مطالعه برخی پارامترهای اکسیداتیو ناشی از تنش خشکی در گیاه سیاهدانه در شرایط کشت هیدروپونیک

رزیتا کبیری[۱]، فاطمه نصیبی[۲]* و حسن فرح بخش[۳]

به ترتیب [۱]گروه زراعت، دانشکده کشاورزی، [۲]گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، [۳]گروه گیاهان دارویی، پژوهشکده باغبانی، دانشگاه شهید باهنر کرمان

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۱/۰۷/۱۰ ؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۲/۰۱/۲۸)

چکیده:

تنش خشکی یکی از مهم‌ترین تنش‌هایی است که از رشد گیاهان ممانعت نموده و با ایجاد اختلال در تعادل بین تولید گونه‌های فعال اکسیژن و فعالیت‌های دفاعی آنتی اکسیدان گیاه، ایجاد تنش اکسیداتیو می‌کند. ارزیابی تحمل به خشکی گیاهان دارویی به منظور کشت در مناطق خشک از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. در این پژوهش پارامترهای اکسیداتیو ناشی از تنش خشکی ایجاد شده با غلظت‌های مختلف پلی اتیلن گلیکول در گیاه سیاهدانه مورد بررسی قرار گرفت. به منظور کنترل شرایط آزمایشی از جمله جلوگیری از اثرات سایر فاکتورها نظیر مسائل تغذیه‌ای خاک، از محیط کشت هیدروپونیک استفاده گردید. در این مطالعه تنش خشکی به میزان معنی‌داری محتوی پراکسید هیدروژن ، پراکسیداسیون لیپیدهای غشاء و فعالیت آنزیم لیپواکسیژناز را افزایش داد که این نتایج نشان دهنده تنش اکسیداتیو القا شده توسط خشکی در گیاه سیاهدانه است. بررسی مکانیسم‌های دفاعی، از طریق اندازه‌گیری فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدان نشان داد که تنش خشکی فعالیت آنزیم‌های آسکوربات پراکسیداز، گایاکول پراکسیداز و کاتالاز را افزایش داد. اگرچه افزایش شدت خشکی تأثیر معنی‌داری بر افزایش فعالیت کاتالاز و گایاکول پراکسیداز تحت تنش خشکی نداشت. در این بررسی به نظر می‌رسد افزایش معنی‌دار مقدار پرولین احتمالاً هم به خاصیت اسمولیتی و هم به خاصیت آنتی اکسیدانی آن مربوط باشد. افزایش پراکسیداسیون لیپیدهای غشا و مقدار پراکسید هیدروژن در شرایط تنش خشکی، نشان داد که جاروب کردن و خاموش نمودن رادیکال‌های آزاد اکسیژن خارج از توان گیاه بوده است و القاء مکانیسم‌های دفاعی گیاه در مقابل صدمات اکسیداتیو موثر نبوده است. بنابراین کاربرد ترکیبات حفاظتی برون‌زا می‌تواند ظرفیت آنتی اکسیدانی این گیاه را در برابر شرایط تنش افزایش دهد.

کلمات کلیدی: پراکسیداسیون لیپید، پراکسید هیدروژن، پرولین، تنش کم آبی، سیاهدانه

مقدمه:

حدود یک سوم اراضی جهان با کمبود بارندگی مواجه بوده و ایران با متوسط بارندگی ۲۵۰ میلی‌متر در سال جزء مناطق خشک جهان طبقه بندی می‌شود. عدم بارندگی کافی و توزیع غیریکنواخت آن در طول فصل رشد در مناطق خشک و نیمه خشک مثل ایران باعث شده که نیاز آبی گیاهان به اندازه کافی تا مین نگردد و این مسئله باعث کاهش تولیدات کشاورزی می‌شود (Kocheki and Nasiri Mahalati, 1994).

* نویسنده مسؤل، نشانی پست الکترونیکی: nasibi2002@yahoo.com

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2026-11-25]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1392.2.3.2.0]

تنش خشکی رشد و نمو گیاهان را در مراحل مختلف تحت تأثیر قرار می‌دهد اما گیاهان بسته به شدت و مدت تنش در سطوح فیزیولوژیکی و سلولی و مولکولی به تنش خشکی پاسخ می‌دهند (Jongdee *et al*., 2002). این تنش فتوسنتز گیاه را بازداشته، باعث تغییر در محتوای کلروفیل و صدمه به ساختارهای فتوسنتزی می‌شود. یکی از دلایلی که تنش‌های محیطی مثل خشکی، رشد و توانایی فتوسنتزی گیاه را کاهش می‌دهند، اختلال در تعادل بین تولید و حذف رادیکال‌های آزاد اکسیژن است که منجر به تجمع گونه‌های فعال اکسیژن و القاء تنش اکسیداتیو، خسارت به پروتئین‌ها، لیپیدهای غشاء و سایر اجزای سلولی می‌شود (Fu and Huang, 2001). سیستم دفاعی آنتی اکسیدان در سلول‌های گیاهی شامل مکانیسم‌های آنزیمی سوپراکسید دیسموتاز(SOD)، کاتالاز(CAT)، پراکسیداز(POX)، آسکوربات پراکسیداز(APX) و گلوتاتیون ردوکتاز(GR) و غیر آنزیمی مثل گلوتاتیون احیا، آسکوربات و توکوفرول است. آنزیم SOD با تولید پراکسید هیدروژن (H_2O_2) آنیون سوپر اکسید را حذف می‌کند. آب اکسیژنه تولید شده سپس توسط آنزیم‌های CAT و POX حذف شده و سلول سم زدایی می‌شود. آنزیم APX نیز در چرخه آسکوربات-گلوتاتیون، با مصرف آسکوربات به عنوان دهنده الکترون مقدار پراکسید هیدروژن را کاهش می‌دهد (Sundhakcar *et al*., 2001). در شرایط تنش‌های محیطی مثل خشکی، فعالیت بالای آنزیم‌های آنتی اکسیدان و محتوای بالای ترکیبات غیر آنزیمی برای تحمل گیاه به تنش بسیار مهم است.

سیاهدانه با نام علمی *Nigella sativa* از خانواده آلاله، گیاهی است دو لپه، علفی، یک ساله و بومی غرب آسیا که در بیشتر نواحی اروپا، آسیا و ایران می‌روید(دوازده امامی و مجنون حسینی، ۱۳۸۷). این گیاه در درمان افسردگی، بیماری‌های دیابت، نارسایی کلیه، بیماری‌های معده، سردرد و دندان درد نقش داشته و دارای اثرات آنتی بیوتیکی و تحریک پاسخ ایمنی، ضدانگل، ضد میکروب، ضد کرم، ضد سرطان، تقویت لثه و شیرآور می‌باشد(Salem, 2005).

ارزیابی تحمل به تنش خشکی در گیاهان استراتژیک از اهمیت زیادی برخوردار است. امروزه با وجودی که برخی از گیاهان دارویی استراتژیک محسوب نمی‌شوند اما بررسی امکان کشت آنها در مناطق خشک با میزان آب کمتر مورد توجه قرار گرفته است. گیاه سیاهدانه نیز جزء گیاهان دارویی است که امکان کشت آن در مناطق خشک در سال‌های اخیر مورد توجه قرار گرفته است .این آزمایش با هدف بررسی اثرات تنش خشکی بر روی پارامترهای اکسیداتیو ناشی از این تنش محیطی در مرحله رویشی گیاه سیاهدانه انجام گرفته است. با توجه به اینکه در برخی موارد اثرات تنش خشکی مربوط به برخی دیگر از اثرات مثل تغذیه خاک، میزان pH خاک و دسترسی برخی عناصر و یا اعمال خشکی نابرابر در شرایط تنش می‌باشد لذا در این پژوهش برای بررسی دقیق‌تر اثرات اکسیداتیو تنش خشکی از شرایط کشت هیدروپونیک استفاده گردید البته برای بررسی اینکه چقدر این نتایج با نتایج حاصل از تنش خشکی طبیعی مطابقت دارد مطالعات تکمیلی بعدی لازم است.

مواد و روش‌ها:

گیاه مورد مطالعه در این پژوهش، گیاه سیاهدانه (*Nigella sativa*) بود. بذر گیاه سیاهدانه در گلدان‌های حاوی شن کشت گردید و روزانه آبیاری شدند. پس از اینکه برگ‌های لپه‌ای کاملاً توسعه پیدا کردند، هفته‌ای یک بار با محلول غذایی هوگلند (Hoagland and Arnon, 1950) با رقت ۱/۲ آبیاری شدند. گیاهان پس از ۴ هفته رشد برای اعمال تیمار در محیط کشت هیدروپونیک مورد استفاده قرار گرفتند. در این پژوهش به منظور کنترل دقیق شرایط آزمایشی از جمله جلوگیری از تداخل سایر اثرات نظیر مسائل تغذیه‌ای خاک، از محیط کشت هیدروپونیک استفاده گردید.

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2026-11-25]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1392.2.3.2.0]

نحوه اعمال تیمارها: گیاهان پس از ۴ هفته رشد برای اعمال تیمار از گلدان‌ها خارج شدند و در ظرف‌های حاوی محلول غذایی هوگلند قرار داده شدند. محلول غذایی این ظرف‌ها با پمپ آکواریوم هوادهی شدند به منظور تطابق با شرایط جدید این گیاهان ۲۴ ساعت در محلول غذایی قرار داده شدند و پس از ۲۴ ساعت تیمارها اعمال گردید. در زمان اعمال تیمارها، محلول غذایی ظرف‌ها روزانه تعویض گردید. به منظور اعمال تنش خشکی، گیاهان در محلول های پلی اتیلن گلیکول ۶۰۰۰ ،(PEG_{6000}) با پتانسیل‌های ۰/۲- ، ۰/۴- و ۰/۶- مگاپاسکال قرار داده شدند. از آب مقطر به عنوان کنترل در این آزمایش استفاده شد. پس از ۴۸ ساعت اعمال تنش خشکی، برگ‌های همه گیاهان در نیتروژن مایع منجمد گردیدند و برای اندازه‌گیری‌های بعدی در فریزر ۸۰- درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند.

سنجش میزان پراکسیداسیون لیپیدهای غشا: برای سنجش مقدار پراکسیداسیون لیپیدهای غشا، غلظت مالون‌دآلدئید و سایر آلدئیدها که محصول پراکسیداسیون اسیدهای چرب غیر اشباع می‌باشند اندازه‌گیری گردید.

اندازه‌گیری مالون دآلدئید (MDA) به روش Packer و Heath (۱۹۶۹) انجام شد. طبق این روش ۰/۲ گرم از بافت فریز شده گیاه (برگ) با ۵ میلی‌لیتر تری کلرواستیک اسید (TCA) ۰/۱ درصد سائیده شد. عصاره‌ی حاصل با استفاده از سانتریفوژ به مدت ۵ دقیقه در ۱۰۰۰۰g سانتریفوژ شد. به یک میلی‌لیتر از محلول رویی حاصل از سانتریفوژ، ۴ میلی‌لیتر محلول تری کلرواستیک اسید (TCA) ۲۰ درصد که حاوی ۰/۵ درصد تیوباربیتوریک اسید (TBA) بود، اضافه شد. مخلوط حاصل به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد در حمام آب گرم حرارت داده شده سپس بلافاصله در یخ سرد شد و دوباره مخلوط به مدت ۱۰ دقیقه در ۱۰۰۰۰g سانتریفوژ گردید. شدت جذب این محلول با استفاده از اسپکتروفتومتر مدل Varian Cary50 (ساخت آلمان) در طول موج ۵۳۲ نانومتر خوانده شد. ماده‌ی مورد نظر برای جذب در این طول موج، کمپلکس قرمز MDA-TBA است. جذب بقیه رنگیزه‌های غیراختصاصی در ۶۰۰ نانومتر تعیین و از این مقدار کسر گردید. برای محاسبه غلظت MDA از ضریب خاموشی معادل $۱۵۵mM^{-1}cm^{-1}$ استفاده شد و نتایج حاصل از اندازه‌گیری بر حسب میکرومول بر گرم وزن خشک محاسبه گردید.

اندازه‌گیری مقدار پراکسید هیدروژن: مقدار پراکسید هیدروژن بر اساس واکنش پراکسید هیدروژن با یدور پتاسیم (KI) انجام شد. در این روش ۰/۵ گرم از بافت تازه برگ در TCA ۰/۱ درصد سرد سائیده شد. عصاره حاصل به مدت ۱۵ دقیقه در ۱۲۰۰۰g سانتریفوژ گردید. سپس به ۵۰۰ میکرو لیتر از محلول رویی، ۵۰۰ میکرو لیتر بافر فسفات پتاسیم ۱۰۰ میلی‌مولار (pH=۷) و ۲ میلی‌لیتر یدور پتاسیم ۱ مولار اضافه گردید. مخلوط واکنش به مدت ۱ ساعت در تاریکی در دمای اتاق قرار داده شد و سپس جذب نور نمونه‌ها در ۳۹۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. برای محاسبه غلظت پراکسید هیدروژن از منحنی استاندارد استفاده گردید (Alexieva *et al*., 2001).

استخراج عصاره آنزیمی و اندازه‌گیری فعالیت آنزیم‌ها: ۰/۵ گرم از برگ منجمد شده در بافر فسفات پتاسیم ۵۰ میلی‌مولار (pH=۷) حاوی پلی وینیل پیرولیدون ۱ درصد و EDTA یک میلی‌مولار همگن گردیدند. همگن‌های حاصل در g ۱۰۰۰۰ به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفوژ و بخش رویی برای سنجش‌های آنزیمی مورد استفاده قرار گرفت (Gapinska *et al*., 2008).

اندازه‌گیری فعالیت آنزیم کاتالاز (CAT) (EC 1.11.1.6): فعالیت کاتالاز با روش اسپکتروفتومتری و بر اساس کاهش جذب پراکسید هیدروژن در مدت ۳۰ ثانیه در طول موج ۲۴۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. مخلوط واکنش حاوی بافر فسفات پتاسیم ۵۰ میلی‌مولار (pH=۷)، آب اکسیژنه ۱۵ میلی‌مولار و ۱۰۰ میکرو لیتر عصاره آنزیمی بود. واکنش با

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2026-11-25]
[DOR: 20.1001.1.23222727.1392.2.3.2.0]

اضافه کردن H_2O_2 آغاز و کاهش جذب در مدت ۳۰ ثانیه اندازه‌گیری گردید. مقدار پراکسید هیدروژن تجزیه شده با استفاده از ضریب خاموشی معادل ۴۰ $mM^{-1}\ cm^{-1}$ محاسبه شد (Velikova *et al*., 2000).

اندازه‌گیری فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز (GPX) (EC1.11.1.7): فعالیت گایاکول پراکسیداز با استفاده از گایاکول به عنوان سوبسترا اندازه‌گیری شد. مخلوط واکنش حاوی ۲۵ میکرو لیتر عصاره آنزیمی، ۲/۷۷ میلی‌لیتر بافر فسفات پتاسیم ۵۰ میلی‌مولار (pH=۷)، ۱۰۰ میکرو لیتر پراکسید هیدروژن ۱ درصد و ۱۰۰ میکرو لیتر گایاکول ۴ درصد بود. افزایش جذب به دلیل اکسیداسیون گایاکول در طول موج ۴۷۰ نانومتر در مدت ۳ دقیقه اندازه گیری شد میزان فعالیت آنزیم با استفاده از ضریب خاموشی معادل ۲۶/۶ $mM^{-1}\ cm^{-1}$ محاسبه گردید (Plewa *et al*., 1991).

اندازه‌گیری فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز (APX) (EC 1.11.1.11): فعالیت آسکوربات پراکسیداز با استفاده از اسپکتروفتومتر و بر اساس اکسیداسیون آسکوربات اندازه‌گیری شد. مخلوط واکنش حاوی بافر فسفات پتاسیم ۵۰ میلی‌مولار (pH=۷)، آسکوربات ۰/۵ میلی‌مولار، پراکسید هیدروژن ۰/۱ میلی‌مولار و ۱۵۰ میکرو لیتر عصاره آنزیمی بود. فعالیت آنزیم APX بر اساس کاهش جذب آسکوربات در مدت ۱ دقیقه در طول موج ۲۹۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. در این روش مقدار آسکوربات اکسید شده با استفاده از ضریب خاموشی معادل ۲/۸$mM^{-1}\ cm^{-1}$ محاسبه شد (Nakano and Asada, 1981).

اندازه‌گیری فعالیت آنزیم لیپواکسیژناز (LOX) (EC 1.13.11.12): سنجش فعالیت این آنزیم بر اساس روش Minguez-Mosquera و همکاران (۱۹۹۳)، صورت گرفت. در این روش مخلوط واکنش حاوی ۲۵ میکرو لیتر از ماده لینولئیک اسید ۱۰۰ میلی‌مولار به عنوان سوبسترا، ۷۷۵/۲ میلی‌لیتر بافر استیک اسید ۱۰۰ میلی‌مولار (pH=۵/۵) و ۲۰۰ میکرو لیتر از عصاره آنزیمی بود. واکنش به مدت ۱ دقیقه در ۳۰ درجه سانتی‌گراد انجام شد. سپس جذب حاصل از واکنش در ۲۳۴ نانومتر اندازه‌گیری و فعالیت آنزیم با استفاده از ضریب خاموشی معادل $M^{-1}\ cm^{-1}$ ۲۵۰۰۰ محاسبه شد.

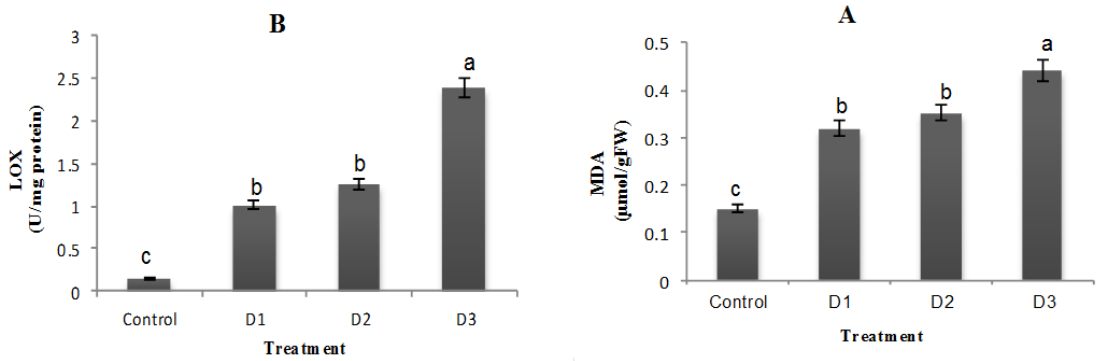
سنجش مقدار پروتئین کل: برای سنجش مقدار پروتئین از روش Bradford (۱۹۷۶) استفاده شد. به این منظور به لوله‌های آزمایش مقدار ۰/۱ میلی‌لیتر عصاره پروتئینی و پنج میلی‌لیتر معرف بیوره افزوده و سریعاً ورتکس شد. پس از دو دقیقه و قبل از یک ساعت جذب آنها با دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۹۵ نانومتر خوانده شد و غلظت پروتئین با استفاده از منحنی استاندارد با کمک آلبومن گاوی محاسبه گردید.

اندازه‌گیری مقدار پرولین:برای اندازه‌گیری پرولین از روش (۱۹۷۳) Bates استفاده شد. ۰/۰۲ گرم از بافت فریز شده گیاه (برگ) در ۱۰ میلی‌لیتر محلول ۳ درصد سولفوسالیسیلیک اسید سائیده و عصاره حاصل به مدت ۵ دقیقه در ۱۰۰۰۰g سانتریفوژ شد. سپس ۲ میلی‌لیتر از مایع رویی را با ۲ میلی‌لیتر معرف نین هیدرین و ۲ میلی‌لیتر استیک اسید خالص مخلوط کرده و یک ساعت در دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد در حمام آب گرم قرار گرفت سپس بلافاصله لوله‌های محتوی مخلوط در حمام یخ سرد گردید. بعد ۴ میلی‌لیتر تولوئن به مخلوط اضافه گردید و لوله‌ها به خوبی تکان داده شد. با ثابت نگه داشتن لوله‌ها به مدت ۱۵ تا ۲۰ ثانیه دو لایه مجزا تشکیل شد. میزان جذب لایه‌ی رنگی فوقانی که حاوی تولوئن و پرولین بود در ۵۲۰ نانومتر تعیین شد و برای محاسبه‌ی مقدار پرولین از منحنی استاندارد پرولین استفاده گردید و نتایج برحسب میکرومول بر گرم وزن خشک محاسبه گردید.

بررسی آماری: این آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار در هر تیمار انجام شد. آنالیز داده‌ها با نرم افزار SAS انجام گرفت و میانگین‌ها با استفاده از

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2026-11-25]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1392.2.3.2.0]



شکل ۱- اثر تنش خشکی بر مقدار مالون دی آلدهید(A) و فعالیت آنزیم لیپوکسیژناز(B) به عنوان شاخص پراکسیداسیون لیپیدهای غشا در برگ های گیاه سیاهدانه. میانگین‌ها با آزمون LSD مقایسه شدند. علائم روی ستون‌ها خطای معیار (SE) را نشان می‌دهد.. ۰/۰۵ ≥P به عنوان اختلاف معنی‌دار در نظر گرفته شد. میانگین‌های دارای حداقل یک حرف مشابه از نظر آماری اختلافی ندارند (D1، D2 و D3 به ترتیب ۰/۲-، ۰/۴- و ۰/۶- مگاپاسکال خشکی).

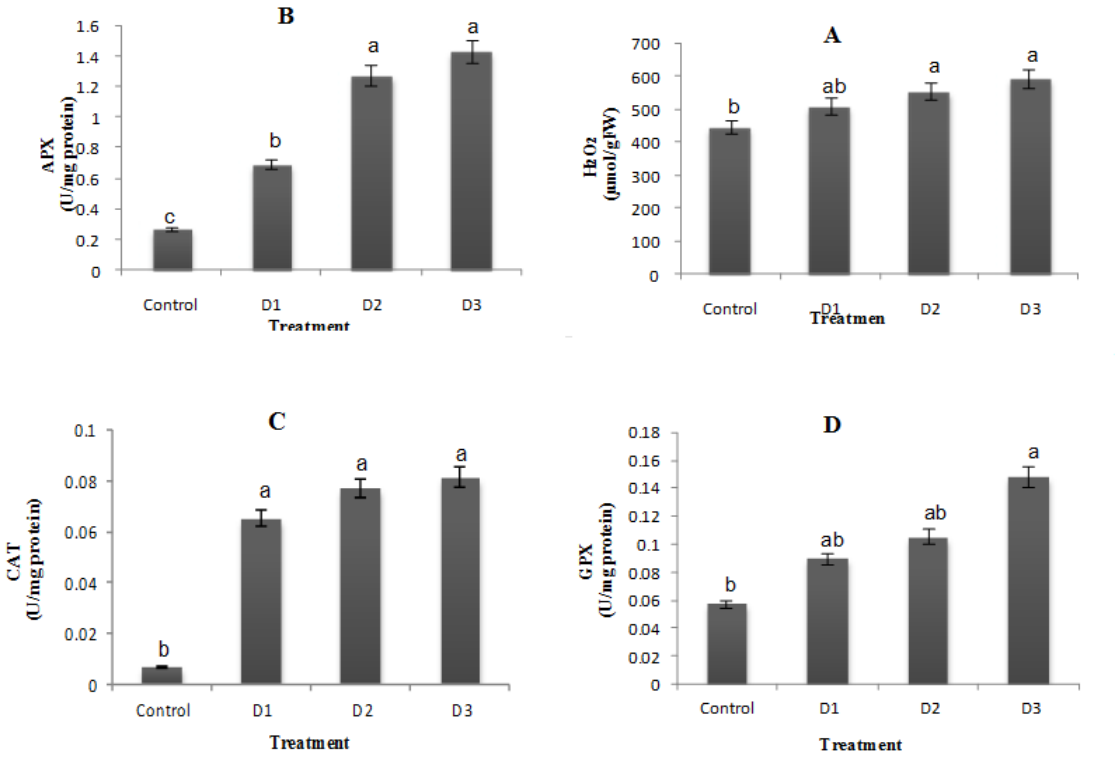
آزمون LSD مقایسه شدند. برای رسم شکل‌ها از نرم افزار Excel استفاده شد.

نتایج:

نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که تنش خشکی اعمال شده در شرایط آزمایشگاه باعث افزایش معنی‌دار پراکسید هیدروژن، میزان پراکسیداسیون لیپیدهای غشاء و فعالیت آنزیم لیپواکسیژناز شد که این نتایج نشان دهنده القاء تنش اکسیداتیو در گیاه است. بررسی فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدان نشان داد که تنش خشکی فعالیت آنزیم های آسکوربات پراکسیداز، گایاکول پراکسیداز و کاتالاز را افزایش داد اما این افزایش فعالیت برای کنترل میزان تنش کافی نبوده و اثرات تنش در گیاهان مشاهده گردید.

پراکسیداسیون لیپید از علائم عمومی تنش اکسیداتیو است. برگ‌های گیاه سیاهدانه که تحت تنش خشکی قرار گرفتند افزایش در فعالیت آنزیم لیپواکسیژناز و محتوی MDA را در مقایسه با گیاهان شاهد نشان دادند (شکل ۱). البته با افزایش شدت خشکی میزان پراکسیداسیون نیز افزایش نشان داد، به طوری که در تنش خشکی ۰/۶- مگاپاسکال مقدار MDA و فعالیت آنزیم لیپواکسیژناز به ترتیب حدود ۶۵/۸٪ (شکل ۱-A) و ۹۳/۸٪ (شکل ۱-B) نسبت به شاهد افزایش معنی‌داری را نشان داد. نتایج حاصل از اندازه‌گیری محتوی پراکسید هیدروژن و فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدان نشان داد که وقتی گیاهان تحت تیمار محلول‌های PEG قرار گرفتند محتوی پراکسید هیدروژن و فعالیت تمام آنزیم‌های آنتی اکسیدان در مقایسه با گیاهان شاهد افزایش یافت. البته افزایش محتوی H_2O_2 و فعالیت APX و GPX در گیاهانی که تحت تیمار ۰/۲- پلی اتیلن گلیکول قرار گرفته بودند در مقایسه با گیاهان شاهد معنی‌دار نبود (شکل ۲ A, D). همان طور که در شکل ۲ مشاهده می‌شود افزایش شدت خشکی تأثیر معنی داری بر افزایش پراکسید هیدروژن و فعالیت آنزیم‌های CAT و GPX نداشت اما فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز در شدت‌های بالای خشکی افزایش معنی‌داری نشان داد. در بالاترین سطح خشکی، محتوی پراکسید هیدروژن و فعالیت آنزیم‌های APX، CAT و GPX به ترتیب حدود ۲۴/۵٪ (شکل ۲-A)، ۸۱/۲٪ (شکل ۲-B)، ۹۱/۴٪ (شکل ۲-C) و ۶۱/۳٪ (شکل ۲-D) در مقایسه با شاهد افزایش داشتند. داده‌های حاصل از تأثیر تیمار خشکی بر مقدار پرولین در گیاهان مورد آزمایش، نشان داد که تیمار خشکی موجب

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2026-11-25]
[DOR: 20.1001.1.23222727.1392.2.3.2.0]



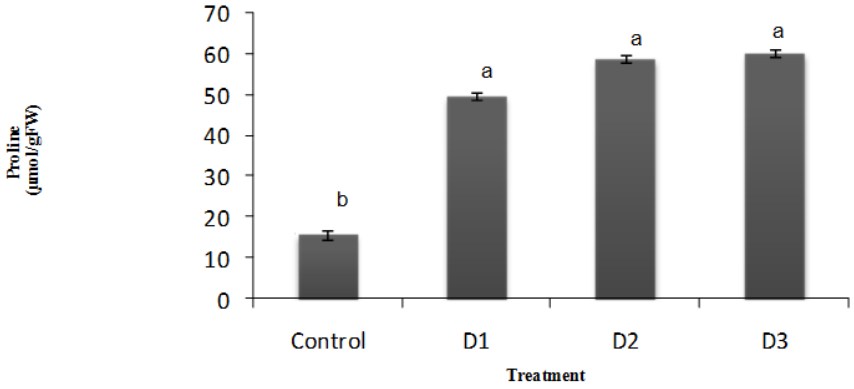
شکل ۲- اثر تیمارهای مختلف خشکی بر مقدار پراکسید هیدروژن(A)، و فعالیت آنزیم های آسکوربات پراکسیداز (B)، کاتالاز(C) و گایاکول پراکسیداز(D) در برگ‌های گیاه سیاهدانه. میانگین‌ها با آزمون LSD مقایسه شدند. علائم روی ستون‌ها خطای معیار (SE) را نشان می‌دهد. ۰/۰۵> P به عنوان اختلاف معنی‌دار در نظر گرفته شد. میانگین‌های دارای حداقل یک حرف مشابه از نظر آماری اختلافی ندارند (D1، D2 و D3 به ترتیب ۰/۲-، ۰/۴- و ۰/۶- مگاپاسکال خشکی).

افزایش معنی‌دار مقدار پرولین در مقایسه با گیاهان شاهد شده است، به طوری که در تیمار خشکی ۰/۶- مگاپاسکال مقدار پرولین حدود ۷۳/۸٪ نسبت به شاهد افزایش داشت (شکل ۳). اما افزایش شدت خشکی افزایش معنی‌دار پرولین را به دنبال نداشت.

بحث:

در شرایط عادی رشد، بسیاری از فرآیندهای متابولیکی در گیاهان باعث تولید گونه‌های فعال اکسیژن می‌شوند اما گیاهان مکانیسم های آنتی اکسیدانی کارآمدی برای از بین بردن گونه‌های فعال اکسیژن دارند (Iturbe-ormaetxe *et al.*, 1998). تحت شرایط تنش این تعادل به هم خورده و مقدار گونه‌های فعال اکسیژن افزایش می‌یابند. افزایش مقدار پراکسید هیدروژن تحت شرایط تنش خشکی در این مطالعه نیز احتمالاً نتیجه اختلال در این تعادل است (شکل A ۲-)، که منجر به صدمات اکسیداتیو در گیاه گردیده است. یکی از آسیب های جدی تنش خشکی خسارت به غشاء و رها سازی یون‌ها از سلول به فضای بین سلولی است (Halliwel and Gutteridge, 1984). این پدیده نتیجه تجمع رادیکال‌های آزاد اکسیژن است که منجر به پراکسیداسیون لیپید، نفوذ پذیری غشاء و خسارت به سلول می‌شود (Scandadalius, 1993). رادیکال‌های آزاد اکسیژن با پراکسیداسیون اسیدهای چرب غیراشباع، آلدهیدهایی مثل مالون دی آلدهید تولید می‌کنند که این محصولات آلدهیدی معمولاً به عنوان شاخص تنش اکسیداتیو اندازه‌گیری می‌شوند (Ohkawa *et al.*, 1979; Shulaev and Oliver, 2006).

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2026-11-25]
[DOR: 20.1001.1.23222727.1392.2.3.2.0]



شکل ۳- اثر تیمارهای مختلف خشکی بر مقدار پرولین برگ‌های گیاه سیاهدانه. میانگین‌ها با آزمون LSD مقایسه شدند. علائم روی ستون‌ها خطای معیار (SE) را نشان می‌دهد. P≤ ۰/۰۵ به عنوان اختلاف معنی دار در نظر گرفته شد. میانگین‌های دارای حداقل یک حرف مشابه از نظر آماری اختلافی ندارند (D1، D2 و D3 به ترتیب ۰/۲-، ۰/۴- و ۰/۶- مگاپاسکال خشکی).

آلدهیدی معمولاً به عنوان شاخص تنش اکسیداتیو اندازه‌گیری می‌شوند (Ohkawa *et al*., 1979; Shulaev and Oliver, 2006). اندازه‌گیری محصولات پراکسیداسیون لیپید یکی از معمول‌ترین روش‌های اندازه‌گیری صدمات اکسیداتیو به غشاء است و به میزان وسیعی در گیاهان استفاده می‌شود (Bandeoglu *et al*., 2004). همان طور که در شکل ۱ مشاهده می‌شود تنش خشکی مقدار MDA را در گیاهان مورد آزمایش افزایش داده و این نشان می‌دهد که تنش خشکی تحت شرایط آزمایش منجر به خسارت به غشاء گردیده و پراکسیداسیون لیپیدها را تشدید نموده است. افزایش در فعالیت آنزیم لیپوکسیژناز تحت این شرایط نیز این مسئله را تایید می‌کند. این آنزیم واکنش‌های پراکسیداسیون لیپیدها را کاتالیز می‌کند (Babar Ali *et al*., 2005; Egert and Tevini, 2002).

افزایش غلظت MDA در تنش‌های شوری و خشکی به دفعات گزارش شده است. افزایش فعالیت آنزیم لیپوکسیژناز به همراه پراکسیداسیون لیپید و نشت یونی در گیاه Phalaenopsis در شرایط تنش دمایی، در گیاه جو در شرایط تنش خشکی و در ارقام مختلف و گونه‌های وحشی گوجه فرنگی در شرایط تنش شوری نیز گزارش شده که در ارقام مختلف و گونه‌های وحشی گوجه فرنگی حساس به شوری، میزان فعالیت آنزیم لیپوکسیژناز در شرایط تنش شوری بیشتر از رقم‌های مقاوم بوده است (Egert and Tevini 2002؛ Babar Ali *et al*., 2005؛ Juan *et al*., 2005؛ Kubis, 2006؛ Tian and Li, 2006).

در شرایط غیرتنش بین میزان تولید گونه‌های فعال اکسیژن و ظرفیت جاروب کردن این ترکیبات توسط سیستم دفاع آنتی اکسیدانی (آنزیمی و غیر آنزیمی) تعادل وجود دارد. اما در شرایط تنش میزان تولید گونه‌های فعال اکسیژن از ظرفیت جاروب کردن آنها توسط سیستم دفاع آنتی اکسیدانی بیشتر شده و در نتیجه تنش اکسیداتیو رخ می دهد. بنابراین برای مقابله با تنش اکسیداتیو تغییر ظرفیت سیستم دفاع آنتی اکسیدانی ضروری می‌باشد. آنزیم‌هایی مانند سوپر اکسید دیسموتاز، کاتالاز، پراکسیداز، آسکوربات پراکسیداز و گلوتاتیون رداکتاز از آنزیم‌های مهم سیستم دفاع آنتی اکسیدانی در گیاهان می‌باشند. اگر چه SOD در خط مقدم دفاع علیه گونه‌های فعال اکسیژن عمل می‌نماید اما محصول عمل آن یعنی H_2O_2 همچنان برای سلول سمی است و باید از سلول حذف شود (Laspina *et al*., 2005). برخی از آنزیم‌ها نظیر کاتالاز،

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2026-11-25]
[DOR: 20.1001.1.23222727.1392.2.3.2.0]

پراکسیداز، آسکوربات پراکسیداز و گلوتاتیون ردوکتاز در حذف H_2O_2 در سلول نقش دارند (Sundhacar *et al*., 2001). در این پژوهش تنش خشکی موجب افزایش فعالیت آنزیم‌های کاتالاز، پراکسیداز و آسکوربات پراکسیداز در گیاه مورد مطالعه گردید ولی با این وجود در شرایط تنش اسمزی (به خصوص شدت‌های بالا)، پراکسیداسیون لیپید و تجمع H_2O_2 و آسیب به غشا رخ داده است (شکل ۱-B، ۲-A).

نتایج حاصل از سنجش پرولین در گیاه سیاهدانه نشان داد که میزان این ترکیبات تحت تنش خشکی افزایش معنی داری داشته‌اند (شکل ۳). پرولین تحت تنش خشکی تقریباً ۳ برابر شده است که این امر می‌تواند به دلیل افزایش سنتز پرولین باشد البته افزایش مقدار پرولین تحت شرایط تنش علاوه بر فعالیت بیوسنتزی به توقف فعالیت تخریبی آن نیز بستگی دارد (Delauney and Verma, 1993). گزارش‌هایی نیز وجود دارد که نشان می‌دهد مقدار پرولین در گونه‌های حساس به نمک برنج (Demiral and Turkan, 2005)؛ سویا (Abd El Samad and Shaddad, 1997) و یونجه (Juan *et al*., 2005) بالاتر از گونه‌های مقاوم بود. پرولین علاوه بر این که یک ماده محافظ اسمزی می‌باشد در حفظ تعادل آب، حفظ ثبات پروتئین‌ها، حفظ ساختار سه بعدی پروتئین‌ها و آنزیم‌ها، تثبیت کردن غشاها و دستگاه سنتز پروتئین، منبع ذخیره کربن و نیتروژن برای رشد بعد از رفع تنش، کاهش خطرات حاصل از تولید ROS، جاروب کردن رادیکال‌های هیدروکسیل، خاموش کردن اکسیژن یکتایی (و در نتیجه حفظ ماکرو مولکول‌های سلولی نظیر پروتئین ها، لیپیدها و DNA از خطرات رادیکال‌های آزاد)، تنظیم pH سلولی و تنظیم نسبت $NADP^+/NADPH$ نقش دارد. گزارش شده است که پرولین یا پیوستن به فسفولیپیدهای غشایی و تغییرات در لایه هیدراته اطراف ماکرو ملکول‌های زیستی در حفظ و ثبات غشاها نقش دارد (Matysik *et al*., 2002; Verbruggen and Hermans, 2008). پرولین با جاروب کردن یا کاهش تولید اکسیژن یکتایی در کاهش آسیب نوری در غشای تیلاکوئیدها موثر بوده است (Chaitanya *et al*., 2009). در این پژوهش به نظر می‌رسد افزایش مقدار پرولین تحت تنش خشکی هم مربوط به خاصیت اسمولیتی آن و هم مربوط به خاصیت آنتی اکسیدانی آن در شرایط تنش باشد.

افزایش پراکسیداسیون لیپید و مقدار H_2O_2 در شرایط تنش خشکی ایجاد شده توسط محلول‌های PEG، ناشی از افزایش تولید گونه‌های فعال اکسیژن در شرایط تنش اکسیداتیو می‌باشد که حذف، جاروب کردن و یا خاموش نمودن آنها خارج از توان گیاه بوده است و نشان می‌دهد که مکانیسم‌های دفاعی ایجاد شده در گیاه در مقابل تنش اکسیداتیو کافی نبوده است. بنابراین تغییر در فعالیت آنزیم های مذکور نشان دهنده تنش اکسیداتیو ناشی از خشکی و روشن شدن ماشین آنتی‌اکسیدانی گیاه در مقابل آن بوده است اما این ظرفیت آنتی‌اکسیدانی در گیاه سیاهدانه برای مقابله با تنش کافی نبوده و لازم است تا با به کار بردن برخی ترکیبات برون‌زا این مقاومت را افزایش داد.

منابع:

دوازده امامی، س. و مجنون حسینی، ن. (۱۳۸۷) زراعت و تولید برخی گیاهان دارویی و ادویه‌ای. انتشارات دانشگاه تهران، تهران.

Abd El Samad, H. M. and Shaddad, M. A. K. (1997) Salt tolerance of soybean cultivars. Plant Biology 39: 263-269.

Alexieva, V., Sergiev, I., Mapelli, S. and Karanov, E. (2001) The effect of drought and ultraviolet radiation on growth and stress markers in pea and wheat. Plant Cell and Environment 24:1337-1344.

Babar Ali, M., Hahn, E. G. and Paek, K. Y. (2005) Effects of temperature on oxidative stress defense systems, lipid peroxidation and lipoxygenase activity in *Phalaenopsis*. Plant Physiology and Biochemistry 43: 213-223.

Bandeoglu, E., Egidogan, F., Yucel, M. and Avni Oktem, H. (2004) Antioxidant responses of shoots and roots of lentil to NaCl- salinity stress. Plant Growth Regulation 42: 69- 77.

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2026-11-25]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1392.2.3.2.0]

Kocheki, A. and Nasiri Mahalati, M. (1994) Ecology of plants. 2nd Ed. Jahad Daneshgahi, Mashad.

Kubis, J. (2006) Exogenous spermidine alters in different way membrane permeability and lipid peroxidation in water stressed barley leaves. Acta Physiology Plantarum 28:27- 33.

Laspina, N. V., Groppa, M. D., Tomaro, M. L. and Benavides, M.P. (2005) Nitric oxide protects sunflower leaves against Cd-induced oxidative stress. Plant Science 169:323-330.

Matysik, J., Alia, A., Bhalu, B. and Mohanty, P. (2002) Molecular mechanisms of quenching of reactive oxygen species by proline under stress in plants. Current Science 82:525-532.

Minguez-Mosquera, M. I., Jaren-Galen, M. and Garrido-Fernandez, J. (1993) Lipoxygenase activity during pepper ripening and processing of paprika. Phytochemistry 32:1103-1108.

Nakano, Y. and Asada, K. (1981) Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach choloroplast. Plant and Cell Physiology 22: 867-880.

Ohkawa, H., Ohishi, N. and Yaqi, K. (1979) Assay for lipid peroxides in animal tissue by thiobarbituric acid reaction. Annals of Biochemistry 95: 351-358.

Plewa, M. J., Smith, S. R. and Wanger, E. D. (1991) Diethyldithiocarbamate suppresses the plant activation of aromatic amines into mutagens by inhibiting tobacco cell peroxidase. Mutation Research 247:57-64.

Salem, M. L. (2005) Immunomodulatory and therapeutic properties of the *Nigella sativa* L. seeds. International Immunopharmacology 5:1749-1770.

Scandadalius, J. G. (1993) Oxygen stress and superoxide dismutase. Plant Physiology 101:7- 12.

Shulaev, V. and Oliver, D. J. (2006) Metabolic and proteomic markers for oxidative stress, new tools for reactive oxygen species research. Plant Physiology 141:367-372.

Sundhacar, C., Lakshmi, A. and Giridarakumar, S. (2001) Changes in the Antioxidant Enzyme Efficacy in two High Yielding Genotypes of Mulberry (*Morus alba* L.) under NaCl Salinity. Plant Science 161:613-619.

Tian, X. and Li, Y. (2006) Nitric oxide treatment alleviates drought stress in wheat seedlings. Biologia Plantarum 50:775-778.

Velikova, V., Yordanov, I. and Edreva, A. (2000) Oxidative stress and some antioxidant systems in acid rain treated bean plants. Protective role of exogenous polyamines. Plant Science 151:59-66.

Verbruggen, N. and Hermans, C. (2008) Proline-accumulation in plants: a review. Amino acids 35:753-759.

Bates, L. S. (1973) Rapid determination of free proline for water stress studies. Plant Soil 39: 205-207.

Bradford, M. M. (1976) A rapid and Sensitive Method for Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-dye Binding. Analytical Biochemistry 72: 248-254.

Chaitanya, K. V., Rasineni, G. K. and Reddy, A. R. (2009) Biochemical responses to drought stress in mulberry (*Morus alba* L.): evaluation of proline, glycine betaine and abscisic acid accumulation in five cultivars. Acta Physiology Plantarum 31: 437-447.

Delauney, A. and Verma, D. (1993). Proline biosynthesis and degradation in plants. Plant Journal 4: 215-223.

Demiral, T. and Turkan, I. (2005) Comparative lipid peroxidation, antioxidant defense system and proline content in roots of two rice cultivars differing in salt tolerance. Environment and Experimental Botany 53: 247-257.

Egert, M. and Tevini, M. (2002) Influence of drought on some physiological parameters symptomatic for oxidative stress in leaves of chives (*Allium schoenoprasum*). Environment and Experimental Botany 48: 43-49.

Fu, J. and Huang, B. (2001) Involvement of Antioxidant and Lipid Peroxidation in the Adaptation of Two Cool-season Grasses to Localized Drought Stress. Environment and Experimental Botany 45:105-114.

Gapinska, M., Sklodowska, M. and Gabara, B. (2008) Effect of short- and Long-term salinity on the activities of antioxidative enzymes and lipid peroxidation in tomato roots. Acta Physiologu Plantarum 30:11-18.

Halliwel, B. and Gutteridge, J. M. (1984) Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metal and disease. Journal of Biological Chemistry 219: 1-14.

Heath, R. L. and Packer, L. (1968) Photoperoxidation in isolated chloroplast, kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. Archives of Biochemistry and Biophysics 125:189-198.

Hoagland, D. R. and Arnon, D. J. (1950) The water culture method for growing plants without soil. 2nd Ed. California Agricultural Experimental Station, Berkeley.

Iturbe-ormaetxe, I., Escuredo, P.R., Arrese-Igor, C. and Becana, M. (1998) Oxidative damage in pea plant exposed to water deficit or paraquat. Plant Physiology 116:173-181.

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.

Juan, M., Rivero, R. M., Romero, L. and Ruiz, J. M. (2005) Evaluation of some nutritional and biochemical indicators in selecting salt-resistant tomato cultivars. Environment and Experimental Botany 54:193-201.

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2026-11-25]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1392.2.3.2.0]