشکی بر وزن تر ریشه نیز تأثیر معنی‌داری داشت. نتایج نشان داد با افزایش تنش خشکی، میانگین وزن تر ریشه روند کاهشی داشت و از این نظر تفاوت بین تیمارهای خشکی معنی‌دار بود. بیشترین میانگین وزن تر ریشه با ۱۴/۳۳ گرم مربوط به ۱۰۰٪ ظرفیت زراعی بود و کمترین میانگین وزن تر ریشه با ۱۰/۶۷ گرم مربوط به تیمار تنش خشکی ۲۵٪ ظرفیت زراعی بود (جدول ۱)؛ بنابراین در این آزمایش مشخص گردید که گیاه رزماری با تولید ریشه‌های نازک‌تر در پاسخ به تنش خشکی باعث کاهش وزن تر ریشه شده است که از یک استراتژی مناسب استفاده کرده و بدین‌وسیله جذب عناصر غذایی را با حداقل صرف انرژی ادامه داده است. اسید آبسزیک که در زمان تنش در گیاهان تجمع پیدا می‌کند دلیل اصلی کاهش ضخامت و وزن تر ریشه و تولید تارهای کشنده است (Gazanchian et al., 2005). کاهش وزن تر ریشه در تاغ

جدول ۱. مقایسه میانگین صفات اندازه‌گیری شده در شرایط تنش خشکی در گیاه رزماری

Table 1. Comparison of the mean of measured traits in drought stress conditions in rosemary

شدت تنش خشکی drought stress	وزن تر اندام هوایی Fresh weight shoot	وزن تر ریشه Fresh weight root	طول اندام هوایی height shoot	طول ریشه height root	وزن خشک اندام هوایی dry weight shoot	وزن خشک ریشه dry weight root	سطح برگ leaf area	تعداد برگ number leaf
	---------- gr ----------		---------- cm ----------		---------- g ----------		cm^2	
100% FC	29.67^{a}	14.33^{a}	57.33^{a}	17.67^{b}	11.15^{a}	7.09^{a}	1.0^{a}	296.0^{a}
75% FC	27.00^{a}	13.33^{ab}	53.67^{ab}	27.67^{a}	9.27^{ab}	4.88^{b}	0.75^{b}	197.0^{b}
50% FC	19.67^{b}	11.67^{bc}	49.00^{b}	30.33^{a}	7.52^{bc}	4.41^{bc}	0.75^{b}	125.0^{c}
25% FC	15.33^{b}	10.67^{c}	40.67^{c}	29.33^{a}	6.76^{c}	3.35^{c}	0.75^{b}	111.0^{d}

میانگین‌های دارای حروف مشابه در هر ستون تفاوت معنی‌داری از نظر آزمون دانکن در سطح احتمال ۵ درصد با یکدیگر ندارند.

The meanings of the same letters in each column do not have a significant difference in Duncan test at 5% probability level

در مطالعه راد و همکاران (Rad et al., 2009) و کاهش ۵۴ درصدی ضخامت ریشه و وزن تر ریشه در تیمار ۲۵ درصد ظرفیت مزرعه در دو رقم فستوکای بومی و تجاری در مطالعه سلاح ورزی و همکاران (Salahvarzi et al., 2008) نیز با نتایج آزمایش حاضر همسو است.

نتایج تجزیه واریانس نشان‌دهنده تأثیر معنی‌دار تنش خشکی بر وزن خشک ریشه بود. بر این اساس مشخص شد با

افزایش تنش خشکی، میانگین وزن خشک ریشه کاهش یافت که بیشترین وزن خشک ریشه متعلق به تیمار ۱۰۰٪ ظرفیت زراعی (۷/۰۹ گرم) و کمترین وزن خشک ریشه مربوط به تیمار تنش خشکی ۲۵٪ ظرفیت مزرعه (۳/۳۵ گرم) بود (جدول ۱). کاهش معنی‌دار ماده خشک ریشه در اثر افزایش تنش خشکی، دلالت بر تحت تأثیر قرار گرفتن ریشه به‌عنوان یکی از مهم‌ترین اجزاء گیاه در اثر این پدیده محیطی دارد. درواقع با پیشرفت تنش خشکی همچنان که فتوسنتز برگ کاهش پیدا می‌کند، احتیاجات قندی برای تنظیم اسمزی در گیاهان زیاد شده و به دنبال آن رشد ریشه به‌طور اجتناب‌ناپذیری متوقف می‌گردد (Yazdanpanah, 2011).

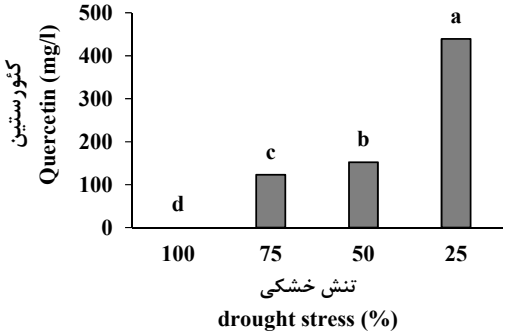
نتایج این آزمایش نشان داد ارتفاع بوته تحت تأثیر سطوح مختلف تنش خشکی قرار گرفت؛ به‌طوری‌که با افزایش تنش خشکی، میانگین طول اندام هوایی روند کاهشی نشان داد و از این نظر تفاوت بین تیمارهای خشکی معنی‌دار بود. بیشترین میانگین طول اندام هوایی با ۵۷/۳۳ سانتی‌متر مربوط به تیمار ۱۰۰٪ ظرفیت مزرعه بود و کمترین میانگین طول اندام هوایی با ۴۰/۶۷ سانتی‌متر مربوط به تیمار تنش خشکی ۲۵٪ ظرفیت مزرعه بود (جدول ۱). یکی از اولین نشانه‌های کمبود آب، کاهش آماس و درنتیجه کاهش تقسیم و توسعه سلول به‌ویژه در ساقه و برگ‌ها است و به همین دلیل است که اولین اثر محسوس کم‌آبی بر روی گیاهان را می‌توان از اندازه کوچک‌تر برگ‌ها یا ارتفاع گیاه تشخیص داد (Salahvarzi et al., 2008) که در مطالعه حاضر نیز ارتفاع گیاهان و سطح برگ با افزایش تنش خشکی کاهش یافت. بابایی و همکاران (Babaee et al., 2010) نیز در بررسی اثر تنش خشکی بر صفات مورفولوژیک آویشن به این نتیجه رسیدند که تنش خشکی به‌طور معنی‌دار باعث کاهش پارامترهای رشدی و عملکرد اندام رویشی نظیر ارتفاع گیاه شد.

طبق نتایج به‌دست‌آمده از این آزمایش، طول ریشه تحت تأثیر تنش خشکی قرار گرفت. بر این اساس، بیشترین میانگین طول ریشه با ۳۰/۳۳ سانتی‌متر مربوط به تیمار ۵۰٪ ظرفیت مزرعه بود که اختلاف آن ۲۵٪ ظرفیت مزرعه (۲۹/۳۳ سانتی‌متر) و تیمار ۷۵٪ ظرفیت مزرعه (۲۷/۶۷ سانتی‌متر) معنی‌دار نبود و کمترین میانگین طول ریشه با ۱۷/۶۷ سانتی‌متر مربوط به تیمار ۱۰۰٪ ظرفیت مزرعه بود (جدول ۱). این نتایج نشان می‌دهد که رفتار ریشه گیاه رزماری متأثر از تنش رطوبتی خاک بوده و با افزایش تنش رطوبتی به‌عنوان یک عامل محدودکننده، ریشه‌ها به دنبال رطوبت بوده و در اعماق که رطوبت بیشتری در دسترس بوده است، توسعه بیشتری یافته‌اند. نتایج آزمایش حاضر با گزارش‌های سودائی زاده و همکاران (Sodaeizadeh et al., 2016) روی گیاه مرزه مطابقت دارد.

نتایج این آزمایش نشان داد با افزایش تنش خشکی، سطح برگ گیاه دارویی رزماری روند کاهشی داشت و از این نظر تفاوت بین تیمارهای خشکی معنی‌دار بود. بیشترین سطح برگ (۱/۰ سانتی‌متر مربع) متعلق به تیمار ۱۰۰٪ ظرفیت مزرعه بود و با اعمال تنش خشکی سطح برگ کاهش یافت (جدول ۱). محدودیت سطح برگ می‌تواند اولین خط دفاعی برای مقابله با خشکی باشد، بنابراین کاهش پتانسیل آب در مدت دوره کم‌آبی، سبب کاهش آب بافت‌های گیاه شده که نتیجه آن کاهش سطح برگ، کوچک شدن برگ‌ها و کاهش طول ساقه است (Shao et al., 2008). همچنین تعداد برگ تحت تأثیر تنش خشکی قرار گرفت و بیشترین تعداد برگ (۲۹۶/۰ برگ) متعلق به تیمار ۱۰۰٪ ظرفیت مزرعه بود و کمترین تعداد برگ (۱۱۱/۰ برگ) مربوط به تیمار ۲۵٪ ظرفیت مزرعه بود (جدول ۱). کاهش تعداد برگ به دلیل افزایش تجمع اتیلن و پیری زودرس گیاه در زمان بروز تنش خشکی می‌تواند به‌عنوان راهکاری در کاهش تعرق و فرار از تنش باشد. علاوه بر این از نظر تئوری کاهش سطح برگ مکانیسم سازگاری مهمی است که گیاهان با کاهش تقسیم و توسعه سلولی در مواجهه با محدودیت دسترسی به آب اتخاذ می‌کنند (Xia, 1994).

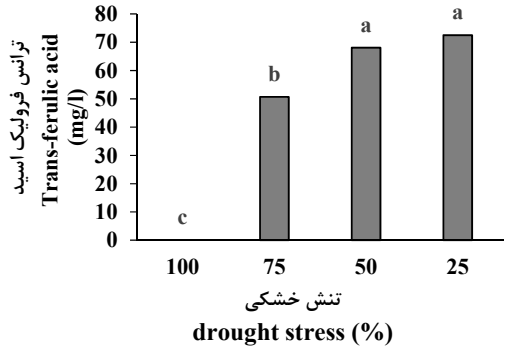
از ۱۷ نوع پلی‌فنول مورد آزمایش در گیاه رزماری، Sinapic acid، Gallic acid، Catechin، Caffeic acid، Chloregenic acid، p-Coumaric acid، Coumarin، Carvacrol، Vanilin، Ellagic acid، Thymol در هیچ‌کدام از تیمارها و تکرارهای آزمایش قابل‌تشخیص نبود. سایر پلی‌فنول در نمونه‌های با میزان‌های مختلف قابل‌تشخیص بود. نتایج تجزیه واریانس نشان داد، ۶ پلی‌فنول اندازه‌گیری شده شامل Quercetin، Trans-ferulic acid، Hesperedin، Eugenol، Hesperetin، Rosmarinic acid نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال یک درصد در بین تیمارهای سطوح مختلف تنش خشکی در گیاه رزماری بود. این نتایج نشان‌دهنده‌ی این است که تیمارهای اجراشده در آزمایش بر میزان پلی فنل‌های موجود در گیاه تأثیر معنی‌داری دارند.

به‌طورکلی با افزایش تنش خشکی (شکل ۱)، میانگین Quercetin روند افزایشی نشان داد و از این نظر تفاوت بین تیمارهای خشکی معنی‌دار بود. بیشترین میانگین Quercetin با ۴۳۹/۰۴ میلی‌گرم بر لیتر مربوط به تیمار ۲۵٪ ظرفیت مزرعه بود و کمترین میانگین Quercetin با صفر میلی‌گرم بر لیتر مربوط به تیمار ۱۰۰٪ ظرفیت مزرعه بود (شکل ۱). با افزایش تنش خشکی، میانگین Trans-ferulic acid روند افزایشی نشان داد و از این نظر تفاوت بین تیمارهای خشکی معنی‌دار بود. بیشترین میانگین Trans-ferulic acid با ۷۲/۴۸ میلی‌گرم بر لیتر مربوط به تیمار ۲۵٪ ظرفیت مزرعه بود که اختلاف معنی‌داری با تیمار ۵۰٪ ظرفیت مزرعه نداشت و کمترین مقدار این ترکیب متعلق به تیمار ۱۰۰٪ ظرفیت مزرعه بود (شکل ۲).



شکل ۱. تأثیر تنش خشکی بر میزان کیورستین گیاه رزماری

Fig. 1. Effect of drought stress on Quercetin content of Rosemary

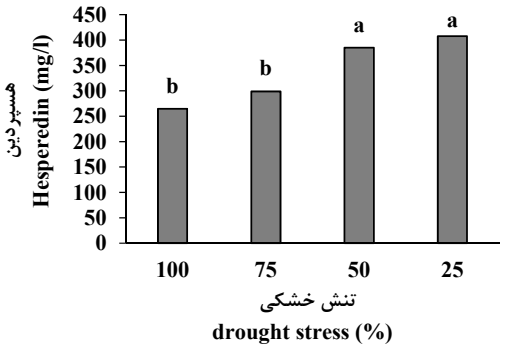


شکل ۲. تأثیر تنش خشکی بر میزان فرولیک اسید گیاه رزماری

Fig. 2. Effect of drought stress on Trans-ferulic acid content of Rosemary

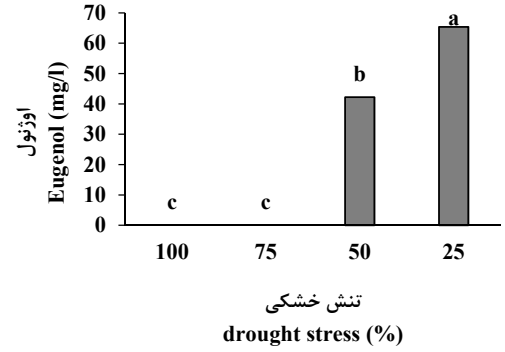
با افزایش تنش خشکی، مقدار Hesperedin نیز افزایش یافت (شکل ۳). به‌طوری‌که بیشترین مقدار Hesperedin با ۴۰۷/۶۲ میلی‌گرم بر لیتر مربوط به تیمار ۲۵٪ ظرفیت مزرعه بود که اختلاف آن با تیمار ۵۰٪ ظرفیت مزرعه معنی‌داری نبود و کمترین مقدار این ترکیب متعلق به تیمار ۱۰۰٪ و ۷۵٪ ظرفیت مزرعه بود که تفاوت معنی‌داری بین آن‌ها وجود نداشت (شکل ۳). با افزایش تنش خشکی، ترکیب Eugenol روند افزایش نشان داد و از این نظر تفاوت بین تیمارهای خشکی معنی‌دار بود. بیشترین میزان Eugenol با ۶۵/۳۶ میلی‌گرم بر لیتر مربوط به تیمار ۲۵٪ ظرفیت مزرعه بود و کمترین مقدار این ترکیب متعلق به تیمار ۱۰۰٪ ظرفیت مزرعه بود (شکل ۴).

در شرایط تنش خشکی ۲۵٪ ظرفیت مزرعه مقدار Hesperetin به ۱۰۷/۳۴ میلی‌گرم بر لیتر رسید (نمودار ۸) که بیشترین مقدار را داشت و در شرایط عدم تنش خشکی (۱۰۰٪ ظرفیت مزرعه) این ترکیب در عصاره گیاه وجود نداشت (شکل ۵).



شکل ۳. تأثیر تنش خشکی بر میزان هسپردین گیاه رزماری

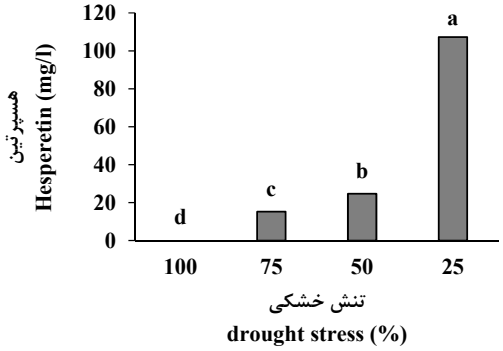
Figure 3. Effect of drought stress on Hesperedin content of Rosemary



شکل ۴. تأثیر تنش خشکی بر میزان اوژنول گیاه رزماری

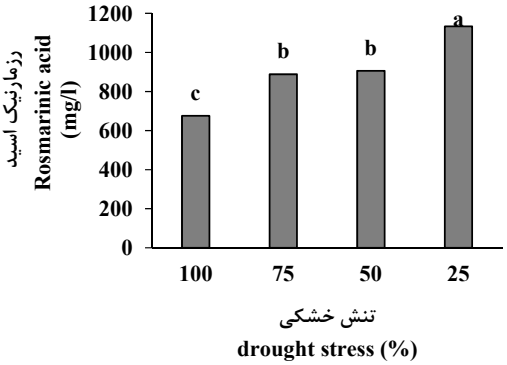
Fig. 4. Effect of drought stress on Eugenol content of Rosemary

میزان Rosmarinic acid در شرایط ۲۵٪ ظرفیت مزرعه به ۱۱۳۳/۳۴ میلی‌گرم بر لیتر رسید درحالی‌که در شرایط نرمال (۱۰۰٪ ظرفیت مزرعه) مقدار این ترکیب ۶۷۵/۶۳ میلی‌گرم در لیتر بود (شکل ۶).



شکل ۵. تأثیر تنش خشکی بر میزان هسپرتین گیاه رزماری

Fig. 5. Effect of drought stress on Hesperetin rosemary

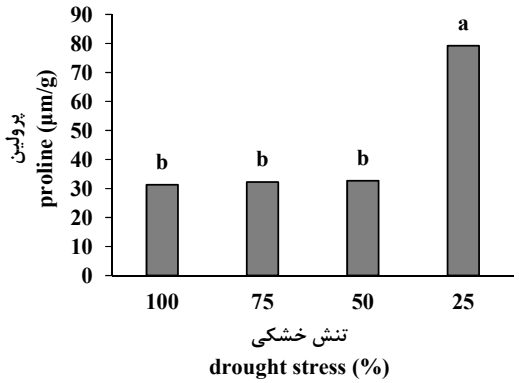


شکل ۶. تأثیر تنش خشکی بر میزان رزمارنیک اسید گیاه رزماری

Fig. 6. Effect of drought stress on Rosmarinic acid content of rosemary

گزارش‌هایی مبنی بر افزایش میزان متابولیت‌های ثانویه در اثر القای تنش خشکی در رزماری (Olinas et al., 1996) و سیاه‌دانه (Norozpoor et al., 2007) وجود دارد. گزارش شده است که بیوسنتز این متابولیت‌ها تنها تحت تأثیر ژنتیک گیاه نیست بلکه با توجه به الگوهای محیطی نیز تغییر می‌کند (Farahani et al., 2013). گزارش گردیده است که به دلیل کاهش رشد در اثر القای تنش خشکی، تثبیت کربن در طی فتوسنتز صرف تولید متابولیت‌های ثانویه می‌شود (Turtola et al., 2003) و بیشتر متابولیت‌ها در گیاهان تحت تنش در جهت جلوگیری از اکسیداسیون سلولی است (Farahani et al., 2013). با توجه به اینکه تنش خشکی نتایجی از قبیل بسته شدن روزنه‌ها، کاهش در سرعت انتقال مواد غذایی در گیاهان، کاهش پتانسیل آب در بافت‌های گیاهی، کاهش فتوسنتز، بازدارندگی از رشد، افزایش در تجمع اسید آبسزیک، پرولین، تشکیل رادیکال‌های آزاد و استرس اکسیداتیو را به همراه دارد، لذا زمانی که گیاهان در شرایط تنش محیطی قرار می‌گیرند از طریق تولید متابولیت‌های ثانویه مختلف خودشان را از این شرایط حفظ می‌کنند. ترکیبات فنولی با مکانیسم-های متعددی مثل جاروب کردن رادیکال‌های آزاد و قطع کردن واکنش‌های زنجیره‌وار اکسیداسیون، اهدای هیدروژن، حذف اکسیژن یکتایی، کلات کردن یون‌های فلزی و یا قرار گرفتن به‌عنوان سوبسترای آنزیم‌های پراکسیداز نقش آنتی‌اکسیدانی خود را ایفا می‌کنند. این ترکیبات همچنین با اهدای سریع هیدروژن به رادیکال‌های لیپید از ادامه زنجیره پراکسیداسیون ممانعت می‌کنند و قادرند محصولاتی با قدرت اکسیدکنندگی کمتر از ترکیب‌های اولیه به وجود آورند (Chu et al., 2000). نتایج این آزمایش نشان می‌دهد که ترکیبات فنولی می‌توانند مسئول فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌های استخراج‌شده از گیاهان در تیمارهای مختلف باشند.

نتایج این آزمایش نشان داد، در شرایط تنش خشکی شدید (۲۵٪ ظرفیت مزرعه) مقدار پرولین به ۷۹/۷۲ میکرومولار بر گرم رسید و در شرایط نرمال (۱۰۰٪ ظرفیت مزرعه) مقدار پرولین برابر با ۳۱/۳۰ میکرومولار بر گرم بود (شکل ۷). درواقع تجمع پرولین در اثر تنش خشکی یک واکنش عمومی است که به علت ساخت پرولین در بافت‌ها، ممانعت از اکسیداتیو پرولین و جلوگیری از شرکت پرولین در ساخت پروتئین‌ها صورت می‌گیرد (Molina-Montenegro et al., 2011). حسنی (Hasani, 2006) نیز در بررسی تأثیر تنش خشکی بر درصد و عملکرد اسانس و ویژگی‌های فیزیولوژیک گیاه دارویی بادرشبو (*Dracocephalum moldavica* L.) گزارش کردند که تنش رطوبتی باعث افزایش مقدار پرولین شد. همچنین بابایی و همکاران (Babaee et al., 2010) در بررسی اثر تنش خشکی بر میزان پرولین در آویشن به این نتیجه رسیدند که تنش خشکی اثر معنی‌داری بر انباشت پرولین داشته و میزان آن را افزایش داده است.

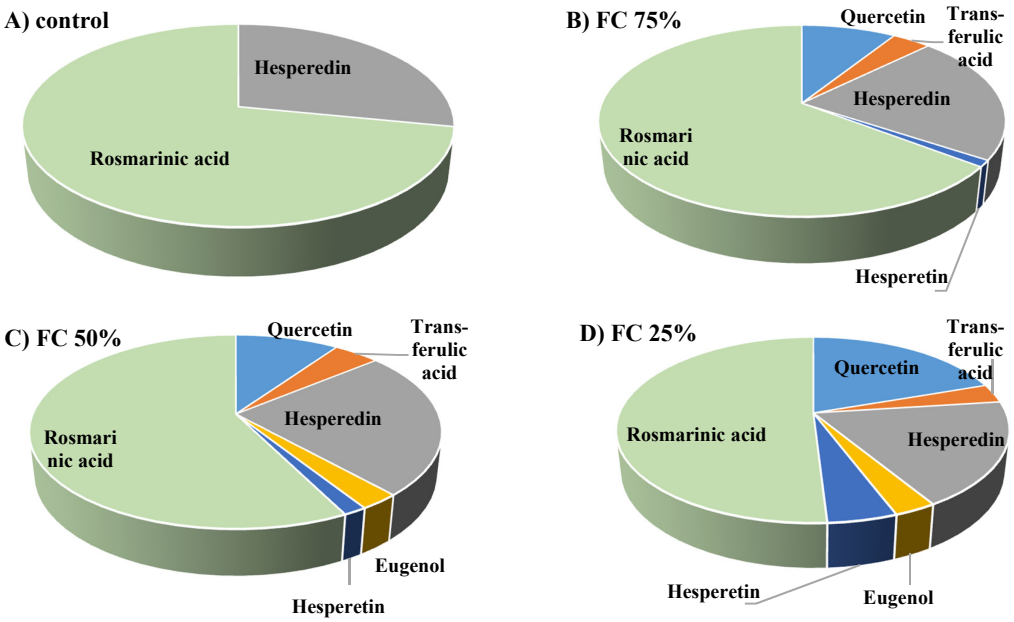


شکل ۷. تأثیر تنش خشکی بر محتوای پرولین گیاه رزماری

Fig. 7. Effect of drought stress on proline content of Rosemary

نتیجه‌گیری نهایی

هرچند گیاهان در شرایط تنش خشکی تلاش می‌کنند تا خود را در شرایط ایده‌آل نگه‌دارند، اما این روند در روزهای نخستین تنش فقط مانع بروز تغییرات جدی در ترکیبات گیاهی می‌شود و پس از گذشت چند روز ترکیبات گیاهی به‌شدت تحت تأثیر تنش‌های اعمال‌شده قرار می‌گیرند و از نظر کمی و کیفی با شرایط بدون تنش تفاوت قابل‌ملاحظه‌ای را نشان می‌دهند. آنچه در این تحقیق نیز مشاهده شد این مطلب را تأیید می‌کند. افزایش تولید متابولیت‌های گیاهی درنتیجه تنش‌خشکی در این پژوهش ممکن است ناشی از اثر تنش بر رشد و عملکرد پیکر رویشی گیاه باشد، به‌عبارت‌دیگر، عملکرد پیکر رویشی و متابولیت‌های گیاهی همسو نیست و نقش مثبت تنش‌خشکی در این گیاهان اهمیت ویژه‌ای دارد. در تحقیق حاضر تنش خشکی ملایم (۷۵ درصد) از نظر رشد رویشی با تیمار شاهد (۱۰۰ درصد) نداشت و با افزایش شدت تنش عملکرد پیکر رویشی گیاه کاهش یافت ولی باعث افزایش تولید متابولیت ثانویه گیاه رزماری شد.



شکل ۸. درصد ترکیبات فنولی در گیاهان الف(شاهد، ب) ظرفیت زراعی ۷۵ درصد، ج) ظرفیت زراعی ۵۰ درصد و د) ظرفیت زراعی ۲۵ درصد

Fig. 8. Percentage of phenolic compounds in plants: (a) control, (b) 75% field capacity, (c) 50% field capacity, and (d) 25% field capacity

منابع

Akula, R., Ravishankar, G.A., 2011. Influence of abiotic stress signals on secondary metabolites in plants. Plant Signaling and Behavior. 6, 1720-1731.

Babaee, K., Dehaghi, M.A., Sanavi, S.M., Jabbari, R., 2010. Water deficit effect on morphology, prolin content and thymol percentage of thyme (*Thymus vulgaris* L.). Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants. 26, 239-251. [In Persian with English Summary].

Bahernik, Z., Rezaee, M.B., Ghorbani, M., Askari, F., Araghi, M.K., 2003. Evaluation of metabolic changes due to drought stress in sturefa hortensis. Iranian Herbal Medicines and Herbs Research. 20, 275-263. [In Persian with English Summary].

Bates, L.S., Waldren, R.P., Teare, I.D., 1973. Rapid determination of free proline for water-stress studies. Plant and soil. 39, 205-207.

Chu, Y.H., Chang, C.L., Hsu, H.F., 2000. Flavonoid content of several vegetables and their antioxidant activity. Journal of the Science of Food and Agriculture. 80, 561-566.

Farahani, A., Lebaschi, H., Hussein, M., Hussein, S.A., Reza, V.A., Jahanfar, D., 2013. Effects of arbuscular mycorrhizal fungi, different levels of phosphorus and drought stress on water use efficiency, relative water content and proline accumulation rate of coriander (*Coriandrum sativum* L.). Journal of Medicinal Plants Research. 2, 125-131.

Gazanchian, A., Khoush, K.S.N., Malboubi, M., Majidi, H.E., 2005. Survival of perennial cool-season grasses under water stress conditions and after establishment. Iranian Journal Natural, Research. 58, 217-230. [In Persian with English Summary].

Hasani, A., 2002. Effects of water stress on some morphological, physiological and metabolical characteristics of basil (*Ocimum basilicum*). Journal of Agricultural Science. 12, 47-59.

Huang, W.Y., Cai, Y.Z., Zhang, Y., 2009. Natural phenolic compounds from medicinal herbs and dietary plants: potential use for cancer prevention. Nutrition and cancer. 62, 1-20.

Jaafar, H.Z., Ibrahim, M.H., Fakri, M., Farhana, N., 2012. Impact of soil field water capacity on secondary metabolites, phenylalanine ammonia-lyase (PAL), maliondialdehyde (MDA) and photosynthetic responses of Malaysian Kacip Fatimah (*Labisia pumila* Benth). Molecules. 17, 7305-7322.

Kaya, M.D., Okçu, G., Atak, M., Cıkılı, Y., Kolsarıcı, Ö., 2006. Seed treatments to overcome salt and drought stress during germination in sunflower (*Helianthus annuus* L.). European Journal of Agronomy. 24, 291-295.

Kusano, T., Berberich, T., Tateda, C., Takahashi, Y., 2008. Polyamines: essential factors for growth and survival. Planta. 228, 367-381.

Luvaha, E., Netondo, G.W., Ouma, G., 2010. Effect of water deficit on the physiological and morphological characteristics of mango (*Mangifera indica*) rootstock seedlings. American Journal of Plant Physiology. 5, 7-21.

Mira, S., Veiga-Barbosa, L., González-Benito, M.E., Pérez-García, F., 2018. Inter-population variation in germination characteristics of Plantago lanceolate seeds: effects of temperature, osmotic stress and salinity. Mediterr. Bot. 39, 89-96.

Mišan, A., Mimica-Dukić, N., Mandić, A., Sakač, M., Milovanović, I., Sedej, I., 2011. Development of a rapid resolution HPLC method for the separation and determination of 17 phenolic compounds in crude plant extracts. Open Chemistry. 9, 133-142.

Molina-Montenegro, M.A., Quiroz, C.L., Torres-Díaz, C., Atala, C., 2011. Functional differences in response to drought in the invasive Taraxacum officinale from native and introduced alpine habitat ranges. Plant Ecology and Diversity. 4, 37-44.

Mozafarian, V.A., 1998. Culture of Plants Name of Iran. Contemporary Culture. 435

Norozpoor, G., Rezvani Moghaddam, P., 2007. Effect of different irrigation intervals and plant density on oil yield and essences percentage of black cumin (*Nigella sativa*). Pajouhesh and Sazandegi. 19, 133-138. [In Persian with English Summary].

Olinas, V., Deiana, S., Gessa, C., Bazzoni, A., Loddo, M.A., Satta, D., 1996. Effect of water and nutrionalconditiond on *Rosmarinus officinalis* phenolic fraction and essential oil yield. Rivista Italiana Emergency Preparedness Position on Timeliness. 19, 189-198.

Rad, M.H., Meshkat, M.A., Soltani, M.A.H.D.I., 2009. The effects of drought stress on some saxual's (*Haloxylon aphyllum*) morphological characteristics. Iranian Journal of Range and Desert Research. 16, 34-43.

Salahvarzi, Y., Tehrani, A. and Gazanchian, A., 2008. Physiomorphological changes under drought stress and rewatering in endemic and exotic turfgrasses. Journal of Iranian Horticultural Science and Technology. 9, 193-204. [In Persian with English Summary].

Shao, H.B., Chu, L.Y., Jaleel, C.A., Zhao, C.X., 2008. Water-deficit stress-induced anatomical changes in higher plants. Comptes Rendus Biologies. 331, 215-225.

Sodaeizadeh, H., Shamsaie, M., Tajamoliyan, M., Mirmohammadi, M.A.M., Hakimzadeh, M.A., 2016. The effects of water stress on some morphological and physiological characteristics of satureja hortensis. Journal of Plant Process and Function. 5, 1-12.

Sreevalli, Y., Baskaran, K., Chandrashekara, R.S., Kulkarni, R.N., 2000. Preliminary observations on the effect of irrigation frequency and genotypes on yield and alkaloid concentration in periwinkle. Journal of Medicinal and Aromatic Plants. 22, 356-358.

Swamy, K.N., Rao, S.S.R., 2008. Influence of 28-homobrassinolide on growth, photosynthesis metabolite and essential oil content of geranium (*Pelargonium graveolens* L.) Herit]. American Journal of Plant Physiology. 3, 173-179.

Tarraf, S., Ibrahim, M.E., 1999. Physiological response of rosemary, Rosmarinus officinalis L. plant to brassinosteroid and uniconazole. Egyptian Journal of Horticulture. 29, 108-121.

Turtola, S., Manninen, A.M., Rikala, R., Kainulainen, P., 2003. Drought stress alters the concentration of wood terpenoids in Scots pine and Norway spruce seedlings. Journal of chemical ecology. 29, 1981-1995.

Walpola, B.C., Arunakumara, K.K.I.U., 2010. Effect of salt stress on decomposition of organic matter and nitrogen mineralization in animal manure amended soils. Journal of Agricultural Sciences–Sri Lanka. 5(1).

Walters, D.T., Aulakh, M.S., Doran, J.W., 1992. Effects of soil aeration, legume residue, and soil texture on transformations of macro-and micronutrients in soils. Soil Science. 153, 100-107.

Xia, X.Z., 1994. Effects of soil drought during the generative development phase of faba bean (*Vicia faba*) on photosynthetic characters and biomass production. The Journal of Agricultural Science. 122, 67-72.

Yazdanpanah, S., Baghizadeh, A., Abbassi, F., 2011. The interaction between drought stress and salicylic and ascorbic acids on some biochemical characteristics of Satureja hortensis. African Journal of Agricultural Research. 6, 798-807.