

## فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیا لیاز و برخی آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان بادرشبو (*Dracocephalum moldavica*) در پاسخ به محلول پاشی آبسیزیک اسید در شرایط مختلف رطوبتی

وحیده خالق نژاد<sup>۱</sup>، علیرضا یوسفی\*<sup>۱</sup>، افشین توکلی<sup>۱</sup> و بهمن فرجمند<sup>۲</sup>

<sup>۱</sup> گروه مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زنجان

<sup>۲</sup> گروه شیمی، دانشکده علوم، دانشگاه زنجان

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۱۱/۱۷، تاریخ پذیرش نهایی: ۱۳۹۸/۰۵/۱۱)

### چکیده

تنش خشکی یکی از مهم‌ترین عوامل محدودکننده رشد و عملکرد گیاه در شرایط خشک است. هورمون آبسیزیک اسید (ABA) یکی از تنظیم‌کننده‌های مهم گیاهی است که در بروز بسیاری از پاسخ‌های فیزیولوژیکی و مورفولوژیکی گیاه در شرایط خشکی نقش دارد. به‌منظور ارزیابی اثر متقابل تنش خشکی و کاربرد ABA بر فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیا لیاز (PAL) و برخی آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان بادرشبو (*Dracocephalum moldavica*)، آزمایشی به‌صورت کرت‌های خردشده بر پایه طرح بلوک‌های کاملاً تصادفی با سه تکرار در سال ۱۳۹۵ در مزرعه پژوهشی دانشگاه زنجان اجرا شد. در این آزمایش، سطوح آبیاری در سه سطح (آبیاری مطلوب، تنش ملایم تا رسیدن به پتانسیل آبی ۰/۸- مگاپاسکال و تنش شدید تا رسیدن به پتانسیل آبی ۱/۵- مگاپاسکال) در کرت‌های اصلی و سطوح هورمون ABA در پنج سطح (صفر، ۵، ۱۰، ۲۰ و ۴۰ میکرومولار) در کرت‌های فرعی قرار گرفتند. نتایج مطالعه حاضر نشان داد که اثر سطوح آبیاری، ABA و نیز اثر متقابل سطوح آبیاری در سطوح ABA برای فعالیت PAL، کاتالاز (CAT)، آسکوربات پراکسیداز (APX)، پراکسیداز (POD)، پراکسیداسیون لیپید، سطح برگ، وزن خشک کل بوته، ارتفاع گیاه و عملکرد دانه معنی‌دار بود. بدون کاربرد ABA، تنش خشکی ملایم و شدید، به‌ترتیب ۱۵/۰۲ و ۳۰ درصد فعالیت PAL، ۲۸/۰۲ و ۲۵/۴۴ درصد فعالیت CAT، ۴۸/۸۱ و ۳۵/۵۵ درصد فعالیت آنزیم APX و ۷۷/۸۳ و ۸۸/۳ درصد فعالیت آنزیم POD را نسبت به شرایط آبیاری مطلوب افزایش دادند. هم‌چنین کاربرد ABA خارجی سبب افزایش پراکسیداسیون لیپید، فعالیت PAL و آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان نسبت به شاهد (عدم کاربرد ABA) شد. تنش خشکی ملایم و شدید در شرایط بدون کاربرد ABA، میزان عملکرد دانه را به‌ترتیب ۱۹/۶۹ و ۳۱/۰۲ درصد نسبت به شرایط آبیاری مطلوب کاهش دادند. یک روند کاهشی در عملکرد دانه در پاسخ به افزایش غلظت ABA وجود داشت. میزان کاهش عملکرد دانه در گیاهان تیمار شده با غلظت‌های مختلف ABA، ۱۴/۶۹-۵/۱۸ درصد در شرایط آبیاری مطلوب، ۲۰/۷۴-۴/۲۲ درصد در شرایط تنش ملایم و ۳۳/۸۳-۴/۳۷ درصد در شرایط تنش شدید در مقایسه با تیمار شاهد بود.

واژه‌های کلیدی: آسکوربات پراکسیداز، پراکسیداسیون لیپید، کاتالاز، عملکرد دانه

بادرشبو با نام علمی *Dracocephalum moldavica* گیاهی

مقدمه

سمیت‌زدایی ROS نخواهد بود و آسیب‌های اکسیداتیو منجر به مرگ گیاه خواهد شد (Chaves *et al.*, 2003). برخی از آنزیم‌های آنتی‌اکسیداتی که در دفع ROS در پاسخ به تنش خشکی نقش دارند شامل سوپراکسید دیسموتاز (SOD)، کاتالاز (CAT)، آسکوربات پراکسیداز (APX)، پراکسیداز (POD) و گلوکاتیون ریداکتاز (GR) هستند (Srivalli *et al.*, 2003).

علاوه بر برخی عوامل محیطی، تنظیم‌کننده‌های رشد گیاه هم می‌توانند در رشد و توسعه گیاهان نقش مهمی ایفا کنند (Ruela de Sousa *et al.*, 2007). آبسزیک اسید (ABA) یکی از تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی است که بسیاری از فرآیندهای فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی مانند بلوغ بذر و جوانه‌زنی را کنترل می‌کند (Seki *et al.*, 2002). هنگامی که گیاه در شرایط تنش مانند خشکی، شوری، دماهای بالا و پایین و نیز حمله پاتوژن‌ها قرار می‌گیرد، ABA به‌عنوان یک ترکیب پیام‌رسان عمل می‌کند (Leung and Giraudat, 1998). کاربرد ABA خارجی می‌تواند رشد و ساختار گیاه را تحت تأثیر قرار داده و هم‌چنین باعث تغییر در تبادلات گازی گیاه شود (Li *et al.*, 2004). مطابق نتایج محققان کاربرد ABA موجب افزایش پراکسیداسیون لیپید شده (Bueno *et al.*, 1998) و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت را افزایش داده است (Zhou *et al.*, 2005). هدف از این مطالعه، بررسی اثر سطوح مختلف رطوبتی، غلظت‌های مختلف هورمون آبسزیک اسید و اثر متقابل این دو بر فعالیت برخی از آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت و پارامترهای رشدی بادرشبو در شرایط مزرعه بود.

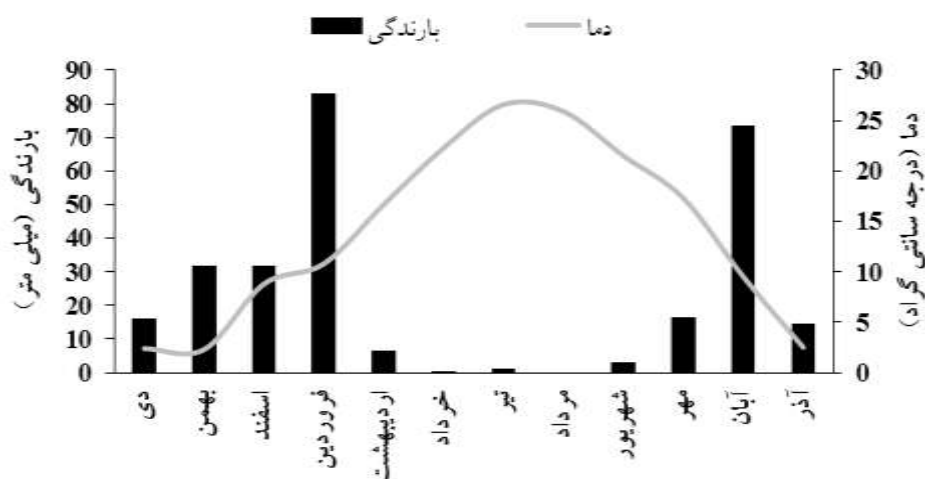
#### مواد و روش‌ها

**محل و نحوه اجرای آزمایش:** جهت مطالعه اثر متقابل تنش خشکی و هورمون آبسزیک اسید بر فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانتی در گیاه بادرشبو (*Dracocephalum moldavica*) آزمایشی به‌صورت کرت‌های خردشده در قالب طرح بلوک‌های کاملاً تصادفی با سه تکرار در سال ۱۳۹۵ در مزرعه تحقیقاتی دانشگاه زنجان اجرا شد. محل اجرای آزمایش دارای موقعیت جغرافیایی عرض ۳۶ درجه و ۴۱ دقیقه شمالی

یک‌ساله و معطر است که به خانواده Lamiaceae تعلق دارد. این گیاه بومی مناطق مرکزی آسیا بوده و در مناطقی از اروپای مرکزی و شرقی رشد می‌کند (Hussein *et al.*, 2006). در ایران بادرشبو بیش‌تر در ارتفاعات البرز و در نواحی شمال غربی کشور می‌روید (Dastmalchi *et al.*, 2007). محتوای اسانس و عصاره بادرشبو تنوع گسترده‌ای از ترکیبات را بسته به محل رویش آن نشان می‌دهد. ترکیبات معطر این گیاه برای درمان بسیاری از بیماری‌ها از جمله اختلالات قلبی مورد استفاده قرار می‌گیرد (Yang *et al.*, 2014).

کمبود آب یکی از مهم‌ترین دلایل محدودکننده رشد و توسعه گیاهان به‌خصوص در مناطق خشک و نیمه‌خشک است (Caser *et al.*, 2019). پاسخ گیاه به تنش خشکی به شدت آن و نیز مرحله‌ای از رشد گیاه که در آن مرحله گیاه در معرض تنش قرار می‌گیرد، بستگی دارد (Jongdee *et al.*, 2002). تنش خشکی تغییرات متابولیکی، بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی متعددی در رشد، وضعیت آبی، پایداری غشا، محتوای رنگدانه‌ها و فتوسنتز گیاه ایجاد می‌کند (Li-Ping *et al.*, 2006; Martinez *et al.*, 2007; Miyashita *et al.*, 2005). تنش کمبود آب با بستن روزنه‌ها، موجب کاهش ورود دی‌اکسید کربن به گیاه شده و در نتیجه میزان چرخه کالوین کاهش می‌یابد. در این وضعیت انرژی نورانی دریافت‌شده که باید به مولکول‌های ADP و NADP<sup>+</sup> انتقال می‌یافت، به مولکول اکسیژن منتقل شده و منجر به تولید گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) مانند رادیکال سوپراکسید، هیدروژن پراکسید، هیدروکسیل و اکسیژن سینگلت می‌شود (Li and Van Staden, 1998). این گونه‌های فعال می‌توانند باعث ایجاد تنش اکسیداتیو و در نتیجه بروز بسیاری از فرآیندهای مخرب مانند پراکسیداسیون لیپید و تخریب پروتئین و نوکلئیک اسید شوند (Scandalios, 1993).

گیاهان با کمک آنتی‌اکسیدان‌های آنزیمی و غیرآنزیمی با ROS مقابله می‌کنند و به این طریق در برابر تنش‌های اکسیداتیو محافظت می‌شوند (Van Breusegem *et al.*, 1999). اگر شدت تنش‌های پیش روی گیاه از ظرفیت سیستم آنتی‌اکسیدانتی پیشی بگیرد، این سیستم دیگر قادر به



شکل ۱- میانگین بارندگی و دمای محل اجرای آزمایش در سال زراعی ۱۳۹۵

در هر بار آبیاری و قبل از اعمال تنش در کرت‌های مختلف مساوی بود. در مجموع حجم کل آب مصرفی برای کرت‌ها در آبیاری مطلوب ۱۴۲۹۰، بدر شرایط تنش ملایم ۱۲۰۷۴ و در شرایط تنش شدید ۱۰۹۸۰ متر مکعب در هکتار بود. برای اعمال تنش با توجه به منحنی رطوبتی مزرعه، ابتدا آبیاری کرت‌های مربوط به تنش شدید و سپس آبیاری کرت‌های مربوط به تنش ملایم به‌طور کامل قطع شد تا پتانسیل‌های آبی مورد نظر حاصل شود. این مدت برای تنش شدید ۱۴ و برای تنش ملایم ۸ روز بود. برای تعیین این پتانسیل‌های آبی منحنی رطوبتی مزرعه محل اجرای آزمایش استفاده گردید. بدین صورت که محتوای آب خاک از طریق نمونه‌برداری روزانه به‌دست آمد و تا حصول پتانسیل‌های موردنظر ادامه پیدا کرد. اعمال تنش خشکی با مشاهده جوانه گل (۶۰ روز پس از کشت) بر روی گیاه آغاز گردید. هورمون ABA در پنج سطح صفر، ۵، ۱۰، ۲۰ و ۴۰ میکرومولار مورد استفاده قرار گرفت. زمانی که گیاه وارد مرحله گل‌دهی (۷۵ روز پس از کشت) شد، محلول‌پاشی برگی ABA صورت گرفت. محلول‌پاشی با ABA سه مرتبه و به فاصله سه روز یک‌بار صورت گرفت. ABA از Aldrich-Sigma خریداری شده بود. نمونه‌برداری از گیاه مصادف با رسیدن خاک به پتانسیل‌های آبی موردنظر بود. پس از حصول این پتانسیل‌ها و اتمام نمونه‌برداری از گیاه، مجدداً اقدام به آبیاری کرت‌ها شد.

و طول ۴۸ درجه و ۲۹ دقیقه شرقی و ارتفاع ۱۶۶۳ متری از سطح دریا بود. میانگین دما و بارش ۳۰ ساله در این منطقه به‌ترتیب ۱۱ درجه سانتی‌گراد و ۲۹۳ میلی‌متر گزارش شده است. میانگین دما و بارندگی محل اجرای آزمایش در سال زراعی ۱۳۹۵ در شکل ۱ آورده شده است. خاک محل انجام مطالعه دارای بافت لوم شنی با pH ۷/۳۲، هدایت الکتریکی ۱/۲ دسی‌زیمنس بر متر و ماده آلی ۱/۷۵ درصد بود و مقدار عناصر نیتروژن، فسفر و پتاسیم به‌ترتیب ۰/۲ درصد، ۸/۴ میلی‌گرم بر کیلوگرم و ۱۵۶ میلی‌گرم بر کیلوگرم گزارش شد. زمین محل اجرای آزمایش که در سال زراعی قبل به صورت آیش بود، قبل از کشت شخم زده و برای کاشت آماده شد. بذور بادرشبو با قوه نامیه ۹۰ درصد، از شرکت پاکان بذر اصفهان خریداری شد. هر کرت آزمایشی به طول ۴ و عرض ۱/۵ متر و فاصله هر بلوک از هم نیز ۱/۵ متر بود. بذور با فاصله بین ردیف ۳۰ سانتی‌متر و روی ردیف ۱۰ سانتی‌متر کشت شدند و تراکم نهایی ۳۰ بوته در متر مربع حاصل گردید. در این آزمایش سه سطح رطوبتی مختلف مورد ارزیابی قرار گرفت: ۱- آبیاری مطلوب از زمان کشت بذر تا رسیدگی محصول، ۲- تنش ملایم تا رسیدن به پتانسیل آبی ۰/۸ مگاپاسکال و ۳- تنش شدید تا رسیدن به پتانسیل آبی ۱/۵ مگاپاسکال. آبیاری کرت‌ها به‌صورت آبیاری قطره‌ای تیپ با منافذی به فاصله ۱۰ سانتی‌متر از هم صورت گرفت. حجم آب

اضافه و بلافاصله تغییرات جذب در طول موج ۲۴۰ نانومتر به مدت یک دقیقه خوانده شد (Aebi, 1984). فعالیت ویژه آنزیم کاتالاز براساس ماکرومول  $H_2O_2$  تجزیه شده در دقیقه در میلی گرم پروتئین محاسبه شد.

برای تعیین فعالیت آنزیم پراکسیداز ۵۰ میکرولیتر از عصاره آنزیمی به ۳ میلی لیتر بافر اندازه گیری،  $4/51$  میکرولیتر  $H_2O_2$  و  $3/35$  میکرولیتر گایاکول اضافه و بلافاصله تغییرات جذب در طول موج ۴۷۰ نانومتر به مدت ۲ دقیقه خوانده شد (Chance and Maehly, 1955). اندازه گیری فعالیت آنزیم پراکسیداز براساس تشکیل تتراگایاکول از گایاکول در حضور پراکسید هیدروژن و آنزیم گایاکول بود. آنزیم پراکسیداز برای تجزیه هیدروژن پراکسید از گایاکول به عنوان دهنده الکترون استفاده می کند و تتراگایاکول تشکیل می شود. فعالیت ویژه آنزیم پراکسیداز به صورت ماکرومول تتراگایاکول تشکیل شده در دقیقه در میلی گرم پروتئین بیان شد. برای اندازه گیری فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز ۵۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی به ۳ میلی لیتر بافر اندازه گیری،  $4/51$  میکرولیتر  $H_2O_2$  و ۵ میلی مولار آسکوربات اضافه شد و تغییرات جذب در طول موج ۲۹۰ نانومتر خوانده شد (Nakano and Asada, 1981). اندازه گیری فعالیت آنزیم براساس تبدیل آسکوربات به منوهدیدرو آسکوربات در حضور هیدروژن پراکسید توسط آنزیم آسکوربات پراکسیداز است. در نهایت فعالیت ویژه آنزیم آسکوربات پراکسیداز براساس ماکرومول NADH مصرف شده در دقیقه در میلی گرم پروتئین تعیین گردید.

جهت اندازه گیری میزان پروتئین محلول از روش برادفورد استفاده شد (Bradford, 1976) و از سرم آلبومن گاوی به عنوان استاندارد استفاده گردید.

**پراکسیداسیون لیپید:** پراکسیداسیون لیپید براساس اندازه گیری محتوای مالون دی آلدئید (MDA) صورت گرفت. بدین منظور یک گرم از بافت تازه برگ در ۲۰ میلی لیتر تری کلرو استیک اسید (TCA) یک درصد ساییده شد و به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۱۲۰۰۰ سانتریفیوژ گردید. سپس یک میلی لیتر از محلول رویی به ۴ میلی لیتر TCA حاوی تیوباربتوریک اسید

**صفات مورد مطالعه،** اندازه گیری فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیا لیااز: برای اندازه گیری میزان فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیا لیااز، ۰/۳ گرم از بافت تر نمونه ها با  $6/5$  میلی لیتر بافر تریس-HCl ( $pH=7/5$ )، در هاون با ازت مایع ساییده شد. سپس عصاره به دست آمده با دور ۱۴۰۰۰g به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی گراد سانتریفیوژ گردید. سپس محلول رویی برای اندازه گیری فعالیت PAL مورد استفاده قرار گرفت. یک میلی لیتر بافر استخراج به همراه ۰/۵ میلی لیتر ال-فنیل آلانین (۱۰ میلی مولار)، ۰/۴ میلی لیتر آب دوبار تقطیر و یک میلی لیتر عصاره آنزیمی مخلوط و به مدت یک ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد نگهداری گردید. واکنش با اضافه کردن ۰/۵ میلی لیتر کلریدریک اسید (۶ مولار) پایان یافت. محصول به دست آمده با ۱۵ میلی لیتر اتیل استات استخراج و سپس ۳ میلی لیتر هیدروکسید سدیم (۰/۰۵ مولار) اضافه گردید و در نهایت غلظت سینامیک اسید با اندازه گیری میزان جذب در طول موج ۲۹۰ نانومتر به دست آمد. برای رسم منحنی استاندارد از ترانس-سینامیک اسید استفاده شد. یک واحد از فعالیت PAL معادل ۱ میکرومول از سینامیک اسید تولید شده در یک دقیقه است (Wang et al., 2006).

**اندازه گیری فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدانت:** برای استخراج عصاره آنزیمی جهت اندازه گیری فعالیت آنزیم های کاتالاز و پراکسیداز ۰/۱ گرم وزن تازه برگ با یک میلی لیتر بافر استخراج در حضور ازت مایع در هاون ساییده شد. بافر استخراج حاوی ۵۰ میلی مولار بافر فسفات با  $pH=7$ ، ۲ میلی مولار EDTA و ۱ درصد وزنی PVP بود که برای استخراج عصاره جهت اندازه گیری فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز ۰/۲۵ میلی مولار آسکوربات هم به بافر استخراج اضافه شد. سپس این ترکیب به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی گراد با دور ۱۴۰۰۰ در دقیقه سانتریفیوژ شد. از محلول رویی جهت تعیین فعالیت آنزیم ها استفاده گردید.

برای تعیین فعالیت آنزیم کاتالاز، ۵۰ میکرولیتر از عصاره آنزیمی به ۳ میلی لیتر بافر اندازه گیری و  $4/51$  میکرولیتر  $H_2O_2$

تنش‌های مختلف زیستی و غیرزیستی دارند (Dixon and Paiva, 1995). اغلب ترکیباتی که در مسیر فنیل پروپانوئیدی ساخته می‌شوند، ترکیبات فنولی هستند. ترکیبات فنولی به صورت آنتی‌اکسیدان‌های غیرآنزیمی عمل می‌کنند و به همین دلیل میزان فعالیت آنها در شرایط تنش‌زا افزایش می‌یابد (Holton and Cornish, 1995).

هم‌چنین اثر متقابل سطوح آبیاری در سطوح ABA هم معنی‌دار ( $P < 0.01$ ) بود (جدول ۱). همان‌طور که در شکل ۲ نشان داده شده است، بیشترین و کمترین میزان فعالیت آنزیم PAL در هر سه وضعیت رطوبتی به ترتیب از تیمارهای ۴۰ میکرومولار ABA و شاهد (عدم کاربرد ABA) به دست آمد. از طرفی مشاهده شد که با افزایش غلظت ABA میزان فعالیت PAL نیز افزایش یافت (شکل ۲). ممکن است این افزایش فعالیت PAL به دلیل بیان بیش‌تر ژن‌های کدکننده این آنزیم باشد (Shen et al., 2016). افزایش فعالیت آنزیم PAL با کاربرد ABA قبلاً توسط سایر محققان در گیاهان *Fragaria ananassa* (Jiang and Joyce, 2003)، *Microdochium nivale* (Ibrahim and Jaafar, 2013) و *songaricum* (Cui et al., 2012)، گزارش شده است.

**فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت:** نتایج جدول تجزیه واریانس نشان داد که رژیم‌های مختلف آبیاری، به صورت معنی‌داری ( $P < 0.01$ ) باعث تغییر میزان فعالیت این سه آنزیم شد (جدول ۱). فعالیت آنزیم CAT در شرایط تنش ملایم و شدید به ترتیب ۱۱/۰۳ و ۳۲/۵۶ درصد، فعالیت آنزیم POD ۱۰/۸۸ و ۵۵/۳۲ درصد و فعالیت آنزیم APX ۳۷/۱۴ و ۳۸ درصد، نسبت به شرایط آبیاری مطلوب افزایش یافت.

اثر متقابل سطوح آبیاری در سطوح ABA نیز برای هر سه آنزیم آنتی‌اکسیدانت معنی‌دار ( $P < 0.01$ ) بود (جدول ۱). در شرایط آبیاری مطلوب و تنش شدید فعالیت آنزیم CAT به صورت روشنی با افزایش غلظت ABA افزایش یافت (شکل ۳).

فعالیت آنزیم APX در شرایط آبیاری مطلوب با افزایش غلظت ABA افزایش یافت (شکل ۴). در شرایط تنش ملایم

(TBA) ۵ درصد اضافه و به مدت ۳۰ دقیقه در حمام آب ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. سپس بلافاصله در حمام آب یخ قرار گذاشته شد. پس از آن به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۱۲۰۰۰ سانتی‌فیوژ شد. سپس میزان جذب در طول موج ۵۳۲ نانومتر اندازه‌گیری شد. جهت تصحیح، میزان جذب در طول موج ۶۰۰ نانومتر از آن کسر گردید و میزان MDA محاسبه گردید (Cakmak and Horst, 1991).

**صفات مربوط به رشد و عملکرد گیاه:** به منظور اندازه‌گیری صفات مربوط به رشد، مانند سطح برگ، ارتفاع و وزن خشک کل بوته در اواسط مرحله گلدهی (۹۰ روز پس از کشت)، ۳ بوته از هر کرت به طور تصادفی انتخاب و از فاصله یک سانتی‌متری سطح زمین کف بر و به برگ و ساقه تفکیک شد. بعد از تعیین سطح برگ و ارتفاع، به مدت ۴۸ ساعت در آون و در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت و با ترازوی حساس توزین شد. پس از رسیدگی کامل گیاه (۱۱۰ روز پس از کشت)، جهت تعیین عملکرد دانه یک متر مربع از هر کرت برداشت و عملکرد دانه تعیین گردید.

**تجزیه داده‌ها:** تجزیه‌های آماری با نرم‌افزارهای SAS نسخه ۹/۲ انجام شد و مقایسه میانگین صفات با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۵ درصد صورت گرفت. رسم منحنی‌ها هم با نرم‌افزار Sigmaplot نسخه ۱۳/۱ صورت گرفت.

## نتایج و بحث

**آنزیم فنیل آلانین آمونیا لیاز:** در این بررسی اثر رژیم‌های مختلف رطوبتی بر فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیا لیاز معنی‌دار ( $P < 0.01$ ) بود (جدول ۱). کمترین میزان فعالیت این آنزیم، در شرایط آبیاری مطلوب به دست آمد (شکل ۲). تنش‌های خشکی ملایم و شدید به ترتیب باعث افزایش ۱۵/۰۲ و ۳۰ درصدی فعالیت PAL شد. آنزیم PAL یکی از آنزیم‌های مهم در تولید متابولیت‌های ثانویه در مسیر متابولیسم فنیل پروپانوئید است (Hahlbrock and Scheel, 1989). متابولیت‌های ثانویه، نقش بسیار مهمی در رویارویی با

جدول ۱- میانگین مربعات فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیا لیاز، آنزیم های آنتی اکسیدانت (CAT، POD، APX) ، پراکسیداسیون لیپید، برخی صفات رشدی و عملکرد دانه بادرشبو در پاسخ به آبسیزیک اسید در رژیم های مختلف رطوبتی

منابع تغییر	درجه آزادی	میانگین مربعات			
		آنزیم PAL	آنزیم CAT	آنزیم POD	آنزیم APX
تکرار		۰/۰۱۵ <sup>ns</sup>	۰/۰۰۵ <sup>ns</sup>	۰/۱۲ <sup>ns</sup>	۰/۰۰۳ <sup>ns</sup>
سطوح آبیاری	۲	۴/۹۱ <sup>**</sup>	۱۳/۵۴ <sup>**</sup>	۲۰/۶۷ <sup>**</sup>	۰/۳۲ <sup>**</sup>
خطای اصلی	۲	۰/۱۷	۰/۲۷	۰/۰۹	۰/۰۰۰
سطوح آبسیزیک اسید	۴	۱/۷ <sup>**</sup>	۵/۸۹ <sup>**</sup>	۴/۱۸ <sup>**</sup>	۰/۱۵ <sup>**</sup>
سطوح آبیاری × سطوح آبسیزیک اسید	۴	۳/۲۷ <sup>**</sup>	۳/۰۶ <sup>**</sup>	۵/۷۲ <sup>**</sup>	۰/۰۷ <sup>**</sup>
خطای کل	۸	۰/۲۴	۰/۳	۰/۱۲	۰/۰۰۴
ضریب تغییرات (%)	۲۴		۱۲/۰۷	۱۳/۷۱	۱۰/۴۷

ns و \*\* به ترتیب عدم وجود تفاوت معنی دار، تفاوت معنی دار در سطح احتمال ۱ درصد

ادامه جدول ۱-

منابع تغییر	درجه آزادی	میانگین مربعات		
		سطح برگ	وزن خشک کل	ارتفاع
تکرار		۷۷۱۴/۵۲ <sup>ns</sup>	۱/۹۵ <sup>ns</sup>	۳۱/۵۴ <sup>ns</sup>
سطوح آبیاری	۲	۶۷۷۵۶۶/۱۴ <sup>**</sup>	۱۲۲/۸۴ <sup>**</sup>	۳۱۴۸/۲۱ <sup>**</sup>
خطای اصلی	۲	۳۴۳۸/۱۲	۰/۶۶	۲/۴۶
سطوح آبسیزیک اسید	۴	۹۴۲۶۲/۹۴ <sup>**</sup>	۱۷/۱ <sup>**</sup>	۳۲۳ <sup>**</sup>
سطوح آبیاری × سطوح آبسیزیک اسید	۴	۳۶۴۹۵/۱۸ <sup>**</sup>	۶/۱۲ <sup>**</sup>	۱۸/۳۲ <sup>**</sup>
خطای کل	۸	۲۱۸۹/۶۱	۰/۲۷	۱/۷۶
ضریب تغییرات (%)	۲۴	۱۸/۲۶	۱۳/۹	۱۸/۱۹

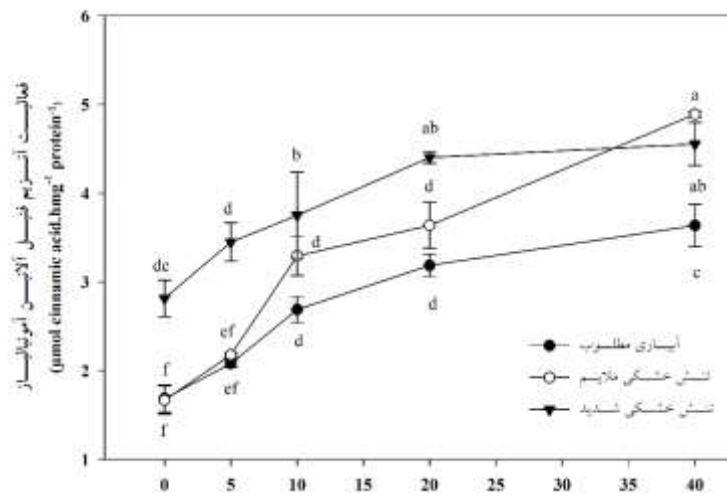
ns و \*\* به ترتیب عدم وجود تفاوت معنی دار، تفاوت معنی دار در سطح احتمال ۱ درصد

مولار، فعالیت APX را افزایش داد و پس از آن فعالیت آنزیم به صورت ثابت باقی ماند (شکل ۵).

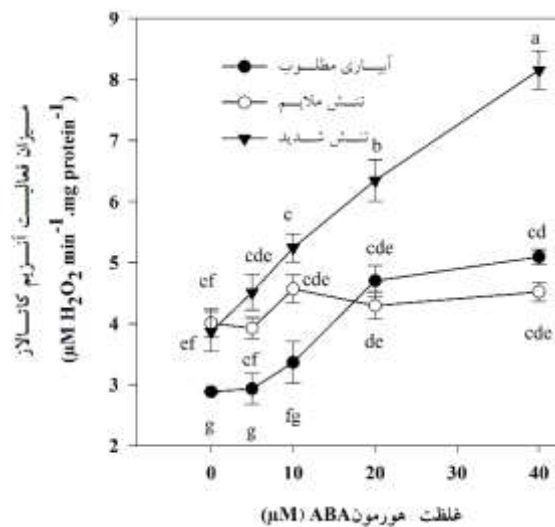
کاربرد ABA منجر به بسته شدن روزنه ها می گردد. بنابراین، ورود CO<sub>2</sub> به گیاه با محدودیت روبه رو می شود (Arora et al., 2002). در نتیجه چرخه کالوین و مصرف NADPH و ATP کاهش می یابد. در چنین وضعیتی میزان NADP<sup>+</sup> و ADP به عنوان گیرنده های انرژی کاهش یافته و نشت الکترونی به سمت مولکول اکسیژن افزایش می یابد که منجر به تولید گونه های مختلف ROS می شود (Arora et al., 2002). ROS می تواند به صورت یک پیام رسان ثانویه در انتقال سیگنال های

میزان فعالیت آنزیم تا غلظت ۱۰ میکرومولار افزایش یافت و بعد از آن به صورت ثابت باقی ماند (شکل ۴). در شرایط تنش شدید فعالیت آنزیم APX با افزایش غلظت ABA تا ۲۰ میکرومولار افزایش یافت و سپس ثابت شد (شکل ۴). در هر سه وضعیت رطوبتی خاک، کمترین فعالیت APX از تیمار شاهد (عدم کاربرد ABA) به دست آمد (شکل ۴).

فعالیت آنزیم POD هم با کاربرد هورمون ABA تغییر یافت (شکل ۵). در شرایط آبیاری مطلوب و تنش ملایم افزایش غلظت ABA باعث افزایش متناظر فعالیت POD گردید (شکل ۵). در شرایط تنش شدید ABA تا غلظت ۲۰



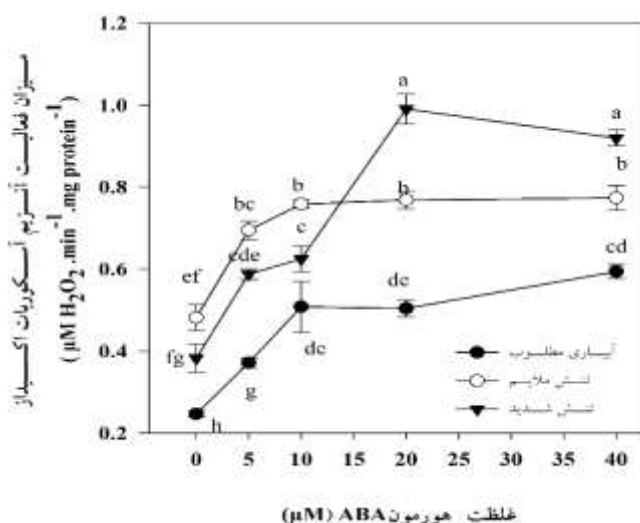
شکل ۲- مقایسه میانگین فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیلیاز بادرشبو در پاسخ به آبسزیک اسید در رژیم‌های مختلف رطوبتی. میانگین‌های دارای حروف مشترک تفاوت معنی‌داری در سطح ۵ درصد ندارند.



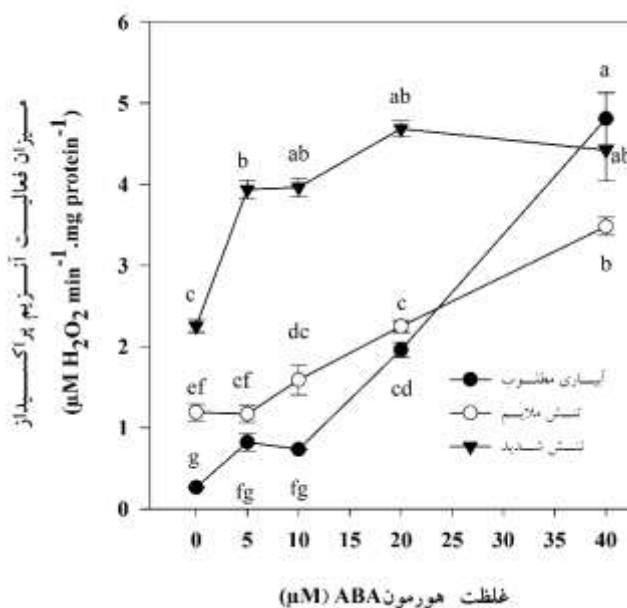
شکل ۳- مقایسه میانگین فعالیت آنزیم کاتالاز بادرشبو در پاسخ به آبسزیک اسید در رژیم‌های مختلف رطوبتی. میانگین‌های دارای حروف مشترک تفاوت معنی‌داری در سطح ۵ درصد ندارند.

تنش خشکی مانند ABA، باعث بسته‌شدن روزنه‌ها می‌شود. از طرفی در شرایط خشکی میزان ABA در درون گیاه هم افزایش می‌یابد (Schulze, 1986). بنابراین گیاه با محدودیت CO<sub>2</sub> ورودی مواجه می‌شود و با تکرار وقایعی که در بالا اشاره شد گیاه در معرض آسیب‌های اکسیداتیو قرار می‌گیرد. برای این‌که سطح این گونه‌های فعال کنترل شود، گیاه سیستم آنتی‌اکسیدانتی آنزیمی خود را تقویت کرده و با افزایش

مربوط به شرایط تنش‌زا عمل کرده و باعث افزایش بیان ژن‌های آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت شوند و سطح این آنزیم‌ها را در گیاه بالا ببرند (Chamngopol *et al.*, 1998; Jiang and Zhang, 2001). باید توجه داشت که تولید بیش‌از حد ROS باعث بروز تنش اکسیداتیو شده و آسیب‌های مختلفی را به رنگدانه‌های فتوسنتزی، لیپیدهای غشایی، پروتئین‌ها و اسید نوکلئیک‌ها وارد می‌کند (Yadav, 2010).



شکل ۴- مقایسه میانگین فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز بادرشبو در پاسخ به آبسزیک اسید در رژیم‌های مختلف رطوبتی. میانگین‌های دارای حروف مشترک تفاوت معنی‌داری در سطح ۵ درصد ندارند.

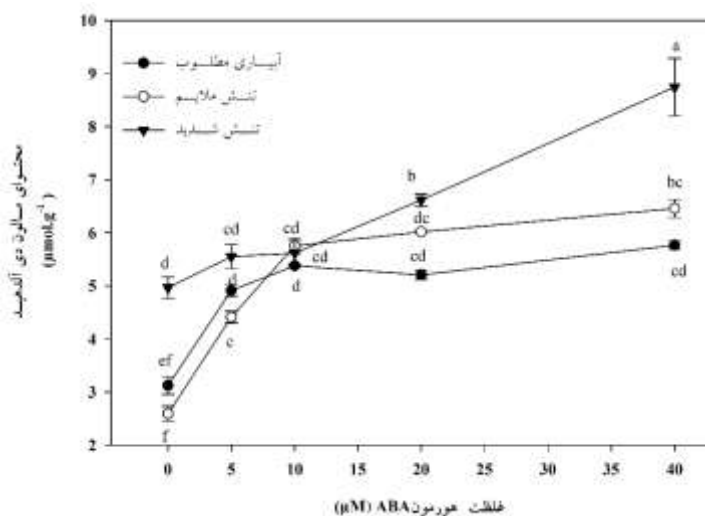


شکل ۵- مقایسه میانگین فعالیت آنزیم پراکسیداز بادرشبو در پاسخ به آبسزیک اسید در رژیم‌های مختلف رطوبتی. میانگین‌های دارای حروف مشترک تفاوت معنی‌داری در سطح ۵ درصد ندارند.

فعالیت آنزیم پراکسیداز و عملکرد دانه در شرایط آبیاری مطلوب ( $r=0/818^{**}$ ) و تنش ملایم ( $r=0/806^{**}$ ) معنی‌دار بود. پراکسیداسیون لیپید: تنش خشکی ملایم و شدید باعث تغییر معنی‌دار ( $P < 0.01$ ) پراکسیداسیون لیپید شد (جدول ۱). در این بررسی محتوای MDA در شرایط تنش ملایم و تنش خشکی به ترتیب ۵/۵ و ۲۲ درصد بیش‌تر از شرایط آبیاری

فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت از سلول‌ها محافظت می‌کند (Mittler, 2006; Xu et al., 2008). در این مطالعه نتایج نشان داد که بین فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز و عملکرد دانه همبستگی مثبت معنی‌داری در هر سه وضعیت رطوبتی آبیاری مطلوب ( $r=0/525^*$ )، تنش ملایم ( $r=0/784^{**}$ ) و تنش شدید ( $r=0/887^{**}$ ) وجود داشت. هم‌چنین ضریب هم‌بستگی بین





شکل ۶- تغییرات محتوای مالون دی‌آلدئید بادرشبو در پاسخ به آبسزیک اسید در رژیم‌های مختلف رطوبتی. میانگین‌های دارای حروف مشترک تفاوت معنی‌داری در سطح ۵ درصد ندارند.

بر برخی از صفات زراعی گیاه از جمله سطح برگ، وزن خشک کل و ارتفاع گیاه معنی‌دار ( $P < 0.01$ ) بود (جدول ۱). بالاترین میزان این صفات از گیاهان رشدیافته در شرایط آبیاری مطلوب و کمترین آن از گیاهان تحت تنش شدید به‌دست آمد (شکل ۷ A-C).

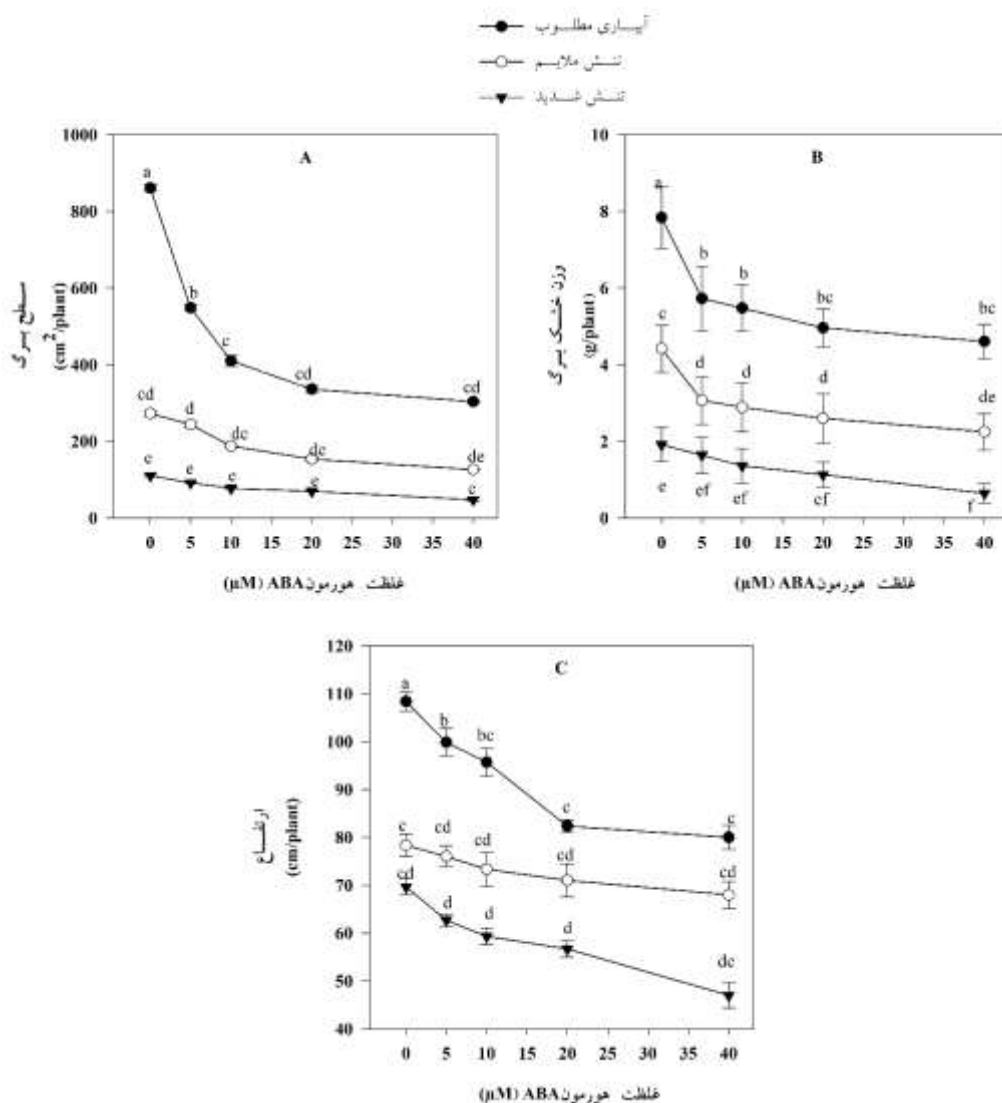
اثر متقابل سطوح آبیاری در سطوح ABA برای صفات سطح برگ، وزن خشک کل و ارتفاع گیاه معنی‌دار ( $P < 0.01$ ) بود (جدول ۱). سطح برگ در شرایط آبیاری مطلوب و تنش ملائم با افزایش غلظت ABA کاهش یافت اما سطوح مختلف ABA در شرایط تنش شدید تفاوت معنی‌داری با هم نداشتند (شکل ۷ A). وزن خشک کل با افزایش غلظت ABA کاهش پیدا کرد (شکل ۷ B). این وضعیت در تمام سطوح رطوبتی مشابه هم بود. ارتفاع گیاه الگوی مشابه با سطح برگ و نیز وزن خشک برگ را از خود نشان داد (شکل ۷ C).

از لحاظ تنوری، کاهش سطح برگ، یکی از مهم‌ترین استراتژی‌های اجتناب از تنش است که به‌عنوان اولین مکانیسم دفاعی در برابر تنش خشکی در نظر گرفته می‌شود (Levitt, 1980). در جریان تنش خشکی، بسته به شدت و مدت زمان بروز تنش، گیاهان تمایل دارند از طریق کاهش سطح برگ، هدرروی آب در جریان تعرق را به حداقل برسانند (Jones and Corlett, 1992). از طرف دیگر بر اثر تنش خشکی میزان

مطلوب بود. هم‌چنین در این مطالعه اثر متقابل سطوح آبیاری در سطوح ABA هم معنی‌دار ( $P < 0.01$ ) بود (جدول ۱). در هر سه وضعیت رطوبتی، با افزایش غلظت ABA میزان پراکسیداسیون لیپید هم افزایش یافت و کم‌ترین محتوای MDA از تیمار شاهد به‌دست آمد (شکل ۶). در این مطالعه، کاربرد غلظت ۴۰ میکرومولار ABA در شرایط آبیاری مطلوب، محتوای MDA را به اندازه تیمار شاهد (عدم‌کاربرد ABA) در شرایط تنش شدید افزایش دهد (شکل ۶). این امر ناشی از تأثیر بسته‌شدن روزنه‌ها و هم‌چنین عوامل غیرروزنه‌ای ناشی از شرایط تنش خشکی باشد.

محتوای مالون دی‌آلدئید (MDA) به‌عنوان شاخصی از میزان پراکسیداسیون لیپید در مطالعات گیاهی اندازه‌گیری می‌شود (Masia, 2003). بالا بودن سطح MDA نشان‌دهنده آسیب به غشای لیپیدی است (Fazeli et al., 2007). همان‌طور که قبلاً اشاره شد، مجموعه وقایعی که در اثر تنش خشکی و کاربرد ABA خارجی رخ می‌دهد منجر به تولید گونه‌های ROS می‌شود. در شرایط تنش شدید و نیز کاربرد غلظت‌های بالای ABA، محتوای MDA نیز افزایش می‌یابد. نتایج مشابهی هم از افزایش محتوای MDA بر اثر تنش خشکی گزارش شده است (Huang et al., 2008).

سطح برگ، وزن خشک کل و ارتفاع: اثر سطوح آبیاری



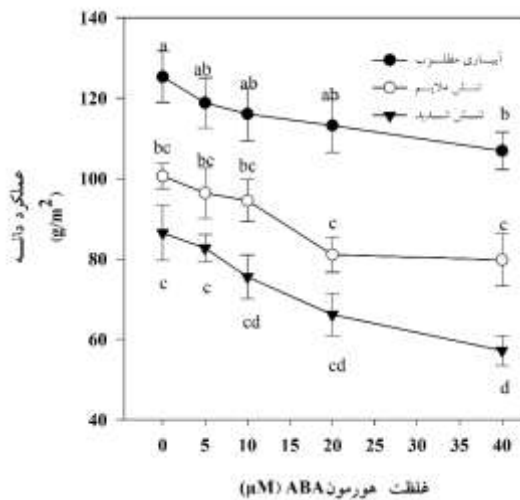
شکل ۷- مقایسه میانگین سطح برگ (A)، وزن خشک کل بوته (B) و ارتفاع (C) بادرشو در پاسخ به آبسزیک اسید در رژیم‌های مختلف رطوبتی. میانگین‌های دارای حروف مشترک تفاوت معنی‌داری در سطح ۵ درصد ندارند.

محدود می‌کند (Schulze, 1986). عوامل غیرروزنه‌ای بیش‌تر مربوط به محدودیت‌های بیوشیمیایی گیاه مانند کاهش فعالیت آنزیم‌های دخیل در فرآیند فتوسنتز و یا افزایش تخریب کلروفیل و رنگدانه‌های فتوسنتزی است (Frederick *et al.*, 1990).

ABA نقش مهمی در تنظیم روزنه‌های گیاه دارد (Wu *et al.*, 1997). در شرایط تنش یک همبستگی مثبتی بین افزایش سطح ABA و کاهش گشودگی روزنه‌ها دیده می‌شود (Hsiao *et al.*, 1976). کاربرد ABA خارجی هم با بستن روزنه‌ها و در

آماس و تقسیم سلولی کاهش می‌یابد و از این‌رو اندازه برگ‌ها و ارتفاع گیاه کم می‌شود.

تنش خشکی باعث کاهش فتوسنتز شده و به‌دلیل تأمین‌نشدن اسیمیلات‌های مورد نیاز برای رشد، وزن خشک برگ نیز کاهش می‌یابد. تنش خشکی می‌تواند به دو صورت روزنه‌ای و غیرروزنه‌ای فتوسنتز گیاه را با محدودیت مواجه کند (Lawlor, 1995). عوامل روزنه‌ای که قبلاً به آن اشاره شد و بیش‌تر شامل عوامل است که موجب بسته‌شدن روزنه‌ها و کاهش هدایت روزنه‌ای شده و ورود CO<sub>2</sub> را به داخل گیاه



شکل ۸- مقایسه میانگین عملکرد دانه بادرشبو در پاسخ به آبسزیک اسید در رژیم‌های مختلف رطوبتی. میانگین‌های دارای حروف مشترک تفاوت معنی‌داری در سطح ۵ درصد ندارند.

تأثیر بیش‌ترین کاهش قرار می‌گیرد (Barnabas *et al.*, 2008). تنش خشکی می‌تواند با کم‌کردن مدت زمان پرشدن دانه باعث تشکیل دانه‌های کوچک‌تر با وزن کم‌تر شده و عملکرد دانه را کاهش دهد (Frederick *et al.*, 1991). هم‌چنین تنش خشکی و کاربرد ABA خارجی همان‌گونه که قبلاً اشاره شد، منجر به تشکیل گونه‌های ROS شده و آسیب‌های اکسیداتیو متعددی را به گیاه وارد می‌کند. این آسیب‌های اکسیداتیو منجر به وارد آمدن خسارت به پروتئین‌ها شده و عملکرد آنزیم‌ها را مختل می‌کند (Mittler, 2002). درنهایت با کاهش فعالیت‌های آنزیمی، تولید متابولیت‌های اولیه که مستقیماً توسط فتوسنتز صورت می‌گیرد با محدودیت روبه‌رو شده و منجر به تشکیل دانه‌های کم‌تر با اندازه کوچک‌تر می‌شود که کاهش عملکرد دانه را به دنبال خواهد داشت.

#### نتیجه‌گیری

نتایج این تحقیق نشان داد که تنش خشکی و هورمون ABA، می‌تواند باعث تولید گونه‌های ROS و بروز تنش اکسیداتیو در گیاه شوند که پراکسیداسیون لیپید و افزایش محتوای MDA یکی از آسیب‌های ناشی از این تنش است. گیاه برای مقابله با این آسیب‌ها، میزان فعالیت آنزیم‌های کاتالاز، پراکسیداز و آسکوربات پراکسیداز را افزایش داد. سیستم‌های آنتی‌اکسیدانی

(Li *et al.*, 2004) نتیجه کاهش میزان فتوسنتز خالص همراه است. این تغییرات درنهایت منجر به کاهش رشد و تعداد برگ گیاه خواهد شد. از طرفی ABA به‌عنوان یک بازدارنده در طول شدن گیاهی فعالیت می‌کند که می‌تواند موجب کاهش ارتفاع ساقه شود (Biai *et al.*, 2011). هم‌چنین ABA به‌عنوان مهارکننده تقسیم و توسعه سلولی عمل می‌کند (Agehara and Leskovar, 2014) که می‌تواند به این صورت رشد گیاه را تحت تأثیر قرار دهد.

**عملکرد دانه:** عملکرد دانه بادرشبو به‌صورت معنی‌داری ( $P < 0.01$ ) تحت تأثیر رژیم‌های مختلف رطوبتی قرار گرفت (جدول ۱). تنش ملایم و شدید به‌ترتیب عملکرد دانه را ۲۷/۱۸ و ۳۵/۷ درصد کاهش دادند. در این بررسی اثر متقابل سطوح آبیاری در سطوح ABA هم معنی‌دار ( $P < 0.01$ ) بود (جدول ۱). همان‌طور که در شکل ۸ نشان داده شده است، کم‌ترین میزان عملکرد دانه در هر سه وضعیت رطوبتی از تیمار شاهد به‌دست آمد و با افزایش غلظت ABA عملکرد دانه کاهش پیدا کرد.

تنش خشکی می‌تواند در تمام مراحل رشدی گیاه اعم از رشد رویشی و زایشی تأثیر بگذارد. مرحله گل‌دهی از حساس‌ترین مراحل رشدی گیاه به خشکی است که در این مرحله بسته به شدت و مدت زمان تنش، عملکرد دانه تحت

گیاه تا زمانی می‌توانند با ROS مقابله کنند که سطح آنها از سطح ROS بیش‌تر باشد. در این مطالعه تنش خشکی و غلظت‌های بالای ABA، در نهایت منجر به کاهش رشد و عملکرد دانه گیاه شد. هم‌چنین تنش خشکی و کاربرد ABA خارجی باعث افزایش فعالیت آنزیم PAL گردید. با توجه به این‌که بادرشبو گیاهی دارویی و معطر است، می‌توان گفت که ABA به‌رغم کاهش رشد گیاه، قادر است با افزایش فعالیت آنزیم PAL که آنزیمی کلیدی در مسیر بیوسنتز ترکیبات ثانویه مخصوصاً ترکیبات فنولیکی است، تولید مواد مؤثره گیاه را افزایش داده و خواص دارویی آن را بهبود ببخشد.

## منابع

- Aebi, H. (1984) Catalase in vitro. *Methods in Enzymology* 105: 121-126.
- Agehara, S. and Leskovar, D. I. (2014) Growth reductions by exogenous abscisic acid limit the benefit of height control in diploid and triploid watermelon transplants. *HortScience* 49: 465-471.
- Arora, A., Sairam, R. and Srivastava, G. (2002) Oxidative stress and antioxidative system in plants. *Current Science* 1227-1238.
- Barnabas, B., Jager, K. and Feher, A. (2008) The effect of drought and heat stress on reproductive processes in cereals. *Plant, Cell and Environment* 31: 11-38.
- Biai, C. J., Garzon, J. G., Osborne, J. A., Schultheis, J. R., Gehl, R. J. and Gunter, C. C. (2011) Height control in three pepper types treated with drench-applied abscisic acid. *HortScience* 46: 1265-1269.
- Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248-254.
- Bueno, P., Piqueras, A., Kurepa, J., Savoure, A., Verbruggen, N., Van Montagu, M. and Inze, D. (1998) Expression of antioxidant enzymes in response to abscisic acid and high osmoticum in tobacco BY-2 cell cultures. *Plant Science* 138: 27-34.
- Cakmak, I. and Horst, W. J. (1991) Effect of aluminium on lipid peroxidation, superoxide dismutase, catalase, and peroxidase activities in root tips of soybean (*Glycine max*). *Physiologia Plantarum* 83: 463-468.
- Caser, M., Chitarra, W., D'Angiolillo, F., Perrone, I., Demasi, S., Lovisolo, C., Pistelli, L., Pistelli, L. and Scariot, V. (2019) Drought stress adaptation modulates plant secondary metabolite production in *Salvia dolomitica* Codd. *Industrial Crops and Products* 129: 85-96.
- Chamnonpol, S., Willekens, H., Moeder, W., Langebartels, C., Sandermann, H., Van Montagu, M., Inze, D. and Van Camp, W. (1998) Defense activation and enhanced pathogen tolerance induced by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in transgenic tobacco. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 95: 5818-5823.
- Chance, B. and Maehly, A. (1955) Assay of catalases and peroxidases. *Methods in Enzymology* 2: 764-775.
- Chaves, M. M., Maroco, J. P. and Pereira, J. S. (2003) Understanding plant responses to drought-from genes to the whole plant. *Functional Plant Biology* 30: 239-264.
- Cui, B., Liang, Z., Liu, Y., Liu, F. and Zhu, J. (2012) Effects of ABA and its biosynthetic inhibitor fluridone on accumulation of phenolic acids and activity of PAL and TAT in hairy root of *Salvia miltiorrhiza*. *Zhongguo Zhong yao za zhi= Zhongguo Zhongyao Zazhi= China Journal of Chinese Materia Medica* 37: 754-759.
- Dastmalchi, K., Dorman, H. D., Laakso, I. and Hiltunen, R. (2007) Chemical composition and antioxidative activity of Moldavian balm (*Dracocephalum moldavica* L.) extracts. *LWT-Food Science and Technology* 40: 1655-1663.
- Dixon, R. A. and Paiva, N. L. (1995) Stress-induced phenylpropanoid metabolism. *The Plant Cell* 7: 1085.
- Fazeli, F., Ghorbanli, M. and Niknam, V. (2007) Effect of drought on biomass, protein content, lipid peroxidation and antioxidant enzymes in two sesame cultivars. *Biologia Plantarum* 51: 98-103.
- Frederick, J., Woolley, J., Hesketh, J. and Peters, D. (1991) Seed yield and agronomic traits of old and modern soybean cultivars under irrigation and soil water-deficit. *Field Crops Research* 27: 71-82.
- Frederick, J. R., Alm, D. M., Hesketh, J. D. and Below, F. E. (1990) Overcoming drought-induced decreases in soybean leaf photosynthesis by measuring with CO<sub>2</sub>-enriched air. *Photosynthesis Research* 25: 49-57.
- Hahlbrock, K. and Scheel, D. (1989) Physiology and molecular biology of phenylpropanoid metabolism. *Annual Review of Plant Biology* 40: 347-369.
- Holton, T. A. and Cornish, E. C. (1995) Genetics and biochemistry of anthocyanin biosynthesis. *The Plant Cell* 7: 1071.
- Hsiao, T. C., Acevedo, E., Fereres, E. and Henderson, D. (1976) Water stress, growth and osmotic adjustment. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 273: 479-500.
- Huang, X., Yin, C., Duan, B. and Li, C. (2008) Interactions between drought and shade on growth and physiological traits in two *Populus cathayana* populations. *Canadian Journal of Forest Research* 38: 1877-1887.
- Hussein, M., El-Sherbeny, S., Khalil, M., Naguib, N. and Aly, S. (2006) Growth characters and chemical constituents of *Dracocephalum moldavica* L. plants in relation to compost fertilizer and planting distance. *Scientia Horticulturae* 108: 322-331.

- Ibrahim, M. H. and Jaafar, H. Z. (2013) Abscisic acid induced changes in production of primary and secondary metabolites, photosynthetic capacity, antioxidant capability, antioxidant enzymes and lipoxygenase inhibitory activity of *Orthosiphon stamineus* Benth. *Molecules* 18: 7957-7976.
- Jiang, M. and Zhang, J. (2001) Effect of abscisic acid on active oxygen species, antioxidative defence system and oxidative damage in leaves of maize seedlings. *Plant and Cell Physiology* 42: 1265-1273.
- Jiang, Y. and Joyce, D. C. (2003) ABA effects on ethylene production, PAL activity, anthocyanin and phenolic contents of strawberry fruit. *Plant Growth Regulation* 39: 171-174.
- Jones, H. and Corlett, J. (1992) Current topics in drought physiology. *The Journal of Agricultural Science* 119: 291-296.
- Jongdee, B., Fukai, S. and Cooper, M. (2002) Leaf water potential and osmotic adjustment as physiological traits to improve drought tolerance in rice. *Field Crops Research* 76: 153-163.
- Lawlor, D. (1995) The effects of water deficit on photosynthesis. *Environment and Plant Metabolism* 129-160.
- Leung, J. and Giraudat, J. (1998) Abscisic acid signal transduction. *Annual Review of Plant Biology* 49: 199-222.
- Levitt, J. (1980) Responses of Plants to Environmental Stress, Chilling, Freezing, and High Temperature Stresses. 1<sup>st</sup> Ed. Academic Press.
- 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.
- Li, C., Yin, C. and Liu, S. (2004) Different responses of two contrasting *Populus davidiana* populations to exogenous abscisic acid application. *Environmental and Experimental Botany* 51: 237-246.
- Li, L. and Van Staden, J. (1998) Effects of plant growth regulators on the antioxidant system in callus of two maize cultivars subjected to water stress. *Plant Growth Regulation* 24: 55-66.
- Martinez, J. P., Silva, H., Ledent, J. F. and Pinto, M. (2007) Effect of drought stress on the osmotic adjustment, cell wall elasticity and cell volume of six cultivars of common beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *European Journal of Agronomy* 26: 30-38.
- Masia, A. (2003) Postharvest Oxidative Stress in Horticultural Crops. Food Products Press, London.
- Mittler, R. (2002) Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plant Science* 7: 405-410.
- Mittler, R. (2006) Abiotic stress, the field environment and stress combination. *Trends in Plant Science* 11: 15-19.
- Miyashita, K., Tanakamaru, S., Maitani, T. and Kimura, K. (2005) Recovery responses of photosynthesis, transpiration, and stomatal conductance in kidney bean following drought stress. *Environmental and Experimental Botany* 53: 205-214.
- Nakano, Y. and Asada, K. (1981) Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant and Cell Physiology* 22: 867-880.
- Ruela de Sousa, R. R., Queiroz, K. C. S., Souza, A. C. S., Gurgueira, S. A., Augusto, A. C., Miranda, M. A., Peppelenbosch, M. P., Ferreira, C. V. and Aoyama, H. (2007) Phosphoprotein levels, MAPK activities and NFκB expression are affected by fisetin. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry* 22: 439-444.
- Scandalios, J. G. (1993) Oxygen stress and superoxide dismutases. *Plant Physiology* 101: 7-18.
- Schulze, E. (1986) Carbon dioxide and water vapor exchange in response to drought in the atmosphere and in the soil. *Annual Review of Plant Physiology* 37: 247-274.
- Seki, M., Narusaka, M., Ishida, J., Nanjo, T., Fujita, M., Oono, Y., Kamiya, A., Nakajima, M., Enju, A. and Sakurai, T. (2002) Monitoring the expression profiles of 7000 Arabidopsis genes under drought, cold and high-salinity stresses using a full-length cDNA microarray. *The Plant Journal* 31: 279-292.
- Shen, L., Ren, J., Jin, W., Wang, R., Ni, C., Tong, M., Liang, Z. and Yang, D. (2016) Role of NO signal in ABA-induced phenolic acids accumulation in *Salvia miltiorrhiza* hairy roots. *Sheng wu gong cheng xue bao. Chinese Journal of Biotechnology* 32: 222-230.
- Srivalli, B., Sharma, G. and Khanna-Chopra, R. (2003) Antioxidative defense system in an upland rice cultivar subjected to increasing intensity of water stress followed by recovery. *Physiologia Plantarum* 119: 503-512.
- Van Breusegem, F., Slooten, L., Stassart, J. M., Botterman, J., Moens, T., Van Montagu, M. and Inze, D. (1999) Effects of overproduction of tobacco MnSOD in maize chloroplasts on foliar tolerance to cold and oxidative stress. *Journal of Experimental Botany* 50: 71-78.
- Wang, J. W., Zheng, L. P., Wu, J. Y. and Tan, R. X. (2006) Involvement of nitric oxide in oxidative burst, phenylalanine ammonia-lyase activation and taxol production induced by low-energy ultrasound in *Taxus yunnanensis* cell suspension cultures. *Nitric Oxide* 15: 351-358.
- Wu, Y., Kuzma, J., Marechal, E., Graeff, R., Lee, H. C., Foster, R. and Chua, N. H. (1997) Abscisic acid signaling through cyclic ADP-ribose in plants. *Science* 278: 2126-2130.
- Xu, P. L., Guo, Y. K., Bai, J. G., Shang, L. and Wang, X. J. (2008) Effects of long-term chilling on ultrastructure and antioxidant activity in leaves of two cucumber cultivars under low light. *Physiologia Plantarum* 132: 467-478.

- Yadav, S. K. (2010) Cold stress tolerance mechanisms in plants. A review. *Agronomy for Sustainable Development* 30: 515-527.
- Yang, L. N., Xing, J. G., He, C. H. and Wu, T. (2014) The phenolic compounds from *Dracocephalum moldavica* L. *Biochemical Systematics and Ecology* 54: 19-22.
- Zhou, B., Guo, Z., Xing, J. and Huang, B. (2005) Nitric oxide is involved in abscisic acid-induced antioxidant activities in *Stylosanthes guianensis*. *Journal of Experimental Botany* 56: 3223-3228.

## The activity of phenylalanine ammonia- lyase and some antioxidant enzymes of dragonhead (*Dracocephalum moldavica*) in response to abscisic acid under different moisture conditions

Vahideh Khaleghnezhad<sup>1</sup>, Alireza Yousefi<sup>1\*</sup>, Afshin Tavakoli<sup>1</sup>, Bahman Farajmand<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Department of Plant Production and Genetics, College of Agriculture, University of Zanjan, Zanjan, Iran

<sup>2</sup> Department of Chemistry, College of Science, University of Zanjan, Zanjan, Iran

(Received: 06/02/2019, Accepted: 02/08/2019)

### Abstract

Drought stress is one of the imperative limiting factors to plant growth and yield in dry conditions. Abscisic acid (ABA) is one of the most important plant regulators that plays a key role in many physiological and morphological responses under drought conditions. This experiment was carried out to evaluate the interaction between drought stress and ABA on the activity of phenylalanine ammonia- lyase (PAL) and some antioxidant enzymes in dragonhead (*Dracocephalum moldavica*). This research was conducted as split plot based on complete random block design at research farm of University of Zanjan, during 2016 growth season. Three moisture regimes (well- watered, moderate drought with delay irrigation up to -0.8MPa and severe drought with delay irrigation up to -1.5MPa) were set as main plots and five ABA concentrations (0, 5, 10, 20 and 40  $\mu$ M) were sets as subplots. The results of this study showed that the effect of watering regimes, ABA and interactions between watering regimes and ABA was significant for PAL, catalase (CAT), ascorbate peroxidase (APX) as well as peroxidase (POD) activity, lipid peroxidation, leaf area, total dry weight, plant height and seed yield. Without ABA application, moderate and severe drought stress, increased up to 15.02 and 30 percent PAL activity, 28.02 and 25.44 percent CAT activity, 48.81 and 35.55 percent APX activity and 77.83 and 88.3 percent POD activity compared to the well- watered condition. Also, exogenous ABA application increased lipid peroxidation and antioxidant enzymes activity compared to the control (no ABA application). Without ABA application the moderate and severe drought stress, reduced seed yield by 19.69 and 31.02 percent, respectively, compared to the well- watered condition. There was a decreasing trend in seed yield in response to an increase in ABA concentration. The amount of seed yield reduction in plants treated with different concentrations of ABA, 5.18- 14.69 percent under well- watered conditions, 4.22- 20.74 percent under moderate drought conditions and 4.37-33.83 percent under severe drought conditions compared to the non- treated plants.

**Keywords:** Ascorbate peroxidase, Catalase, Lipid peroxidation, Seed yield

Corresponding author, Email: yousefi.alireza@znu.ac.ir