فصلنامهٔ علمی-پژوهشی تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران
جلد ۲۶، شمارهٔ ٤، صفحهٔ ٤٧٦-٤٦٦ (۱۳۸۹)

اثر کمبود آب و برهم‌کنش آن با اسیدآسکوربیک بر مقدار پرولین، قندهای محلول و فعالیت آنزیمهای کاتالاز و گلوتاتیون پراکسیداز در سیاه‌دانه (*Nigella sativa* L.)

مه‌لقا قربانلی[1*]، غلامرضا بخشی‌خانیکی[2]، صنم سلیمی‌الیزئی[3] و مهدی هدایتی[4]

۱*- نویسنده مسئول، استاد، گروه زیست‌شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، گرگان، پست الکترونیک: ghorbanli@yahoo.com
۲- دانشیار، گروه زیست‌شناسی، دانشگاه پیام نور، تهران
۳- دانشجوی کارشناسی ارشد علوم گیاهی، دانشگاه پیام نور، تهران
٤- استادیار، پژوهشکده غدد درون‌ریز و متابولیسم، دانشگاه شهید بهشتی، تهران

تاریخ دریافت: آذر ۱۳۸۸ تاریخ اصلاح نهایی: فروردین ۱۳۸۹ تاریخ پذیرش: اردیبهشت ۱۳۸۹

چکیده

در این تحقیق تغییرات میزان پرولین و قندهای محلول و فعالیت دو آنزیم کاتالاز و گلوتاتیون پراکسیداز در اثر تنش خشکی همراه تأثیر جبرانی اسیدآسکوربیک به‌عنوان عامل دفاعی در گیاه سیاه‌دانه (*Nigella sativa* L.) مورد بررسی قرار گرفت. بنابراین کشت گیاه به صورت گلخانه‌ای با تیمارهای مختلف آبیاری و اسیداسکوربیک شامل: ۱) شاهد با آبیاری به مقدار ظرفیت زراعی، ۲) آبیاری دو سوم ظرفیت زراعی، ۳) آبیاری یک سوم ظرفیت زراعی، ٤) آبیاری دو سوم ظرفیت زراعی به‌همراه اسیدآسکوربیک ۱۰ میلی‌مولار، ٥) آبیاری دو سوم ظرفیت زراعی به‌همراه اسیدآسکوربیک ۱ میلی‌مولار، ٦) آبیاری یک سوم ظرفیت زراعی به همراه اسیدآسکوربیک ۱۰ میلی‌مولار، ۷) آبیاری یک سوم ظرفیت زراعی به‌همراه اسیدآسکوربیک ۱ میلی‌مولار، انجام گردید. مقدار پرولین و قندهای محلول در اندام هوایی و زمینی در سطوح مختلف آبیاری بجز تیمار آبیاری با دو سوم ظرفیت زراعی به‌همراه اسیدآسکوربیک ۱۰ میلی‌مولار تفاوت معنی‌دار نشان دادند. مقدار آنزیمها نیز در سطوح آبیاری یک سوم و دو سوم ظرفیت زراعی چه در اندام هوایی و چه در اندام زمینی، تفاوت معنی‌داری داشتند و غلظت ۱ میلی‌مولار اسیدآسکوربیک تقریباً در کنار تنشهای مختلف اثر کاهنده‌ای نداشت ولی اسیدآسکوربیک ۱۰ میلی‌مولار به‌ویژه در آبیاری دو سوم ظرفیت زراعی توانست با کاهش متابولیتهای حاصل از کم شدن میزان آب آبیاری، اثر کمبود آب را به مقدار چشمگیر کاهش دهد.

واژه‌های کلیدی: اسیدآسکوربیک، سیاه‌دانه (*Nigella sativa* L.)، پرولین، قندهای محلول، کمبود آب.

Archive of SID
www.SID.ir

مقدمه

آب ماده‌ای حیاتی برای رشد و نمو گیاه می‌باشد. تنش ناشی از کمبود آب چه به شکل مستمر و چه به صورت موقت، رشد و توزیع پوشش گیاهی طبیعی را محدود می‌کند و بیش از هر عامل محیطی دیگری بر روی گیاهان کشت شده تأثیر دارد. گرچه تحقیقات انجام شده با هدف بهبود مقاومت در برابر تنش کم‌آبی و بازده استفاده از آب بوده است، امّا مکانیسمی که در کمبود آب دخیل می‌باشد هنوز مشخص نیست (McDowell *et al*., 2008). گیاهان با روشهای گوناگونی در برابر تنش آبی مقاومت می‌کنند. در تنش آبی فعالیتهای فیزیولوژی گیاه، مستقیماً یا به‌طور غیرمستقیم دچار اختلال می‌گردد. از آنجایی که وجود فشار تورمی بالای سلولی برای انجام فعالیتهای مهم فیزیولوژی ازجمله رشد سلولها و حرکات روزنه‌ای ضروریست (Turner, 1986)، درک بیشتر این مسئله با دستکاری در روابط گیاه و آب و مقاومت در برابر تنش کم‌آبی در مقیاس فیزیولوژیکی و مولکولی می‌تواند موجب بهبود قابل‌توجه حاصلخیزی گیاه و کیفیت محیط شود. مکانیسم‌های معمول در گیاهانی که قدرت تنظیم مقدار آب را به‌طور یکسان دارند، به دلیل اجتناب از آبرسانی در گیاه در اثر خشکسالی و کمبود آب و در نتیجه بسته شدن منافذ گیاه می‌باشند که منجر به فقدان و کمبود کربن و کاهش مقاومت گیاه در برابر عوامل محیطی و غیرمحیطی می‌شود. در شرایط تنش، برخی از ترکیب‌های داخلی گیاه به میزان قابل‌توجهی افزایش پیدا می‌کند (Atal & Kapur, 1998). امّا متابولیت‌هایی که تجمع می‌یابند، متابولیسم طبیعی گیاه را مختل نمی‌کنند (Orcutt & Nilsen, 2000). این مواد که عموماً به اسمولایت‌ها معروف هستند شامل قندهایی مثل سوکروز و فروکتوز، قندهای الکلی مثل گلیسرول و اینوزیتول متیله شده، قندهای کمپلکس مثل ترهالوز، رافینوز و فروکتان یا متابولیت‌های دارای بار الکتریکی مثل گلایسین بتائین، دی‌متیل‌سولفونیوم پروپیونات، یونهایی مانند سدیم (Na^+) و پتاسیم (K^+) و اسیدهای آمینه‌ای چون پرولین و اکتوین هستند (Paul & Hasegava, 1996). تجمع اسمولایت‌ها در سیتوزول امکان تعدیل فشار اسمزی را در سلول فراهم می‌آورد که در این شرایط از تجمع یونهای سمی در سیتوزول، که برای پروتئین‌ها و غشاها مثل سدیم سمی است، جلوگیری بعمل می‌آید. پرولین یکی از اسیدهای آمینه است که در تنظیم فشار اسمزی درون گیاه نقش بسزایی دارد. افزایش این ماده در شرایط تنش اسمزی، علاوه بر گیاهان در دامنه وسیعی از موجودات دیگر مثل باکتریها، مخمرها، بی‌مهرگان دریایی و جلبک‌ها مشاهده شده است (Guo *et al*., 2005). در واقع پرولین به‌عنوان یک چپرون شیمیایی باعث پایداری فرم طبیعی پروتئین‌ها شده و از به‌هم‌خوردن شکل طبیعی ترکیب‌های آنزیمی ممانعت می‌کند (Measues, 1975؛ Paul & Hasegava, 1996). همچنین تولید زیاد پرولین با افزایش فشار اسمزی داخل سلول از تأثیر اختلالات تنشی در فرایند طبیعی سلولی ممانعت بعمل می‌آورد. این افزایش سطح پرولین، حتی پس از حذف شرایط تنش تا مدت حدود یک ماه باقی می‌ماند. اسمولایت‌ها همچنین باعث پایداری آنزیمها در حضور یونها، تنش آبی و نیز تأثیر ترکیب‌های شیمیایی دناتوره‌کننده می‌شوند. پرولین یکی از ترکیب‌هایی است که تأثیر فعالیت کُندکنندگی یونها را روی آنزیمها کاهش می‌دهد و باعث افزایش و پایداری آنزیمها در دمای بالا می‌شود (Wallace, 1987). از دیگر پاسخهای گیاه در برابر تنش وجود ASA (L- آسکوربیک اسید) است که در

Archive of SID

www.SID.ir

امر سم‌زدایی گونه‌های اکسیژن واکنشگر دخالت دارد (Guo *et al.*, 2005)، چرا که ASA به مقدار چند میلی‌مولار در برگها دیده شده که همین مقدار نقش مهمی را در تحمل گیاه در برابر تنشها به‌عنوان ترکیبی از سیستم آنتی‌اکسیدانی دارد. استرس آبی حتی در شرایط حاد آن در گیاهان، ایجاد سطح بالایی از آسکوربات در سلولهای مزوفیل می‌کند که سطح آن در گیاه باقی می‌ماند یا بسیار کُند پایین می‌آید. علت این امر، فعالیت بیش از حد آنزیمهای چرخه ASC-GSH (چرخه تولیدکننده ASA) و در نتیجه تولید ASA می‌باشد. این افزایش فعالیت آنزیمهای چرخه به علت نیاز گیاه به پاک شدن از H_2O_2 تولید شده در نتیجه تنش آبی است (Robinson & Bunce, 2000). تنشهای محیطی مختلف چون خشکسالی (کم‌آبی)، شوری و سمیت فلزات سنگین، تنشهای اکسایشی هستند که منجر به تولید گونه‌هایی از اکسیژن واکنشگر (ROS) در گیاه می‌شوند. این نوع اکسیژن موجب جدایی لیپیدهای غشاء، آسیب‌رساندن به DNA و در نهایت مرگ سلولی می‌شود. با توجه به این نکته که در شرایط طبیعی بسیاری از فرایندهای متابولیکی در کلروپلاست، میتوکندری و غشاء پلاسما با سیستم انتقال الکترون ارتباط دارند و گونه‌هایی از اکسیژن واکنشگر ROS، مانند رادیکال سوپراکسید ($O_{2}^{\cdot-}$)، پراکسید هیدروژن (H_2O_2)، رادیکال هیدروکسید (OH^{o}) و O_2 را می‌سازند، سلولهای فتوسنتزکننده گیاهان به‌دلیل شرایط اکسیژنی و نیز ارتباط بین سایتهای فتوسنتزکننده و اسیدهای چرب غیراشباع در پوشش کلروپلاست و تیلاکوئید، بسیار به تخریب اکسیداتیو حساس هستند. بنابراین در گیاهان و جانوران، ROS با عمل آنزیمهای سیستمهای آنتی‌اکسیدانی و یا مولکول‌های تمیزگر محلول در آب یا محلول در چربی زدوده می‌شود و بدین گونه این آنزیمها تا حدودی باعث مقاومت گیاه در شرایط تنش می‌شوند (Contour *et al.*,, 2006). گیاه سیاه‌دانه (*Nigella Sativa* L.) از تیره آلاله از هزاران سال پیش به‌عنوان ادویه و دارو بسیار مورد استفاده قرار گرفته است. به‌طوری که روغن و اسانس دانه آن اثرهای دارویی فراوان دارد و به علت اثر ضدتوموری آن بسیار مورد توجه است (Islam *et al.*, 2004). در این پژوهش اثر تنش خشکی بر روی این گیاه مورد بررسی قرار گرفته است تا مشخص شود: ۱- حد مقاومت آن در برابر کمبود آبی چه اندازه است، ۲- آسکوربات به‌عنوان یک عامل دفاعی چقدر می‌تواند تأثیر کم‌آبی را جبران کند، ۳- گیاه برای مقابله با خشکی، از چه مکانیسمهایی استفاده می‌کند و قدرت دفاعی گیاه چه اندازه است.

مواد و روشها

بذر گیاه سیاه‌دانه از یکی از معتبرترین عطاری‌های تهران تهیه و پس از انتخاب بذرهای همگن، به گلدان‌هایی به ابعاد ۳۵×۱۰ سانتی‌متر مربع منتقل شدند. برای هر گلدان مقدار تقریبی ۳/۵ کیلوگرم خاک با نسبت ۷ به ۱ از خاک مزرعه و ماسه در نظر گرفته شد. قبل از جوانه‌زنی بذرها، گلدان‌ها هر ٤٨ ساعت یک بار به میزان ۱۰۰ میلی‌لیتر آبیاری شدند. بعد از ظهور لپه‌ها، گلدان‌ها به جایگاه خود منتقل شدند. در این جایگاه ۲۰ عدد گلدان به صورت ۵ ردیف ٤تایی (هر ردیف شامل ۵ تیمار آبیاری و آسکوربات و هر ردیف عمودی شامل ٤ تکرار از هر تیمار) جای گرفتند. با پدیدارشدن اولین برگ، تیمارهای مختلف آبیاری و آسکوربات شامل: ۱) تیمار شاهد با آبیاری به مقدار ظرفیت زراعی، ۲) تیمار با آبیاری دو سوم ظرفیت زراعی، ۳) تیمار با آبیاری یک سوم ظرفیت زراعی، ٤) تیمار با آبیاری دو سوم ظرفیت زراعی

Archive of SID

www.SID.ir

به همراه اسیدآسکوربیک ۱۰ میلی‌مولار، ۵) تیمار با آبیاری دو سوم ظرفیت زراعی به همراه اسیدآسکوربیک ۱ میلی‌مولار، ٦) تیمار با آبیاری یک سوم ظرفیت زراعی به همراه اسیدآسکوربیک ۱۰ میلی‌مولار، ۷) تیمار با آبیاری یک سوم ظرفیت زراعی به همراه اسید آسکوربیک ۱ میلی‌مولار انجام شد. پس از دو هفته با توجه به وضعیت گیاهان، اندازه‌گیریهای مختلف انجام شد. اندازه‌گیری میزان پرولین با ۰/۵ گرم بافت تر اندام هوایی یا اندام زیرزمینی با استفاده از روش Bates و همکاران (۱۹۷۳) انجام شد. کربوهیدراتهای محلول با ۰/۵ گرم ماده خشک اندام هوایی یا اندام زیرزمینی و با استفاده از روش فنل- اسیدسولفوریک (Kochert, 1978) اندازه‌گیری شدند که مبتنی است بر آبگیری قندهای محلول و تشکیل ترکیب فورفورال که با فنل تولید کمپلکس رنگی می‌کند. شدت رنگ کمپلکس حاصل به وسیله دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ٤۸۵ نانومتر تعیین گردید. برای اندازه‌گیری آنزیمها ابتدا با استفاده از روش Bach و همکاران (۱۹۹۵) توسط فسفات بافر، پروتئین گیاهی استخراج شد. سپس توسط کیت‌های آزمایشگاهی ELISA میزان کاتالاز و گلوتاتیون پراکسیداز به روش رنگ‌سنجی آنزیمی با کمک کیت‌های کمپانی نانجینگ چین مورد سنجش قرار گرفت. نتایج آزمایشها با استفاده از نرم‌افزارهای آماری MSTATC و SPSS مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت و گروه‌بندی میانگین‌ها با استفاده از آزمون دانکن در سطح آماری ۵٪ =a انجام شد.

نتایج

در پژوهش حاضر، روند صعودی معنی‌داری در مقادیر پرولین دیده شد. بدین‌گونه که مقدار پرولین در اندام هوایی گیاه شاهد، ۱٤/۲۵±۰/۱۷ و در اثر تنش ناشی از کاهش آب آبیاری تا سطح یک سوم و دو سوم ظرفیت زراعی به‌ترتیب ۹۸/۱۰±۱/٦۵ و ۵٤/۷۰±۲/۷۰ بود (p<۰/۰۵). در بررسی اثر تداخلی اسیدآسکوربیک بر مقدار پرولین در شرایط تنش، غلظت ۱۰mM و ۱mM از اسیدآسکوربیک، در تنش FC ۱/۳ و اسیدآسکوربیک ۱mM در تنش FC ۲/۳ نتوانست اثر کمبود آب را در گیاه کاهش دهد (p<۰/۰۵)، اما اسیدآسکوربیک ۱۰mM با اثر تداخلی خود توانست اثر تنش FC ۲/۳ را کاهش دهد و بدین ترتیب مقدار پرولین به حد گیاه شاهد رسید. از این رو تغییرات مقدار پرولین اندام زیرزمینی همانند اندام هوایی مورد بررسی قرار گرفت. به‌نحوی که با توجه به مقدار پرولین در اندام زیرزمینی شاهد (۱۱/۲۵±۰/۹۲)، تفاوت معنی‌داری در میزان پرولین در اثر تنش FC ۱/۳ (۳۴/۱۰±۲/٤٤) و تنش FC ۲/۳ (۱۹/۸۰±۱/۰۲) دیده شد (p<۰/۰۵). غلظت ۱mM از اسیدآسکوربیک همانند آنچه در اندام هوایی دیدیم، اثری بر کاهش مقادیر افزایش یافته از پرولین در اثر تنش خشکی FC ۱/۳ (٤٤/۸۰±٤/٦۰) نداشت (p<۰/۰۵)، اما با استفاده از اسیدآسکوربیک ۱۰mM در تنش FC ۱/۳ و اسیدآسکوربیک ۱mM و ۱۰mM در تنش FC ۲/۳، تفاوت معنی‌دار دیده نشد (p>۰/۰۵) (جدول ۱ و شکل ۱). نتایج این تحقیق مؤید آن است که با توجه به مقدار قندهای محلول در اندام هوایی گیاه شاهد (٤۰/۵۲±۰/۵۵)، تفاوت معنی‌داری در تنشهای FC ۱/۳ (۵۰/٦۰±۰/۱۵) و FC ۲/۳ (٤٦/۱۷±۰/۵۹) وجود دارد (p<۰/۰۵). بنابراین این تفاوت معنی‌دار با وجود اثر تداخلی اسیدآسکوربیک با غظت ۱mM در تنش FC ۲/۳ (٤٦/۱٤±۱/۱۳) و غلظت‌های ۱mM (٤۹/۰۱±۰/۹۱) و ۱۰mM (٤۵/۵۷±۰/۸۸) در تنش

Archive of SID

www.SID.ir

FC ۱/۳ همچنان مشهود است ($p<۰/۰۵$). با این حال، با استفاده از اسیدآسکوربیک ۱۰mM در تنش FC ۲/۳ (۳۹/۰۳±۰/۲۳) می‌توان اثر تنش بر مقدار قندهای محلول را تا حد گیاه شاهد کاهش داد ($p>۰/۰۵$). با بررسی اندام زیرزمینی گیاه می‌توان همانند اندام هوایی تفاوت معنی‌دار مقدار قندهای محلول را در تنش FC ۱/۳ (۳۸/۴۲±۰/۳۹) و تنش FC ۲/۳ (۳۴/۹۶±۰/۳۰) نسبت به گیاه شاهد (۳۱/۵۳±۰/۳۹) مشاهده کرد ($p<۰/۰۵$). در اندام زیرزمینی نیز این تفاوت معنی‌دار با وجود اثر تداخلی اسیدآسکوربیک با غظت ۱mM در تنش FC ۲/۳ (۳۵/۲۸±۰/۳۰) و غلظت‌های ۱mM (۳۹/۰۱±۱/۶۰) و ۱۰mM (۳۵/۶۸±۰/۴۷) در تنش FC ۱/۳ همچنان مشهود است ($p<۰/۰۵$). ولی با استفاده از اسیدآسکوربیک ۱۰mM در تنش FC ۲/۳ (۳۳/۳۲±۰/۰۹) می‌توان اثر تنش را تا حد گیاه شاهد کاهش داد ($p>۰/۰۵$) (جدول ۱ و شکل ۲). به هر حال، مقدار آنزیمهای گلوتاتیون پراکسیداز و کاتالاز با توجه به مقدار آن در اندام هوایی و اندام زیرزمینی گیاه شاهد، هم در تنش FC ۱/۳و هم در تنش FC ۲/۳، در هر دو اندام تفاوت معنی‌دار نشان دادند ($p<۰/۰۵$). البته غلظت تداخلی مؤثر از اسیدآسکوربیک بر مقدار کاتالاز افزایش یافته در اثر تنش خشکی، در اندام هوایی، در غلظت ۱۰mM از تنش FC ۲/۳ و غلظت‌های ۱mM و ۱۰mM از تنش FC ۱/۳ و در اندام زیرزمینی در هر دو تنش FC ۱/۳ و FC ۲/۳ در غلظت ۱۰mM می‌باشد ($p>۰/۰۵$). ولی این غلظت تداخلی مؤثر از اسیدآسکوربیک در رابطه با کاهش مقدار GPX، در اندام هوایی، در تنش FC ۲/۳، در هر دو غلظت ۱mM (۲۳/۲۵±۳/۴۵) و ۱۰mM (۱۹/۸۵±۰/۷۵) و در اندام زیرزمینی، در غلظت ۱۰mM (۱۷/۱۵±۰/۳۵) مؤثر واقع شد ($p>۰/۰۵$) (جدول ۱ و شکل ۳ و ۴).

بحث

نتایج بدست آمده حکایت از آن دارد که مقدار پرولین، قندهای محلول و آنزیمها تحت شرایط تنش کم‌آبی هم در مقادیر یک سوم و هم دو سوم ظرفیت زراعی در گیاه سیاه‌دانه افزایش می‌یابد. بنابراین، مطابق با نتایج بدست آمده توسط سایر پژوهشگران می‌توان گفت که اسمولیتها در سیتوزول برای تعدیل فشار اسمزی تجمع یافته‌اند و آنزیمهای اکسیداتیو برای دفع محصولات اکسیژنی فعال شده‌اند (Jiang & Zhang, 2002). همچنین این روند افزاینده در مقدار قندهای محلول همسو با پرولین است که این نتیجه نیز مطابق با گزارشهایی مبنی بر ارتباط این دو در شرایط تنش می‌باشد (Rensburg & Kruger, 1993). این موضوع با نتایج گزارش شده توسط سایر محققان در گیاهان مختلف مانند ذرت (Rayapati & Stewart, 1991)، یونجه (Ginzberg *et al*., 1998) و آرابیدوپسیس (Kiyosue *et al*., 1996) مطابقت دارد. تجمع پرولین در شرایط خشکی، اثرهای زیستی متعددی بوجود می‌آورد (Kuznetsov & Shevyakova, 1999). علت این افزایش، تخریب پروتئین‌ها ذکر شده است (Taher, 1988). تحقیقات زیادی در رابطه با تأثیر تنش کم‌آبی بر مقدار کربوهیدراتها شده است (Xia, 1994؛ Martin & Torres, 1992؛ Koch, 1996؛ Hallgren *et al*., 1991؛ Eimer, 2004؛ Wu & Gang, 2003). بنابراین نقش افزایش ترکیب‌های قندی در تنظیم اسمزی سلول می‌باشد (Solomon & Beer, 1994). به‌نحوی که به نظر برخی از پژوهندگان تخریب نشاسته می‌تواند سبب افزایش مونوساکاریدها شود (During, 1984).

Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۱- اثر تیمارهای مختلف آبی و بر هم‌کنش آن با اسیدآسکوربیک بر مقادیر پرولین، قندهای محلول، کاتالاز و گلوتاتیون پراکسیداز در اندام هوایی و اندام زیرزمینی گیاه *Nigella Sativa* L.

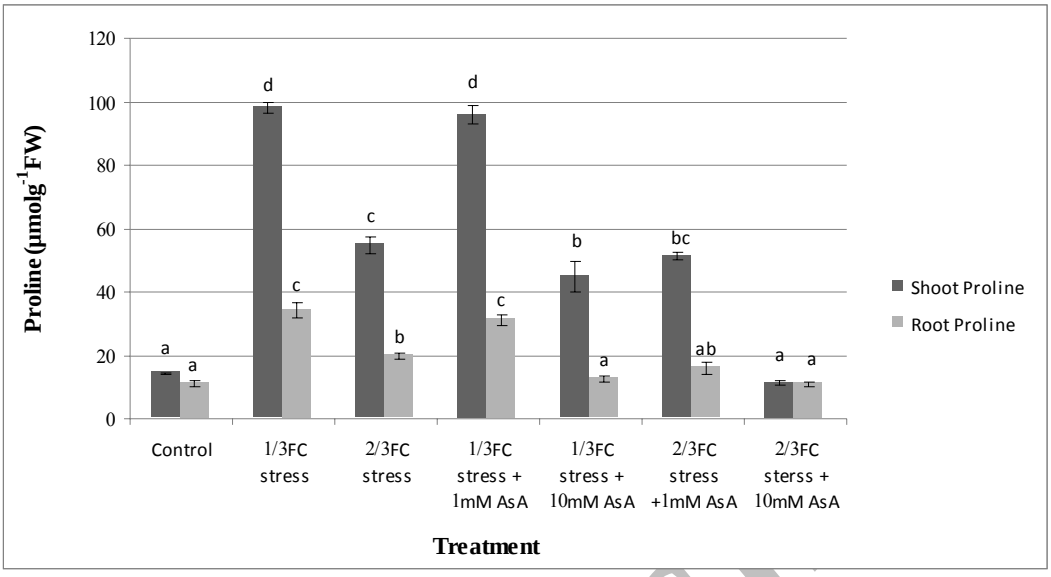
(اعداد نشانگر SE ± $\bar{x}$ هستند.)

اندام هوایی	Proline(μmolg^{-1}FW)	Soluble Sugar(mgg^{-1}DW)	GPX (nmolmin^{-1}ml^{-1})	Catalase(Ug^{-1}FW)
شاهد	۱٤/۲٥±۰/۱۷	٤۰/٥۲±۰/٥٥	۱٥/۰۸±۱/۰۱	۱۷/۰٥±۰/٥۳
تنش ۱/۳ ظرفیت زراعی	۹۸/۱۰±۱/٦٥*	٥۰/٦±۰/۱٥*	٤۱/۰۰±۰/۸٥*	۲۹/۳٦±۰/٦۱*
تنش ۲/۳ ظرفیت زراعی	٥٤/۷۰±۲/۷۰*	٤٦/۱۷±۰/٥۹*	۲۹/۲۰±۱/۸۹*	۲۷/۱۰±۱/٤۳*
تنش ۱/۳ ظرفیت زراعی و اسید آسکوربیک ۱mM	۹٥/۸۰±۲/۸۰*	٤۹/۰۱±۰/۹۱*	۳۷/۸۰±۱/۹۰*	٤۲/٥٦±۳/۹٥*
تنش ۱/۳ ظرفیت زراعی و اسید آسکوربیک ۱۰mM	٤٤/۸±٤/٦۰*	٤٥/٥۷±۰/۸۸*	۳۳/٥٥±۰/۷٥*	۲۳/۰٤±۰/۳٥*
تنش ۲/۳ ظرفیت زراعی و اسید آسکوربیک ۱mM	٥۱/۳۰±۱/۱۰*	٤٦/۱٤±۱/۱۳*	۲۳/۲٥±۳/٤٥**	۲۳/٦۰±۱/۳٦**
تنش ۲/۳ ظرفیت زراعی و اسید آسکوربیک ۱۰mM	۱۱/۳۰±۰/۹۰**	۳۹/۰۳±۰/۲۳**	۱۹/۸٥±۰/۷٥**	۱۹/۳۷±۰/٥۳**

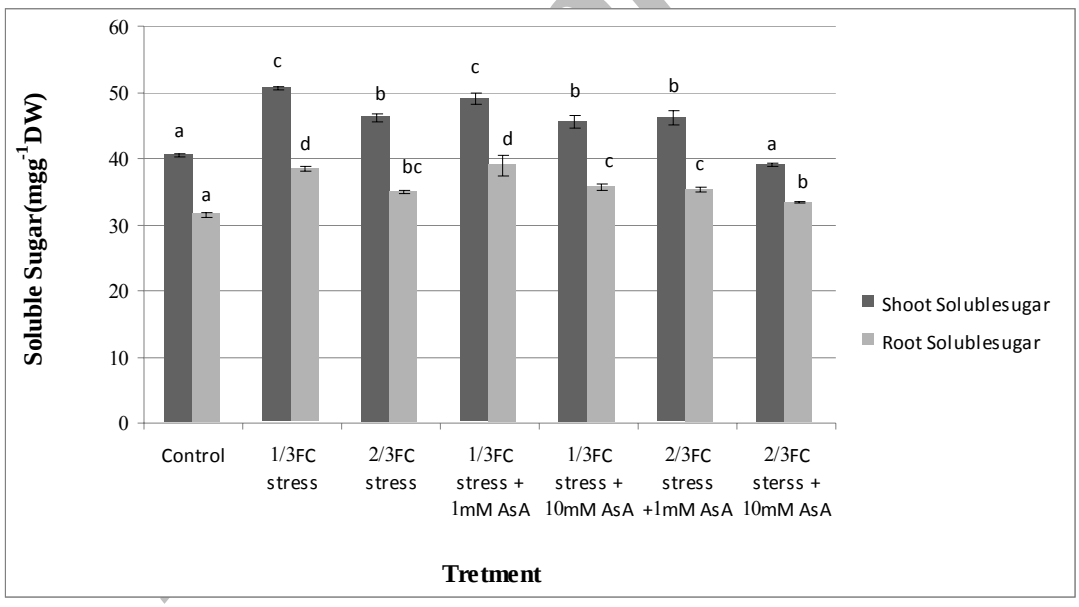
اندام زیرزمینی	Proline(μmolg^{-1}FW)	Soluble Sugar(mgg^{-1}DW)	GPX (nmolmin^{-1}ml^{-1})	Catalase(Ug^{-1}FW)
شاهد	۱۱/۲٥±۰/۹۲	۳۱/٥۳±۰/۳۹	۱٥/٤٥±۰/۸۰	۲۰/۳٦±۰/۷۳
تنش ۱/۳ ظرفیت زراعی	۳٤/۱۰±۲/٤٤*	۳۸/٤۲±۰/۳۹*	۳۲/۸۰±۱/٥۰*	۳۷/۱٦±۰/۸٥*
تنش ۲/۳ ظرفیت زراعی	۱۹/۸۰±۱/۰۲*	۳٤/۹٦±۰/۳۰*	۲٥/۹٥±۱/۳٦*	۲٦/۲۳±۰/٥۰*
تنش ۱/۳ ظرفیت زراعی و اسید آسکوربیک ۱ mM	۳۱/۲۰±۱/٦۰*	۳۹/۰۱±۱/٦۰*	۲۹/۰۰±۱/٥۰*	۳۲/۷٦±۰/۷۸*
تنش ۱/۳ زراعی ظرفیت و اسید آسکوربیک ۱۰ mM	۱۲/٦±۰/۸۰**	۳٥/٦۸±۰/٤۷*	۲٤/۰٥±۲/٦٥*	۲٤/۲٦±۱/۷۹**
تنش ۲/۳ ظرفیت زراعی و اسید آسکوربیک ۱ mM	۱٥/۹±۱/۹۰**	۳٥/۲۸±۰/۳۰*	۲٤/۰٥±۰/۳٥*	۲۹/۸٦±۰/۰٦*
تنش ۲/۳ ظرفیت زراعی و اسید آسکوربیک ۱۰ mM	۱۰/۹۰±۰/۷۰**	۳۳/۳۲±۰/۰۹**	۱۷/۱٥±۰/۳٥**	۲۲/۹٥±۰/۰۸**

** و *: به‌ترتیب معنی‌دار در سطح ۱٪ و ٥٪

Archive of SID
www.SID.ir

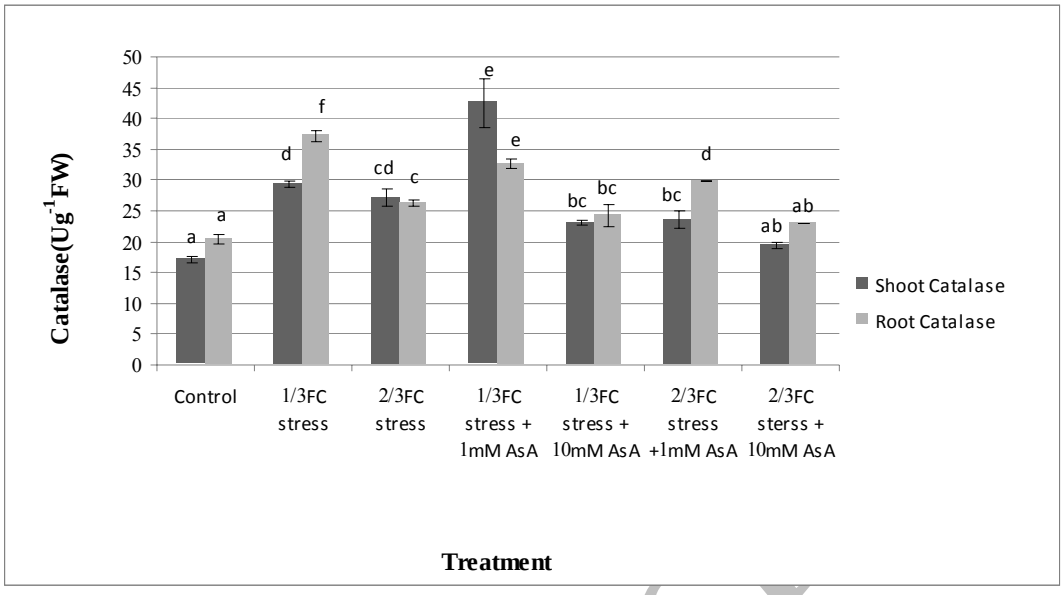


شکل ۱- میزان $\bar{x}$ ± SE پرولین بر حسب میکرومول بر گرم وزن تر اندام هوایی و زیرزمینی گیاه ***Nigella Sativa***

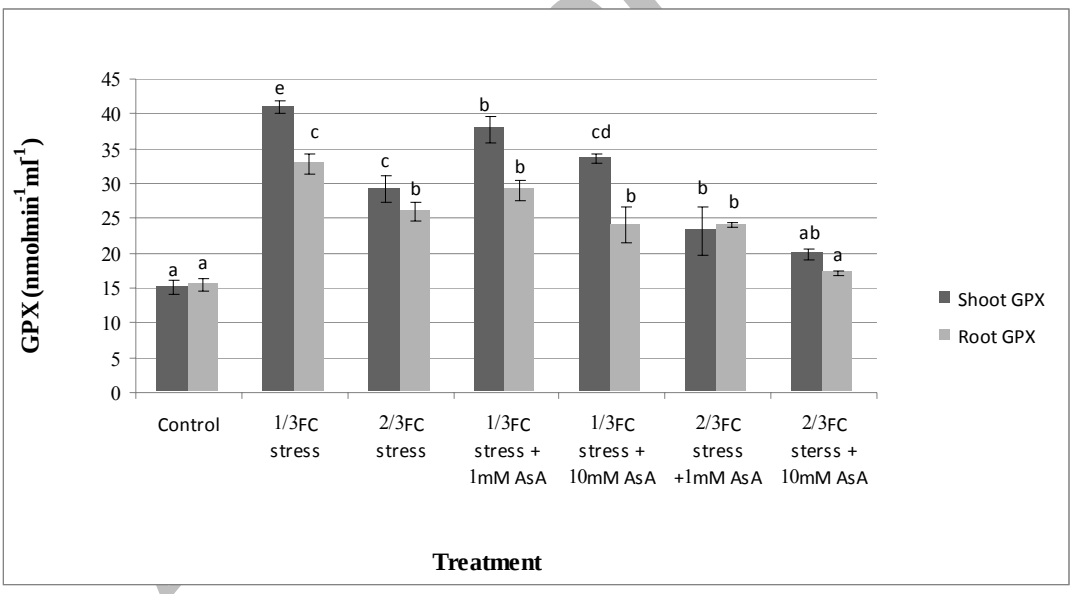


شکل ۲- میزان $\bar{x}$ ± SE قند محلول بر حسب میلی‌گرم بر گرم وزن خشک اندام هوایی و زیرزمینی گیاه ***Nigella Sativa***

www.SID.ir



شکل ۳- میزان $\bar{x}$ ± SE فعالیت آنزیم کاتالاز بر حسب واحد بین‌المللی بر گرم وزن خشک اندام هوایی و زیرزمینی گیاه *Nigella Sativa*



شکل ٤- میزان $\bar{x}$ ± SE فعالیت آنزیم گلوتاتیون پراکسیداز بر حسب نانومولار بر دقیقه بر میلی‌لیتر در اندام هوایی و زیرزمینی گیاه *Nigella Sativa*

به‌طور کلی افزایش قندهای محلول در طی تنش خشکی (به‌ویژه تنش شدید) را می‌توان به دلایل زیر توجیه کرد:

۱) تخریب کربوهیدراتهای نامحلول که منجر به افزایش قندهای محلول می‌شود.

۲) سنتز این ترکیب‌ها از مسیرهای غیرفتوسنتزی

www.SID.ir

۳) متوقف‌شدن رشد (Wu & Gang , 2003)

تحت تنش آبی یا خشکی که مقدار جذب و ترکیب CO_2 به علت منع باز شدن روزنه‌ها کاهش می‌یابد، انرژی داخلی افزایش یافته، ظرفیت انتقال الکترون فتوسنتز به طرف تجمع می‌رود و به دنبال آن افزایش غلظت ROS را خواهیم داشت، که همین باعث پراکسیداسیون لیپیدها، دناتوره شدن پروتئین‌ها و اکسیداسیون DNA می‌شود، در همین جاست که گلوتاتیون پراکسیداز (GPX) و کاتالاز (CAT) به‌عنوان آنزیمهای اکسیداتیو فعالتر می‌شوند (Hisao, 1973). به‌طوری که در پژوهش فوق این افزایش آنزیمی دیده شد و این بدان معنی است که در گیاه سیاه‌دانه نیز برای کاهش اثر تنش، سیستمهای اکسیداتیو فعالتر می‌شوند. از طرفی اثر تداخلی اسیدآسکوربیک در مقابل تنش با دو غلظت متفاوت مورد بررسی قرار گرفت و با توجه به کم شدن اثر تنش در غلظت ۱۰mM، نخست عدم تأثیر یکسان دو غلظت نمایان شد، در ثانی نقش مهم ASA در تحمل گیاه در برابر تنشها به‌عنوان ترکیبی از سیستم آنتی‌اکسیدانی مشهود بود. همانطور که از نتایج مشاهده شد، سیاه‌دانه یک گیاه حساس به خشکی می‌باشد که در کنار اسیدآسکوربیک افزوده شده به محیط تنشی، می‌تواند مقاومت لازم را حاصل کند. به نظر برخی از محققان کربوهیدراتهایی شناسایی شدند که سبب تعدیل اثر بازدارندگی خشکی بر روی نسخه‌برداری از ژن‌های فتوسنتزی می‌شوند. برای نمونه، بیان ژن‌های کُدکننده زیر واحدهای کوچک و بزرگ روبیسکو در طی خشکی، بیانگر مکانیسم کنترل شده‌ایست که این امر می‌تواند یکی از دلایل تجمع کربوهیدراتها در برگ باشد (Koch, 1996). گزارش شده است که اسیدآسکوربیک بر تشکیل پروتئین‌های دفاعی مثل انواع پروتئین کیناز و روبیسکو اثر می‌گذارد و در نتیجه باعث کاهش اثر تنش بر افزایش مقدار قندهای محلول می‌گردد (Sairam *et al*., 1997). با توجه به نتایج بدست آمده از این پژوهش مقدار پرولین افزایش یافته در اثر تنش، در حضور اسیدآسکوربیک کاهش یافت. اسیدآسکوربیک تقریباً بر بیشتر واکنشهای متابولیسمی گیاه تأثیر دارد و موجب تغییراتی در آنها می‌شود. این تغییرات به صورت سازگارهایی است که مقدار تحمل و سازگاری گیاهان را در مقابل عوامل محیطی افزایش می‌دهد (Metwally *et al*., 2003). بنابراین می‌توان با پیدا کردن مواد مداخله‌گر مناسب همچون اسیدآسکوربیک، با تنشهای محیطی، اثر این عامل تنش‌زا را تا حدودی کاهش داد. در شرایط تنش، فعالیت بیش از حد آنزیمهای چرخه اسیدآسکوربیک را خواهیم داشت که نتیجه آن تبدیل شدن بیش از حد دی‌هیدرو اسیدآسکوربیک به اسیدآسکوربیک می‌باشد. این افزایش فعالیت آنزیمهای چرخه به علت نیاز گیاه به پاک شدن از H_2O_2 تولید شده در نتیجه تنش آبی است. بنابراین با اضافه‌کردن اسیدآسکوربیک که به علت داشتن خواص آنتی‌اکسیدانی سبب جارو کردن رادیکالهای اکسیژن تولید شده می‌شود، می‌توان شاهد کاهش آنزیمهای چرخه شد. در مورد اثر اسیدآسکوربیک در رفع تنش اکسیداتیو وارد شده بر آنزیمهای آنتی‌اکسیدان گیاه آرابیدوپسیس حاصل از خشکی آزمایشهایی انجام شده است (Larkindale & Knight, 2002).

منابع مورد استفاده

- Atal, C. and kapur, K., 1998. Cultivation and Utilization of Medicinal Plant. Jamu/tawi, India, 78p.
- Bach, E.E., Alcantara, V.B.G., Alcantara, P.B. and Veasey, E.A., 1995. Biochemical and isoenzyme analyses of elephant grass, *Pennisetum purpureum* (Schum) varieties. Scientia Agricola, (Piracicaba, Braz.) [Online], 52(3): 528-533.
- Bates, L.S, Waldern, R.W. and Treare, L.D., 1973. Rapid determinatation of free proline for stress studies. Plant and Soil, 39: 205-207.
- Contour, A.D., Torres Franklin, M.L., Cruz De Carvalho, M.H., Arcy Lameta, A. and Zuily, F.Y., 2006.

Archive of SID

www.SID.ir

Williams, D.G. and Yepez, E.A., 2008. Mechanisms of plant survival and mortality during drought: why do some plants survive while others succumb to drought?. New Phytologist, 178(4): 719-739.
- Measues, J.C., 1975. Role of amino acids in osmoregulation of non-halophilic bacteria. Nature, 257: 398-400.
- Metwally, A., Finkemeier, I., Georgi, M. and Dietz, K., 2003. Salicylic acid alleviates`the cadmium toxicity in barley seedling. Physiology and Biochemistry of Plant, 132: 272-281.
- Orcutt, D.M. and Nilsen, E.T., 2000. The Physiology of Plants under Stress, Soil and Biotic Factors. John Wiley, New York, 696p.
- Paul, M. and Hasegava, A., 1996. Plant cellular and molecular responses to high salinity. Annual Review of Plant Physiology, 51: 463-499.
- Rayapati, P.J. and Stewart, C.R., 1991. Solubilization of a proline dehydrogenase from maize (*Zea mays* L.) mitochonderia. Plant Physiology, 95: 787-791.
- Rensburg, L.V. and Kruger, G.H.J., 1993. Proline accumulation as drought tolerance selection criterion: it's relationship to membrane integrity and chloroplast ultra stracture in *Nicotiana tabacum* L. Plant Physiology, 141: 188-194.
- Robinson, J.M. and Bunce, J.A., 2000. Influence of drought-induced water stress on soybean and spinach leaf acorbate-dehydroascorbate level and redox status. International Journal of Plant Sciences, 161(2): 271-279.
- Sairam, A.K., Deshumk, P.S. and Skukla, D.S., 1997. Tolerance of drought and temperature stress in relation to increased antioxidant enzyme activity in wheat. Agronomy and Crop Science, 178: 171-187.
- Solomon, A. and Beer, S., 1994. Effect of NaCl on the carboxylating activity of rubisco and absence of prolinerelated compatible solutes Plant. Plant Physiology, 108: 1387-1394.
- Taher, A., 1988. Physiologia and lipid change in some upland rice (*Oryza sativa* L.) cultivars grown under drought stress. College Laguna, Philippines, 162p.
- Turner, N.C., 1986. Adaptation to water deficits: A changing perspective. Australian Journal of Plant Physiology, 13: 175-190.
- Wallace, D.M., 1987. Large and small scale phenol extraction. Methods in Enzymology, 152: 33-41.
- Wu, R. and Gang, A., 2003. Engineering rice plants with trehalose producing genes improves tolerance to drought, salt and low temperature. ISB News Reports, http://www.isb.vt.edu/news/2003/news03.mar.html.
- Xia, M.Z., 1994. Effects of soil drought during the generative development phase of faba bean (*Vicia faba*) on photosynthetic characters and biomass production. Scientia Agricola, 122: 67-72.

Glutathione reductase in leaves of cowpea: cloning of cDNA, expression and enzymatic activity under progressive drought stress desiccation and abscisic acid treatment. Annals of Botany, 98: 1279-1287.
- During, H., 1984. Evidence for osmotic adjustment to drought in grape- vines (*Vitis vinifera* L.). Plant Science Letters, 30: 137-143.
- Eimer, M., 2004. Transgenic drought and salt tolerant plant. Genetic Engineering Newsletter, 24: 33-34.
- Ginzberg, I., Stein, H. and Kapuling, Y., 1998. Isolation and characterization of two different cDNAs of Δ1-pyrroline- carboxylate synthase in alfalfa, transcriptionally induced upon salt stress. Plant Molecular Biology, 38: 755-764.
- Guo, Z., Tan, H., Zhu, Z., Lu, S. and Zhou, B., 2005. Resistance. Plant Physiology and Biochemistry, 43(10-11): 955-962.
- Hisao, T C., 1973. Plant responses to water stress. Annual Review of Plant Physiology, 24: 519-570.
- Hallgren, S.W., Tauer, C.G. and Lock, J.E., 1991. Fine root carbohydrate dynamics of loblolly pine seedling growth under constrasting levels of soil moisture. Plant Physiology, 37: 760-780.
- Islam, S.N., Begum, P., Ahsan, T., Huque, S. and Ahsan, M., 2004. Immunosuppressive and cytotoxic properties of *Nigella sativa*. Phytotherapy Research, 18: 395-398.
- Jiang, M. and Zhang, J., 2002. Seedlings. Free Radical Research, 36(9): 1001-1015.
- Kiyosue, T., Yoshiba, Y., Yamaguchi-Shinozald, K. and Shinozaki, K., 1996. A nuclear gene encoding mitochondrial proline dehydrogenase, an enzyme involved in proline metabolism, is upregulated by proline but down regulated by dehydration in *Arabidopsis*. Plant Cell, 8: 1323-1335.
- Koch, K.E., 1996. Carbohydrate-modulated gene expression in plant. Annual Review of Plant Physiology, 47: 509-515.
- Kochert, G., 1978. Carbohydrate determination by the phenol sulfuric acid method. 56-97, In: Helebust, J.A. and Craig, J.S., Hand book of Phycological Method. Cambridge University Press, UK, 440p.
- Kuznetsov, V.l.V. and Shevyakova, N.I., 1999. Proline under stress: Biological role, metabolism, and regulation. Russian Journal of Plant Physiology, 46(2): 274-286.
- Larkindale, J. and Knight, M.R., 2002. Protection against heat stress induced oxidative damage in *Arabidopsis*, involves calcium abscisic acid, ethylene and salicylic acid. Plant Physiology, 88: 833-837.
- Martin, B. and Torres N.A.R., 1992. Effects of water deficit stress on photosyntesis, its components and component limitations and on water use efficiency in wheat. Plant Physiology, 100: 733-739.
- McDowell, N., Pockman, W.T., Allen, C.D., Breshears, D.D., Cobb, N., Kolb, T., Plaut, J., Sperry, J., West, A.,

Archive of SID

www.SID.ir

Effect of water deficit and its interaction with ascorbate on proline, soluble sugars, catalase and glutathione peroxidase amounts in *Nigella sativa* L.

M. Ghorbanli[1]*, G.R. Bakhshi Khaniki[2], S. Salimi Elizei[2] and M. Hedayati[3]

1*- Corresponding author, Faculty of Sciences, Department of Biology, Islamic Azad University, Gorgan Branch, Gorgan, Iran, E-mail: ghorbanli@yahoo.com
2- Faculty of Sciences, Department of Biology, Pyame Nour University, Tehran, Iran
3- Research Center of Endocrine Glands and Metabolism, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran

Received: December 2009 Revised: April 2010 Accepted: May 2010

Abstract

In this research, proline, soluble sugars, catalase and glutathione peroxidase levels which change in response to water deficiency and the effect of ascorbic acid as protecting factor in *Nigella sativa* L. were surveyed. Plants were cultured in greenhouse and irrigated based on the following treatments: 1) Control with irrigation equal to field capacity, 2) two third of field capacity, 3) one third of field capacity, 4) two third of field capacity along with 10 mM ascorbic acid, 5) two third of field capacity along with 1 mM ascorbic acid, 6) one third of field capacity along with 10 mM ascorbic acid, 7) one third of field capacity along with 1 mM ascorbic acid. Proline and soluble sugars levels in shoots and roots were significantly different for all treatments except for the treatment with 2/3 field capacity along with 10 mM ascorbic acid. Enzymes levels in 1/3 and 2/3 treatments were significantly different in both shoots and roots. One mM ascorbic acid along with different field capacity showed no reducing effect. However, 10 mM ascorbic acid especially in 2/3 field capacity could reduce the effect of water deficit through reduction in level of metabolites produced in response to low irrigation.

Key words: Ascorbic acid, *Nigella sativa* L., proline, soluble sugars, water deficit.

Archive of SID

www.SID.ir