مقاله پژوهشی

Research Article

نشریه علمی تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران
جلد ۳۹، شماره ۲، صفحه ۳۰۲-۲۸۵ (۱۴۰۲)

شناسه دیجیتال (DOI): 10.22092/ijmapr.2023.360517.3253
شناسه دیجیتال (DOR): 20.1001.1.17350905.1402.39.2.10.7

تأثیر بیوچار و تنش خشکی بر برخی سازوکارهای حفاظتی سیاه‌دانه (*Nigella sativa* L.)

هاوری کیانی[۱]، شیوا خالص‌رو[۲*]، علی مختصی بیدگلی[۳] و زاهد شریفی[۴]

۱- دانشجوی دکتری، گروه تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه کردستان، سنندج، ایران

۲*- نویسنده مسئول، استادیار، گروه تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه کردستان، سنندج، ایران، پست الکترونیک: sh.khalesro@uok.ac.ir

۳- استادیار، گروه زراعت، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

۴- دانشیار، گروه علوم و مهندسی خاک، دانشکده کشاورزی، دانشگاه کردستان، سنندج، ایران

تاریخ دریافت: آبان ۱۴۰۱ تاریخ اصلاح نهایی: اردیبهشت ۱۴۰۲ تاریخ پذیرش: اردیبهشت ۱۴۰۲

چکیده

سیاه‌دانه (*Nigella sativa* L.) از گیاهان دارویی ارزشمند است که در صنایع مختلف کاربرد وسیعی دارد. تجمع اسمولیت‌های سازگار از پاسخ‌های رایج گیاهان در رویارویی با تنش خشکی است. به‌منظور بررسی اثر رژیم‌های آبیاری و کاربرد بیوچار (حاصل از گرمادهی کود گاوی) بر گیاه دارویی سیاه‌دانه، آزمایشی به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار در گلخانه دانشکده کشاورزی دانشگاه کردستان در سال ۱۳۹۷ به اجرا درآمد. فاکتورهای آزمایش شامل تنش خشکی در سه سطح ۱۰۰، ۷۰ و ۴۰ درصد ظرفیت زراعی و مصرف بیوچار در دو سطح ۰ و ۱۵ تن در هکتار بودند. نتـایج تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که اثرات متقابل سطوح تنش خشکی و کاربرد بیوچار روی پراکسید هیدروژن، مالون دی آلدئید، پراکسیداز، سوپراکسید دیسموتاز، پرولین، کربوهیدرات‌های محلول (محلول در آب و اتانول) و پتانسیل اسمزی معنی‌دار بود. افـزایش شدت تنش خشکی منجر به افزایش پراکسید هیدروژن، مالون دی آلدئید، پراکسیداز، سوپراکسید دیسموتاز، پرولین و کربوهیدرات‌های محلول (محلول در آب و اتانول) و منفی‌تر شدن پتانسیل اسمزی شد. کاربرد بیوچار سبب کاهش اثرات منفی تنش خشکی گردید، به‌طوری که میزان تولید پراکسید هیدروژن، مالون دی آلدئید، پراکسیداز، سوپراکسید دیسموتاز، پرولین و کربوهیدرات‌های محلول (در آب و الکل) نسبت به تیمارهای فاقد بیوچار کمتر بود. به‌طور کلی نتایج تحقیق حاضر بیان‌کننده نقش مفید و مؤثر بیوچار در بهبود خصوصیات فیزیولوژیک و اسمولیت‌های محافظتی سیاه‌دانه در شرایط تنش خشکی بود.

واژه‌های کلیدی: آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی، اسمولیت‌های سازگار، پرولین، تنش اکسیداتیو، کمبود آب.

مقدمه

به دلیل رویکرد دنیا به استفاده از گیاهان دارویی و عدم تمایل به مصرف داروهای سنتتیک و نیز صرفه اقتصادی، کشت گیاهان دارویی می‌تواند به یکی از کشت‌های مرسوم در مناطق خشک و نیمه‌خشک تبدیل شود. نتایج مطالعات نشان‌دهنده بروز دوره‌های گرم و خشک، متأثر از فرایندهای تغییر اقلیم است (Hoerling *et al.*, 2012؛ Hertig & Tramblay, 2017؛ Naumann *et al.*, 2018). بنابراین تولید محصولات کشاورزی تحت تأثیر دوره‌های خشکی محدود می‌گردد (Manavalan & Nguyen, 2017؛ Páscoa *et al.*, 2012). اگرچه مناطق نیمه‌خشک برای تولید گیاهان دارویی مناسب هستند (به دلیل مقدار مطلوب از تابش خورشیدی)، اما تولید این گیاهان مستلزم آبیاری‌های مکرر است (Fallaha *et al.*, 2018)، چون وزن هزاردانه پایینی

Copyright: © 2023 by the authors. This is an open access, peer-reviewed article published by Research Institute of Forests and Rangelands (http://ijmapr.areeo.ac.ir/) and distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

دارند و در زمانی کشت می‌شوند که هوا گرم شده و بارش باران در نواحی مدیترانه‌ای محدود شده است؛ بنابراین تنش خشکی را می‌توان مهمترین عامل محدود کننده تولید گیاهان دارویی در نواحی مدیترانه‌ای محسوب کرد. سیاه‌دانه به‌عنوان یکی از گیاهان دارویی، برای درمان بیماری‌هایی مانند برونشیت، روماتیسم، فشار خون بالا، سرفه، اگزما، التهاب و آنفلوآنزا مورد استفاده قرار می‌گیرد (Fallaha *et al*., 2018). تنش خشکی یکی از مهمترین تنش‌هایی است که از رشد گیاهان ممانعت نموده و در تعادل بین تولید گونه‌های فعال اکسیژن و فعالیت‌های دفاعی آنتی‌اکسیدان گیاه اختلال ایجاد می‌کند و منجر به بروز تنش ثانویه اکسیداتیو می‌گردد. تأثیر محدودکننده تنش خشکی بر رشد و عملکرد دانه سیاه‌دانه عمدتاً به‌دلیل تخریب مسیرهای متابولیکی می‌باشد (Haj Seyed Hadi *et al*., 2016). در واقع، خشکی تنشی است که فتوسنتز گیاه را محدود می‌کند، باعث ایجاد تغییر در محتوای کلروفیل و صدمه به ساختارهای فتوسنتزی می‌گردد. یکی از دلایل مهمی که تنش‌های محیطی مانند خشکی، رشد و توانایی فتوسنتزی گیاه را کاهش می‌دهند، اختلال در تعادل بین تولید و حذف رادیکال‌های آزاد اکسیژن است (Lotfi *et al*., 2015). در شرایط تنش‌های محیطی مانند خشکی، فعالیت بالای آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان و محتوای بالای ترکیب‌های غیرآنزیمی برای تحمل گیاه به تنش بسیار مهم است. گیاهان برای مقابله با تنش اکسیداتیو، راهکارهای آنزیمی و غیر آنزیمی را اتخاذ می‌کنند (Hasanuzzaman *et al*., 2014). سازوکارهای آنتی‌اکسیدانی از قبیل سوپراکسید دیسموتاز و پراکسیداز، در تعادل بین تولید و حذف رادیکال‌های آزاد اکسیژن نقش اساسی ایفاء می‌کنند (Lotfi *et al*., 2015). آنزیم سوپراکسید دیسموتاز با تولید پراکسید هیدروژن موجب حذف آنیون سوپر اکسید (O^{-2}) می‌گردد و آب اکسیژنه تولید شده در مرحله بعد توسط آنزیم‌های کاتالاز و پراکسیداز حذف شده و به این ترتیب سلول‌های گیاه سیاه‌دانه از وجود ترکیب‌های مضر پاک‌سازی می‌شود (Kabiri *et al*., 2014). از دیگر تبعات رادیکال‌های آزاد اکسیژن، پراکسیداسیون اسیدهای چرب غیراشباع است، پراکسیداسیون اسیدهای چرب غیراشباع نتیجه تولید آلدئیدهایی مانند مالون دی آلدئید می‌باشد. مالون دی آلدئید معمولاً به‌عنوان شاخص تنش اکسیداتیو اندازه‌گیری می‌گردد (Shulaev & Oliver, 2006). اولین سازوکار برای دفع گونه‌های فعال اکسیژن، سوپراکسید دیسموتاز است. سوپراکسید دیسموتاز گونه‌های فعال اکسیژن را به پراکسید هیدروژن تبدیل می‌کند، اما پراکسید هیدروژن تولیدی نیز به نوبه خود زیان‌بار بوده و باید از سلول خارج شود. معمولاً تنش خشکی منجر به تجمع اسمولیت‌های سازگار در گیاهان می‌گردد. پرولین و قندهای محلول ازجمله این اسمولیت‌های سازگار هستند که مقدار آنها در گیاهان مختلف، تحت تأثیر تنش‌های محیطی افزایش می‌یابد. نتایج پژوهشی نشان داد با وقوع تنش خشکی، میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و اسمولیت‌های محافظتی در سیاه‌دانه افزایش یافت (Hayati *et al*., 2021).

پیدا کردن راهکارهایی که بتواند اثرهای کمبود آب بر رشد و عملکرد گیاهان دارویی را کاهش دهد و موجب بهبود رشد و عملکرد گردد، می‌تواند بسیار حائز اهمیت باشد. با توجه به پایداری بیوچار در مقابل تجزیه میکروبی و زمان ماندگاری طولانی آن در خاک، مصرف بیوچار سبب افزایش سطح مواد آلی خاک به مدت طولانی و در نتیجه بهبود خصوصیات خاک، به‌ویژه در مناطق خشک و نیمه‌خشک می‌گردد (Berek *et al*., 2011).

افزودن بیوچار به‌عنوان یک ماده اصلاحی به خاک موجب افزایش بازهای تبادلی، ظرفیت تبادل کاتیونی و قابلیت دسترسی عناصر غذایی، کاهش وزن مخصوص ظاهری و بهبود ظرفیت نگهداری آب می‌گردد (Liang *et al*., 2006؛ Lehmann & Joseph, 2015). بیوچار به دلیل سطح ویژه زیاد و تراکم بار سطحی بالا توانایی خاک برای نگهداری عناصر غذایی و آب قابل استفاده گیاه را افزایش و شستشوی عناصر غذایی و کودها را کاهش می‌دهد (Laird *et al*., 2010). استفاده از بیوچار به‌دلیل ظرفیت آن در بهبود حاصلخیزی خاک، ترسیب کربن، تولید

انرژی زیستی و کاهش تحرک آلاینده‌های آلی و غیر آلی نمود پیدا کرده است (Abbas *et al*., 2017). بیوچار موجب افزایش رشد و زیست توده گیاه و جذب مواد غذایی در شرایط تنش خشکی می‌گردد (Kim *et al*., 2016). بیوچار همچنین سبب بهبود خواص فیزیکی و شیمیایی خاک از قبیل pH، ظرفیت تبادل کاتیونی، ساختار خاک و میزان نگهداشت آب تحت تنش‌ها می‌شود (Lim *et al*., 2016). در ارتباط با تأثیر کاربرد بیوچار بر میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان و اسمولیت‌های سازگار، گزارش شده است که کاربرد بیوچار سبب کاهش گونه‌های فعال اکسیژن، کاهش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان و کاهش پراکسیداسیون لیپیدهای غشاء در گیاه دارویی نعنا گردید (Ghassemi-Golezani & Farhangi-Abriz, 2023). در مطالعه دیگری کاهش ۲۹ درصدی فعالیت مالون دی آلدئید در گل همیشه‌بهار با کاربرد بیوچار گزارش شد (Khaleghi Gazik *et al*., 2021). کاربرد بیوچار سبب کاهش تجمع گونه‌های فعال اکسیژن در گیاه دارویی شوید گردید (Rahimzadeh & Ghassemi-Golezani, 2022). همچنین کاربرد بیوچار در گیاه زینتی فیکوس موجب کاهش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی شد (Kumar *et al*., 2019). نتایج مطالعه‌ای نشان داد که کاربرد بیوچار در مقایسه با عدم کاربرد بیوچار در شرایط کمبود آب سبب بهبود رشد و عملکرد گیاه دارویی زنیان شد (KhasheiSiuki *et al*., 2019). همچنین کاربرد بیوچار در سطوح مختلف آبیاری (۴۰، ۷۰ و ۱۰۰ درصد نیاز آبی) سبب افزایش کارایی استفاده از آب در شرایط کمبود آب گردید و عملکرد و اجزای عملکرد سیاه‌دانه را نسبت به شرایط عدم کاربرد بیوچار افزایش داد (Abbaspour *et al*., 2017). تغییرات اقلیمی ایجاد شده در جهان و شدت گرفتن تنش‌های ناشی از آن به‌ویژه تنش خشکی در مناطق خشک و نیمه‌خشکی مانند ایران، تولید گیاهان دارویی از قبیل سیاه‌دانه را با مشکل مواجه می‌کند. با توجه به نگهداری عناصر غذایی و افزایش آب قابل استفاده گیاه توسط بیوچار، هدف از انجام این مطالعه، بررسی تأثیر کاربرد بیوچار بر میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان و اسمولیت‌های سازگار (پرولین و کربوهیدرات‌های محلول) سیاه‌دانه تحت تنش خشکی است.

مواد و روش‌ها

این تحقیق به صورت گلدانی و به صورت آزمایش فاکتوریل بر پایه طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار در گلخانه دانشگاه کردستان از ۱۰ خرداد تا ۲۰ شهریورماه ۱۳۹۷ اجرا شد. در طول مدت آزمایش دمای حداقل و حداکثر گلخانه به‌ترتیب ۱۸ و ۳۳ درجه سانتی‌گراد و رطوبت نسبی ۲۷٪ بود. در ابتدا گلدان‌های پلاستیکی به قطر ۳۰ و ارتفاع ۳۰ سانتی‌متر (مساحت ۷۰۶/۵ سانتی‌متر و وزن ۴۰۰ گرم) با ۱۱۳۱۶ گرم خاک پر شدند (۱۱۳۱۶ گرم خاک + ۱۰۵ گرم بیوچار). خصوصیات خاک مورد استفاده در جدول ۱ ارائه شده است. مقدار ظرفیت زراعی و نقطه پژمردگی دائم برای دو سطح مختلف بیوچار به صورت جداگانه محاسبه شد (مقدار ظرفیت زراعی و نقطه پژمردگی دائم برای تیمار عدم مصرف بیوچار به‌ترتیب ۱۳/۵ و ۱۲/۳ کیلوگرم و برای کاربرد بیوچار به‌ترتیب ۱۳/۷۲۷ و ۱۲/۴۵ کیلوگرم بود). با ایجاد دو شیار در هر گلدان به فاصله ۲۰ سانتی‌متر از یکدیگر و به عمق ۲۰ سانتی‌متر، اقدام به دفن کردن ۵۲/۵ گرم بیوچار در هر شیار و در مجموع ۱۰۵ گرم در هر گلدان (معادل با ۱۵ تن در هکتار با توجه به مساحت گلدان‌ها) در این حفره‌ها شد. در هر گلدان ۱۴ بذر سیاه‌دانه (تراکم ۲۰۰ بوته در مترمربع) کشت شد. تیمارهای آبیاری از یک هفته قبل از گلدهی (در مرحله شروع غنچه‌دهی) اعمال شد و تا ۱۰ روز قبل از برداشت (رسیدگی فیزیولوژیک) ادامه داشت. به‌منظور کاهش خطای حاصل از موقعیت گلدان‌ها در گلخانه، گلدان‌ها در هر نوبت آبیاری جابجا می‌شدند. زمان اعمال تیمار آبیاری (درصد از ظرفیت زراعی) در گلدان‌ها به روش وزنی و با استفاده از ترازوی دیجیتال با دقت گرم (۱ گرم) تعیین شد. آبیاری هر ۵ روز انجام می‌شد. در هر آبیاری وزن گلدان آبیاری کامل بدون اعمال بیوچار ملاک عمل بود و بعد از ۵ روز میزان آبی که نیاز بود تا به ظرفیت زراعی برسد، تعیین و مصرف می‌شد.

برای تیمارهای ۴۰٪ و ۷۰٪ آبیاری، به میزان ۴۰٪ و ۷۰٪ آب مورد نیاز تیمار آبیاری کامل، آب مصرف شد. به منظور تولید بیوچار گاوی، فضولات گاوی خشک شده و الک شده (عبور از الک ۲ میلی‌متر) در کوره الکتریکی قرار داده شد و با حرارت ۶۰۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴ ساعت در شرایط نبود اکسیژن فرایند پیرولیز انجام گردید. خصوصیات بیوچار تولیدی در جدول ۲ ارائه شده است.

جدول ۱- ویژگی‌های خاک مورد استفاده در آزمایش

Table 1. Experimental soil characteristics

Texture	Organic carbon (%)	pH	EC $dS.m^{-1}$	Available potassium (ppm)	Available phosphorus (ppm)	Nitrogen (%)
Loamy Sandy	0.8	7.6	0.41	194.5	1.3	0.09

جدول ۲- خصوصیات بیوچار تولیدی مورد استفاده در آزمایش

Table 2. Experimental biochar characteristics

Nitrogen (%)	K (ppm)	P (ppm)	Zn (ppm)	Cu (ppm)	Ca (ppm)	Mn (ppm)	Fe (ppm)	Mg (ppm)	EC $dS.m^{-1}$	pH
1.74	18227	2384	156	27.4	8476	306	1301	1221	7.81	9.13

اندازه‌گیری فعالیت ترکیبات آنتی‌اکسیدان

اندازه‌گیری پراکسید هیدروژن

مقدار پراکسید هیدروژن براساس واکنش پراکسید هیدروژن با یدید پتاسیم (KI) تعیین شد. در این روش مقدار ۰/۵ گرم از بافت تازه برگ در تری‌کلرواستیک اسید (TCA) ۰/۱٪ ساییده شد. عصاره حاصل به مدت ۱۵ دقیقه با ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. سپس به ۵۰۰ میکرولیتر از محلول رویی، ۵۰۰ میکرولیتر بافر فسفات پتاسیم ۱۰۰ میلی‌مولار (pH=7) و ۲ میلی‌لیتر یدید پتاسیم ۱ مولار اضافه گردید. مخلوط واکنش به مدت یک ساعت در تاریکی در دمای اتاق قرار داده شد، سپس جذب نمونه‌ها در ۳۹۰ نانومتر اندازه‌گیری گردید (Alexieva *et al*., 2001).

اندازه‌گیری سوپراکسید دیسموتاز

بازدارندگی آنزیم سوپراکسید دیسموتاز از احیاء نوری نیتروبلوتترازولیوم (NBT) و به روش Dhindsa و همکاران (۱۹۸۱) انجام شد. اساس اندازه‌گیری این روش بازدارندگی آنزیم SOD از احیاء نوری نیتروبلوتترازولیوم (NBT) است. محلول واکنش شامل ۳ میلی‌لیتر بافر فسفات ۵۰ میلی‌مولار (pH=۷/۸)، ۱۳ میلی‌مولار متیونین، ۷۵ میکرولیترNBT، ۲ میکرومولار EDTA و ۵۰ میکرولیتر از عصاره پروتئینی استخراج شده بود که با یکدیگر مخلوط و در مرحله بعد درون میکروتیوب ریخته شد. ریبوفلاوین در مرحله آخر اضافه گردید و میکروتیوب‌ها روی شیکر و در فاصله ۳۰ سانتی‌متری از لامپ فلورسنت ۱۵ وات به مدت ۱۰ دقیقه قرار داده شدند. نمونه شاهد فاقد عصاره آنزیمی بود. مقدار جذب در طول موج ۵۶۰ نانومتر توسط اسپکتروفتومتر قرائت گردید، در نهایت میزان فعالیت آنزیم SOD بر حسب واحد در دقیقه به‌ازای میلی‌گرم پروتئین محاسبه شد.

اندازه‌گیری پراکسیداز

برای سنجش فعالیت آنزیم پراکسیداز از روش Mac-Adam و همکاران (۱۹۹۲) از دستگاه اسپکتروفتومتری در طول موج ۴۷۵ نانومتر در مدت

۱۲۰ ثانیــه استفاده گردید. در این روش با استفاده از بافر فسفات سدیم ۲۰ میلی‌مولار (pH=۶) و گایاکول ۲۰۰ میلی‌مولار به‌عنوان الکترون دهنده و ۱۰ میکرولیتر پراکسید هیدروژن (۳۰٪ w/v) به‌عنوان پذیرنده الکترون، میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز محاسبه و بر حسب واحد در میلی‌گرم پروتئین بیان شد.

اندازه‌گیری پراکسیداسیون لیپیدی غشاء (با استفاده از شاخص مالون دی آلدئید)

پراکسیداسیون لیپیدی غشاء به روش Davey و همکاران (۲۰۰۵) اندازه‌گیری شد. به این صورت که مقدار ۰/۵ گرم از نمونه برگ تازه با نیتروژن مایع برای مدت یک دقیقه در هاون خرد شد. پودر برگ خرد شده درون لوله آزمایش ریخته شد، سپس ۵ میلی‌لیتر بافر پتاسیم فسفات ۵۰ میلی‌مولار (pH=۷) که در درون ظرف یخ قرار داشت به آن اضافه گردید. نمونه حاصل در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ دقیقه با سرعت ۱۴۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. به ۱ میلی‌لیتر از محلول بالایی پس از سانتریفیوژ، ۱ میلی‌لیتر محلول ۰/۵٪ (w/v) اسید تیوباربیتوریک که حاوی اسید تری کلرواستیک ۲۰٪ (w/v) بود، اضافه گردید. مخلوط در حمام آب‌داغ در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۳۰ دقیقه حرارت داده شد. به‌منظور توقف واکنش، ظرف محتوای مخلوط حرارت داده شده به سرعت درون حمام یخ قرار گرفت و اجازه داده شد به مدت ۳۰ دقیقه در حمام یخ بماند. مخلوط سرد شده با سرعت ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه به‌مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ گردید. میزان جذب مخلوط به‌وسیله دستگاه اسپکتروفتومتر در دو طول موج ۵۳۲ نانومتر و ۶۰۰ نانومتر اندازه‌گیری شد.

اندازه‌گیری پروتئین محلول برگ

یک گرم بافت تر نمونه‌های برگ برای استخراج پروتئین محلول برگ برداشت شد. سپس با ۵ میلی‌لیتر بافر تریس HCL ۰/۰۵ مولار با pH=۷/۵ در دمای ۴-۰ درجه سانتی‌گراد ساییده شد و محلول حاصل به مدت ۲۵ دقیقه با ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه توسط سانتریفیوژ یخچال‌دار در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد، سانتریفیوژ گردید (Bradford, 1979). محلول رویی برای سنجش غلظت پروتئین محلول استفاده شد.

در این روش برای کالیبره کردن اسپکتروفتومتر، ۹۹۰ میکرولیتر محلول برادفورد (شامل آبی کوماسی ۰/۱ گرم، اتانول ۹۶٪ (۵۰cc) و اسید فسفریک ۸۵٪ (۱۰۰cc)) با ۱۰ میکرولیتر از بافر تریس مخلوط گردید، سپس توسط اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۹۵ نانومتر کالیبره شد. برای اندازه‌گیری میزان پروتئین‌های محلول ۱۰ میکرولیتر از نمونه آزمایشی (عصاره) به ۹۹۰ میکرولیتر از محلول برادفورد اضافه شد و میزان جذب در طول موج ۵۹۵ نانومتر قرائت گردید. در نهایت میزان پروتئین‌های محلول با استفاده از رابطه ۱ و به کمک میزان جذب در محلول استاندارد محاسبه شد.

رابطه ۱

۱۰۰۰× (وزن تر نمونه) / (میزان پروتئین محاسبه شده (ppm) ×حجم نمونه) =پروتئین (میلی‌گرم بر گرم وزن تر)

اندازه‌گیری محتوای پرولین

محتوای پرولین گیاه با استفاده از روش Bates و همکاران (۱۹۷۳) اندازه‌گیری شد. به این ترتیب که ۰/۵ گرم برگ تر سیاه‌دانه درون هاون با کمک ازت مایع خرد و درون یک تیوب ریخته شد، سپس ۱۰ میلی‌لیتر سولفوسالیسیلیک اسید ۳٪ به آن اضافه گردید و نمونه درون یخ قرار داده شد. سپس به مدت ۱۰ تا ۱۵ دقیقه با ۱۵۰۰۰ دور در دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ گردید تا مواد اضافی از محلول جدا شود. مقدار ۲ میلی‌لیتر از عصاره صاف شده درون میکروتیوب

ریخته شد و ۲ میلی‌لیتر ناین‌هیدرین و ۲ میلی‌لیتر اسید استیک گلاسیال به آن افزوده گردید و بعد خوب مخلوط شد. همزمان مقدار ۲ میلی‌لیتر از محلول‌های استاندارد صفر، ۴، ۸، ۱۲، ۱۶ و ۲۰ میلی‌گرم در لیتر پرولین درون میکروتیوب ریخته شد و ۲ میلی‌لیتر اسید ناین‌هیدرین و ۲ میلی‌لیتر اسید استیک گلاسیال به آنها افزوده گردید و بعد خوب مخلوط شد. نمونه‌ها در حمام آب گرم به مدت ۱ ساعت حرارت داده شدند و بعد درون حمام یخ قرار گرفتند. مقدار ۴ میلی‌لیتر تولوئن به محلول اضافه گردید و بعد به مدت ۲۰ ثانیه ورتکس شد. استانداردهای پرولین محلول در مرحله تولوئن به اندازه لازم در کووت دستگاه اسپکتروفتومتر ریخته شد و مقدار پرولین در طول موج ۵۲۰ نانومتر قرائت گردید و منحنی استاندارد آن رسم شد. سپس میزان جذب در نمونه‌های گیاهی را قرائت کرده و با قراردادن آن در رابطه خطی (رابطه ۲) مقدار پرولین بدست آمد.

$$X = [(A.B)/C]/(D/5)] \qquad \text{رابطه ۲}$$

در فرمول بالا، X مقدار پرولین بافت بر حسب میکروگرم در گرم بافت خشک، A مقدار پرولین بدست آمده از نمودار استاندارد بر حسب میکروگرم بر میلی‌لیتر، B مقدار تولوئن استفاده شده بر حسب میلی‌لیتر، C عدد مولکولی پرولین و D مقدار نمونه گیاهی توزین شده بر حسب گرم است.

اندازه‌گیری کربوهیدرات‌های محلول (در آب و الکل)

به منظور اندازه‌گیری کربوهیدرات‌های محلول، ابتدا به ۰/۱ گرم برگ ۱۰cc اتانول ۹۶٪ اضافه گردید و در بن‌ماری با دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد تا زمانی که ۲/۳ الکل تبخیر گردد. در مرحله بعد با اضافه کردن الکل دوباره به حجم رسید، سپس با دور ۵۳۰۰ به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شد. پس از اتمام سانتریفیوژ، محلول از تفاله جداسازی شد (در این مرحله محلول مورد نظر برای اندازه‌گیری کربوهیدرات‌های محلول در آب و الکل آماده بود). پس از جدا کردن محلول از تفاله، تفاله در آون خشک و ۱۰cc آب مقطر به آن اضافه و به‌مدت ۲ ساعت در بن‌ماری با دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. در مرحله بعد با اضافه کردن آب مقطر دوباره به حجم رسید، سپس با دور ۵۳۰۰ به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ گردید. پس از اتمام سانتریفیوژ، محلول از تفاله جداسازی شد (در این مرحله محلول مورد نظر برای اندازه‌گیری کربوهیدرات‌های محلول در آب آماده بود). با افزودن ۳cc آنترون به ۰/۵cc عصاره و قرار دادن آن در بن‌ماری با دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۸ دقیقه، مراحل ادامه یافت. سپس نمونه‌ها به‌سرعت در داخل آب یخ قرار گرفتند و توسط اسپکتروفتومتر با طول موج ۶۳۰ نانومتر قرائت شدند (Hedge & Hofreiter, 1962).

اندازه‌گیری ظرفیت اسمزی

به منظور اندازه‌گیری ظرفیت اسمزی، نمونه‌برداری از گلدان‌ها انجام شد و برگ‌ها به قطعات کوچک تقسیم شدند و از هر یک از نمونه‌ها ۰/۳ گرم برگ داخل سرسمپلر سوراخ شده با سوزن قرار داده شد و سرسمپلر درون میکروتیوب ۱/۵ گذاشته شد. سپس به‌مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و با ۱۳۵۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. در واقع با این عمل، عصاره برگی از درون سرسمپلر وارد میکروتیوب گردید. برای قرائت، ۱۹۸۰ میکرولیتر آب دوبار تقطیر شده با ۲۰ میکرولیتر عصاره مخلوط شد و بعد به‌مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و با ۱۴۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. ظرفیت اسمزی ۱۵۰ میکرولیتر از مخلوط با دستگاه اسمومتر (KNAUER, K-7400, Germany) قرائت شد.

قبل از تجزیه داده‌ها آزمون نرمال بودن آنها به‌وسیله نرم‌افزار Mini Tab انجام شد. بعد از اطمینان از نرمال بودن داده‌ها، تجزیه واریانس با استفاده از نرم‌افزار SAS ver. 9.4 آنالیز و برای مقایسه میانگین تیمارها از آزمون LSD

(حداقل تفاوت معنی‌دار) استفاده شد و نمودارها به کمک نرم‌افزار Excel ترسیم شد.

نتایج

پراکسید هیدروژن

براساس نتایج تجزیه واریانس اثر رژیم‌های آبیاری و کاربرد بیوچار و اثر متقابل آنها بر محتوای پراکسید هیدروژن در سطح احتمال ۱٪ معنی‌دار بود (جدول ۳). با افزایش شدت تنش خشکی، میزان تولید و تجمع پراکسید هیدروژن افزایش یافت و کمترین میزان تولید پراکسید هیدروژن نیز به گیاهان تحت آبیاری کامل تعلق داشت. نتایج نشان داد تأثیر کاربرد بیوچار بر تولید پراکسید هیدروژن معنی‌دار بود. به‌نحوی که میزان پراکسید هیدروژن تولیدی در تمام سطوح آبیاری با کاربرد بیوچار در مقایسه با عدم کاربرد بیوچار کمتر بود. پائین‌ترین میزان تولید پراکسید هیدروژن در تیمار آبیاری کامل با کاربرد بیوچار (۱۳۰ میکرومول بر گرم برگ تازه) و بالاترین میزان تولید پراکسید هیدروژن در تیمار آبیاری ۴۰٪ و عدم کاربرد بیوچار (۴۱۰ میکرومول بر گرم برگ تازه) مشاهده شد. در سطوح آبیاری ۴۰، ۷۰ و ۱۰۰ درصد ظرفیت زراعی خاک کاربرد بیوچار نسبت به عدم کاربرد آن به‌ترتیب ۲۷/۰۸، ۹/۶۷ و ۳۱/۵۷ درصد تولید شد و پراکسید هیدروژن کاهش یافت (شکل ۱).

جدول ۳- تجزیه واریانس تأثیر سطوح مختلف تنش خشکی و بیوچار بر فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان و تجمع اسمولیت‌های سیاه‌دانه

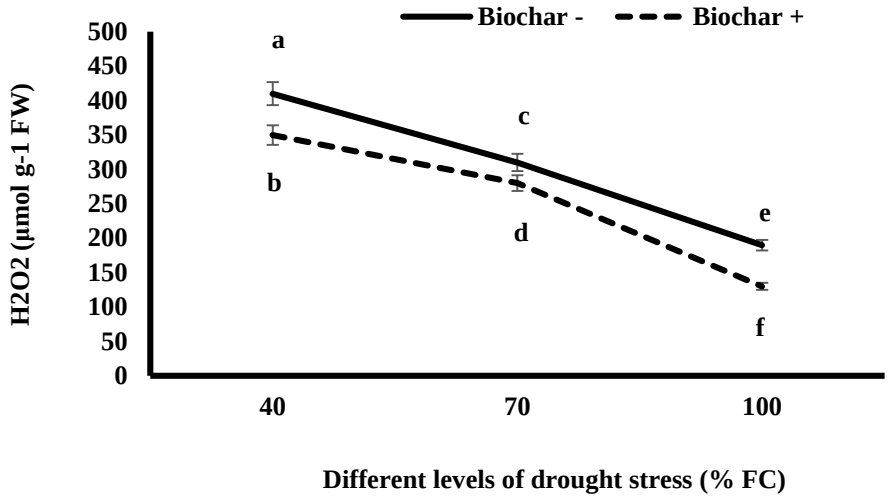
Table 3. ANOVA of different levels of drought stress and biochar effects on antioxidant enzyme activity and osmolyte accumulation in *Nigella sativa*

Sources of Variations	df	Mean squares							
		Hydrogen peroxide	Superoxide dismutase	Peroxidase	Malondialdehyde	Proline	Water soluble carbohydrates	Ethanol soluble carbohydrates	Osmotic potential
Replication	2	2293**	964**	0.09**	3.3**	0.05**	9.7**	28.7**	0.13**
Irrigation(I)	2	72868**	27626**	3.3**	240.6**	1.5**	333.9**	604.8**	1.1**
Biochar(B)	1	11100**	4047**	0.6**	5.9**	0.06**	31.6**	60.8**	0.06**
I×B	2	444**	554**	0.06**	1.4**	0.01**	7.1**	7.9**	0.02**
Error	10	52.5	20.1	0.002	0.15	0.001	0.23	0.42	0.001
CV (%)		2.6	2.4	2.8	3.8	2.5	2.7	2.1	1.8

*, and **: significant at 5, and 1% probability levels, respectively.

سوپراکسیددیسموتاز و پراکسیداز

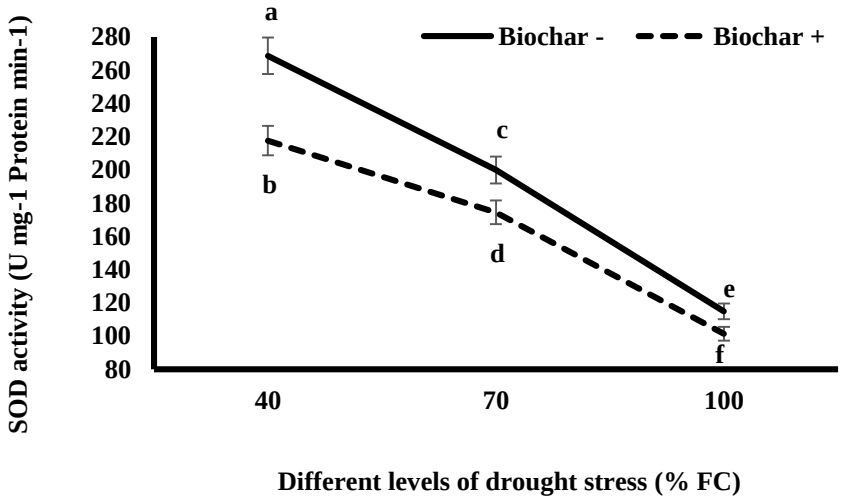
اثرهای اصلی و اثر متقابل رژیم‌های آبیاری و کاربرد بیوچار بر میزان فعالیت آنزیم‌های سوپراکسیددیسموتاز و پراکسیداز معنی‌دار بود (جدول ۳). بالاترین میزان فعالیت آنزیم‌های سوپراکسیددیسموتاز و پراکسیداز در تیمار ۴۰٪ ظرفیت زراعی خاک و عدم کاربرد بیوچار مشاهده شد. در سطوح آبیاری ۴۰، ۷۰ و ۱۰۰ درصد ظرفیت زراعی خاک کاربرد بیوچار نسبت به عدم کاربرد آن به‌ترتیب ۱۹، ۱۲/۷۴ و ۱۱/۶۹ درصد فعالیت آنزیم سوپراکسیددیسموتاز تقلیل یافت، همچنین فعالیت آنزیم پراکسیداز در سطوح آبیاری ۴۰، ۷۰ و ۱۰۰ درصد ظرفیت زراعی خاک کاربرد بیوچار نسبت به عدم کاربرد آن به‌ترتیب ۲۱/۵۸، ۱۵/۰۷ و ۱۹/۰۹ درصد کاهش پیدا کرد (شکل‌های ۲ و ۳).



شکل ۱- مقایسه میانگین محتوای پراکسیدهیدروژن (H_2O_2) سیاه‌دانه در سطوح مختلف تنش خشکی و بیوچار

Figure 1. Means comparison of H_2O_2 content in *Nigella sativa* under different levels of drought stress and biochar

Means with common letters are in the same statistical group at 5% probability level (LSD test).



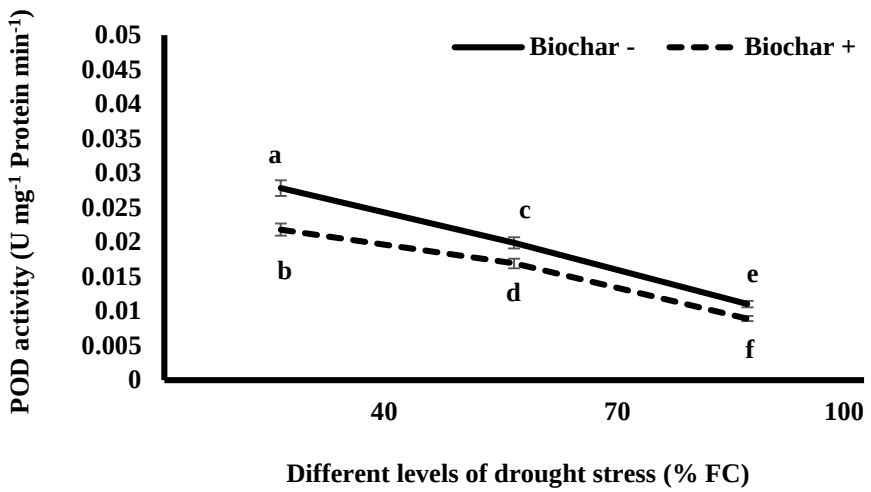
شکل ۲- مقایسه میانگین فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز (SOD) سیاه‌دانه در سطوح مختلف تنش خشکی و بیوچار

Figure 2. Means comparison of superoxide dismutase (SOD) activity in *Nigella sativa* under different levels of drought stress and biochar

Means with common letters are in the same statistical group at 5% probability level (LSD test).

مالون دی آلدئید

اثر رژیم‌های آبیاری و کاربرد بیوچار و اثر متقابل آنها بر محتوای مالون دی آلدئید در سطح احتمال ۱٪ معنی‌دار بود (جدول ۳).

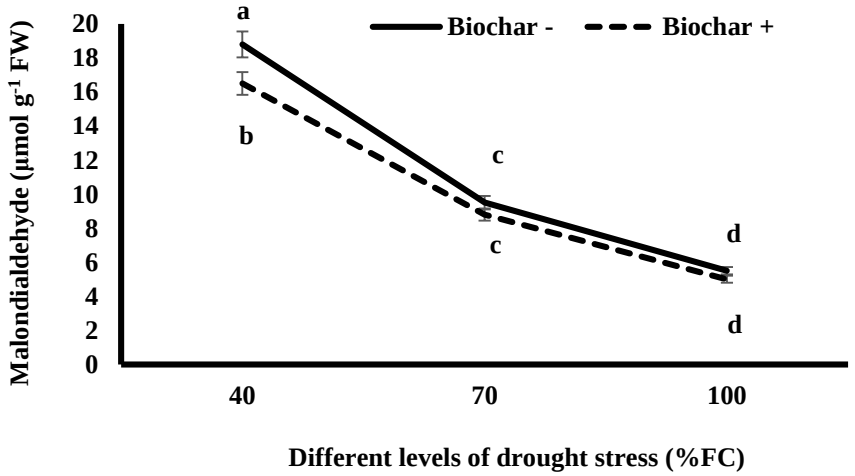


شکل ۳- مقایسه میانگین فعالیت آنزیم پراکسیداز (**POD**) سیاه‌دانه در سطوح مختلف تنش خشکی و بیوچار

Figure 3. Means comparison of peroxidase (POD) activity in *Nigella sativa* under different levels of drought stress and biochar

Means with common letters are in the same statistical group at 5% probability level (LSD test).

افـزایش شـدت تـنش خشـکی باعـث افـزایش در تجمـع مالون دی آلدئید شد و بیشترین میـزان مـالون دی آلدئیـد در تنش شدید (۴۰٪ آبیاری) و عدم کـاربرد بیوچـار و کمتـرین میزان آن در تیمار آبیـاری کامـل در شـرایط کـاربرد و عـدم کاربرد بیوچـار مشـاهده شـد. در سـطوح آبیـاری ۴۰، ۷۰ و ۱۰۰ درصد ظرفیت زراعی خاک کاربرد بیوچار نسبت به عدم کـاربرد آن بـه‌ترتیـب ۱۲/۲۳، ۷/۳۷ و ۹/۱ درصـد فعالیـت آنزیم سوپراکسیددیسموتاز کـاهش پیـدا کـرد، هرچنـد میـان کاربرد و عدم کاربرد بیوچار در سطوح آبیـاری ۷۰٪ و ۱۰۰٪ ظرفیت زراعی تفاوت معنی‌دار وجود نداشت (شکل ۴).



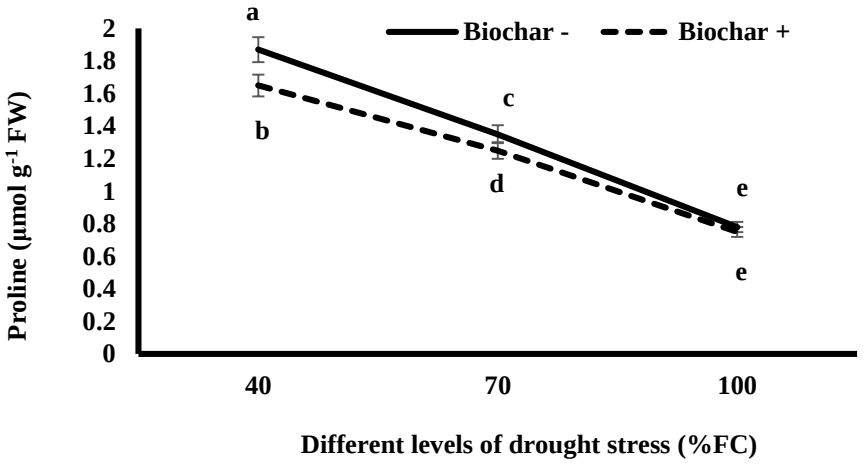
شکل ۴- مقایسه میانگین تجمع مالون دی آلدئید (**MDA**) سیاه‌دانه در سطوح مختلف تنش خشکی و بیوچار

Figure 4. Means comparison of malondialdehyde (MDA) accumulation in *Nigella sativa* under different levels of drought stress and biochar

Means with common letters are in the same statistical group at 5% probability level (LSD test).

محتوای پرولین

براساس نتایج تجزیه واریانس اثرهای اصلی و متقابل رژیم‌های آبیاری و کاربرد بیوچار بر محتوای پرولین در سطح احتمال ۱٪ معنی‌دار بود (جدول ۳). میان کاربرد و عدم کاربرد بیوچار در سطح آبیاری ۱۰۰٪ ظرفیت زراعی تفاوت معنی‌دار وجود نداشت، اما در سطوح آبیاری ۴۰٪ و ۷۰٪ ظرفیت زراعی بین کاربرد و عدم کاربرد بیوچار تفاوت وجود داشت و بیشترین محتوای پرولین در تیمار ۴۰٪ آبیاری و عدم کاربرد بیوچار مشاهده شد (شکل ۵).



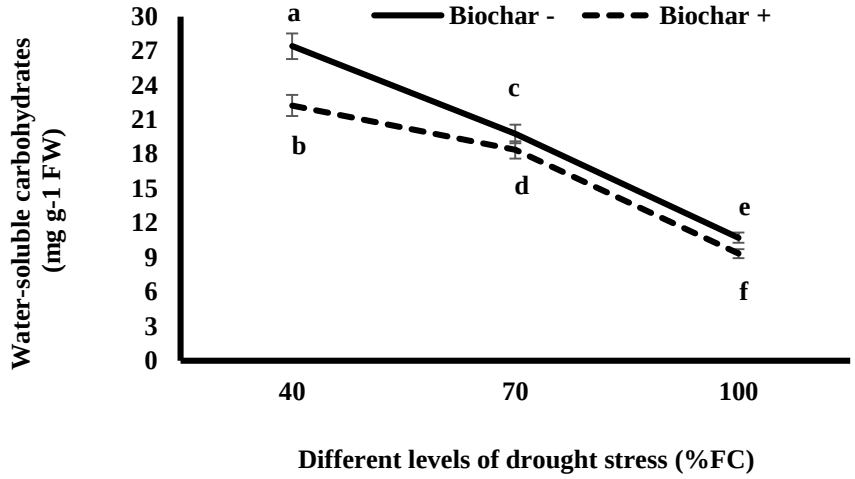
شکل ۵- مقایسه میانگین محتوی پرولین سیاه‌دانه در سطوح مختلف تنش خشکی و بیوچار

Figure 5. Means comparison of proline content in *Nigella sativa* under different levels of drought stress and biochar

Means with common letters are in the same statistical group at 5% probability level (LSD test).

کربوهیدرات‌های محلول (در آب و الکل)

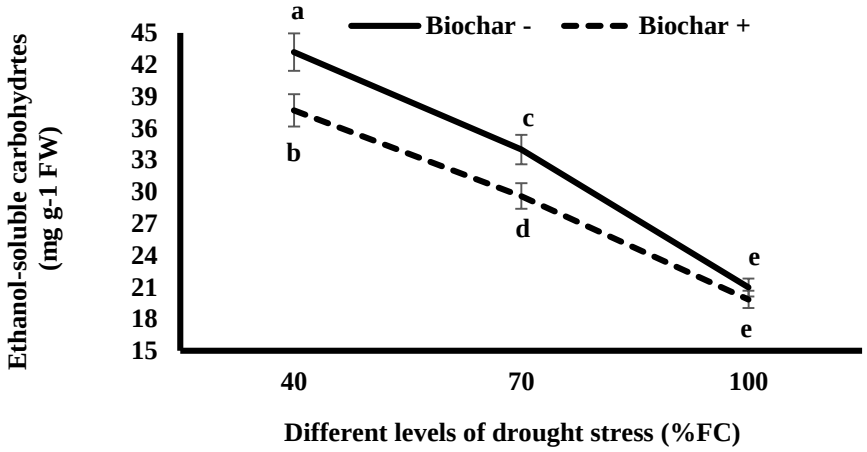
اثر رژیم‌های آبیاری و کاربرد بیوچار و اثر متقابل آنها بر میزان کربوهیدرات‌های محلول در آب و الکل معنی‌دار بود (جدول ۳). کربوهیدرات‌های محلول تحت تنش خشکی افزایش یافت، افزایش کربوهیدرات‌های محلول در آب به‌گونه‌ای بود که بیشترین کربوهیدرات‌های محلول در تیمار تنش شدید و عدم بیوچار و کمترین میزان تجمع کربوهیدرات‌های محلول در آبیاری کامل مشاهده شد. در سطوح آبیاری ۴۰، ۷۰ و ۱۰۰ درصد ظرفیت زراعی خاک کاربرد بیوچار نسبت به عدم کاربرد آن به‌ترتیب ۱۸/۸۲، ۷/۰۳ و ۱۲/۹۵ درصد کربوهیدرات‌های محلول در آب کاهش یافت (شکل ۶). کربوهیدرات‌های محلول در الکل نیز با افزایش شدت تنش خشکی افزایش یافت و بیشترین کربوهیدرات‌های محلول در تیمار تنش شدید و عدم کاربرد بیوچار و کمترین میزان تجمع کربوهیدرات‌های محلول در آبیاری کامل بدست آمد. در سطوح آبیاری ۴۰، ۷۰ و ۱۰۰ درصد ظرفیت زراعی خاک کاربرد بیوچار نسبت به عدم کاربرد آن به‌ترتیب ۱۲/۷۳، ۱۲/۹۴ و ۵/۳۴ درصد کربوهیدرات‌های محلول در الکل را کاهش داد، به‌نحوی که میان کاربرد و عدم کاربرد بیوچار در سطح آبیاری ۱۰۰٪ ظرفیت زراعی تفاوت معنی‌دار وجود نداشت، اما در سطوح آبیاری ۴۰٪ و ۷۰٪ ظرفیت زراعی بین کاربرد و عدم کاربرد بیوچار تفاوت وجود داشت (شکل ۷).



شکل ۶- مقایسه میانگین محتوی کربوهیدرات‌های محلول در آب سیاه‌دانه در سطوح مختلف تنش خشکی و بیوچار

Figure 6. Means comparison of water-soluble carbohydrates content in *Nigella sativa* under different levels of drought stress and biochar

Means with common letters are in the same statistical group at 5% probability level (LSD test).



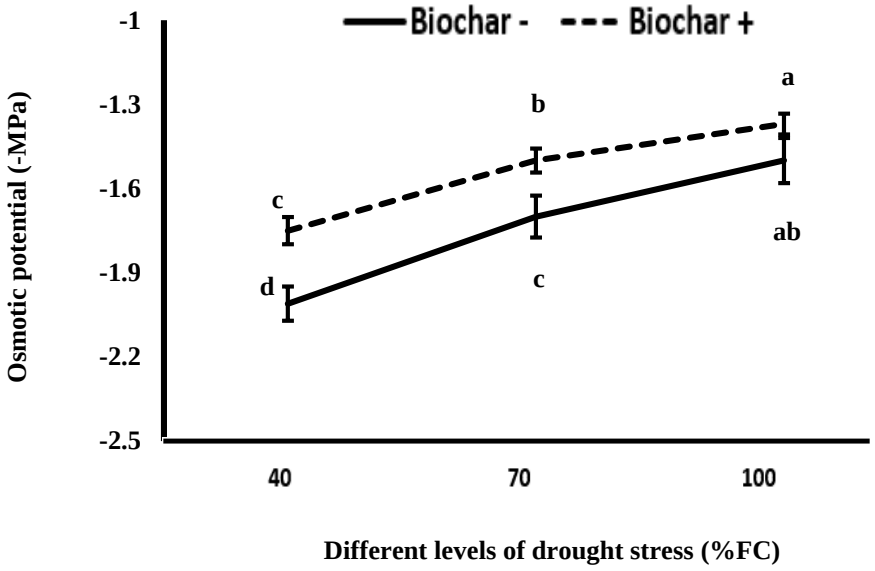
شکل ۷- مقایسه میانگین محتوی کربوهیدرات‌های محلول در الکل سیاه‌دانه در سطوح مختلف تنش خشکی و بیوچار

Figure 7. Means comparison of ethanol-soluble carbohydrates content in *Nigella sativa* under different levels of drought stress and biochar

Means with common letters are in the same statistical group at 5% probability level (LSD test).

ظرفیت اسمزی

اثرهای اصلی و متقابل رژیم‌های آبیاری و کاربرد بیوچار بر میزان ظرفیت اسمزی در سطح ۱٪ معنی‌دار بود (جدول ۳). به‌طوری که در شکل ۸ ملاحظه می‌گردد در اثر افزایش شدت تنش خشکی ظرفیت اسمزی گیاه افزایش پیدا کرد. کمترین میزان ظرفیت اسمزی در آبیاری کامل و کاربرد بیوچار بدست آمد که با عدم کاربرد بیوچار اختلاف معنی‌داری نداشت، اما در مقایسه با تیمارهای ۷۰٪ و ۴۰٪ آبیاری و کاربرد بیوچار به‌ترتیب ۳۳٪ و ۴۷/۴٪ ظرفیت اسمزی پائین‌تری داشت (شکل ۸).



شکل ۸- مقایسه میانگین پتانسیل اسمزی سیاه‌دانه در سطوح مختلف تنش خشکی و بیوچار

Figure 8. Means comparison of osmotic potential in *Nigella sativa* under different levels of drought stress and biochar

Means with common letters are in the same statistical group at 5% probability level (LSD test).

بحث

در شرایط تنش خشکی، کاهش آسیمیلاسیون دی‌اکسیدکربن در اثر بسته شدن روزنه‌ها منجر به مصرف نشدن محصولات حاصل از زنجیره انتقال الکترون (NADPH و ATP) شده و از این طریق میزان فردوکسین احیاء افزایش می‌یابد و افزایش فردوکسین احیاء شده، افزایش تولید رادیکال‌های فعال مانند پراکسید هیدروژن را در پی دارد (Sun *et al*., 2017). افزودن بیوچار به خاک منجر به افزایش میزان نگهداشت آب شد و ظرفیت نگهداری آب به‌دلیل ظرفیت جذب بالا و ساختار متخلل بیوچار می‌باشد. همچنین، کاربرد بیوچار به‌طور قابل ملاحظه‌ای وضعیت آب گیاه را افزایش می‌دهد و سبب تقلیل اثرهای منفی ناشی از تنش خشکی می‌گردد. در مطالعه Safahani و Noora (۲۰۱۸) نیز بهبود وضعیت آبی و کاهش اثرهای منفی تنش خشکی بر گیاه کدو در اثر کاربرد بیوچار در شرایط کمبود آب گزارش گردید. در این مطالعه تنش خشکی باعث افزایش در فعالیت آنزیم‌های سوپراکسیددبسموتاز و پراکسیداز شد که می‌تواند دلیل غیرمستقیمی بر افزایش فعالیت رادیکال‌های آزاد مانند پراکسید هیدروژن، تحت تنش خشکی در سیاه‌دانه باشد. Rezaei-Chiyaneh و همکاران (۲۰۱۸) بیان کردند که طی تنش خشکی تجمع سوپراکسیددیسموتاز و پراکسیداز افزایش می‌یابد. هر چند به نظر می‌رسد با افزایش شدت تنش، میزان تولید ترکیب‌های سمّی رادیکال‌های فعال اکسیژن (ROS) افزایش بیشتری پیدا کرد و گیاه برای مبارزه با رادیکال‌های آزاد تولید شده، القاء فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی خود را بیشتر افزایش داده است.

سوپراکسیددیسموتاز اولین و مهمترین آنزیم در فرایند سمّیت‌زدایی ترکیبات ROS است که با تبدیل رادیکال سوپراکسید (O^{-2}) به پراکسید هیدروژن در سیتوسول، کلروپلاست و میتوکندری، نقش حیاتی در سازوکارهای دفاعی سلول در برابر خطر تشکیل رادیکال هیدروکسیل

(OH) ایفاء می‌کند (Khatun *et al*., 2008). در واقع کاربرد بیوچار سبب کاهش میزان تولید سوپراکسیددیسموتاز و پراکسیداز نسبت به شرایط عدم کاربرد بیوچار شد، به‌طوری که احتمالاً بیوچار با تولید غلظت‌های پائین‌تر سوپراکسیددیسموتاز و پراکسیداز سبب فعال کردن ژن‌های وابسته به مقاومت شده است. اگرچه پراکسید هیدروژن در غلظت‌های بالا سمّی است و به‌وسیله آنزیم کاتالاز و آسکوربات پراکسید از چرخه آنتی‌اکسیدانی آسکوربات گلوتاتیون از بین می‌رود، اما در غلظت‌های پایین می‌تواند نقش پیام را در فرایندهای انتقال پیام بازی کند و ژن‌های وابسته به مقاومت را در گیاه فعال کند (Unyayar *et al*., 2005).

یکی از واکنش‌هایی که در حضور انواع اکسیژن فعال سرعت بیشتری پیدا می‌کند، پراکسیداسیون لیپیدهای غشاء است. در این مطالعه با افزایش شدت تنش میزان تجمع پراکسید هیدروژن افزایش یافت، با توجه به این موضوع که تأثیر رادیکال‌های اکسیژن بر لیپیدها (ناشی از تأثیر بر پیوندهای دوگانه اسیدهای چرب غیراشباع)، باعث تحریک واکنش‌های زنجیره پراکسیداسیون می‌گردند، بنابراین منجر به تخریب اسیدهای چرب می‌شوند (Shahid *et al*., 2014). Darvizheh و همکاران (۲۰۱۹) بیان کردند که تنش خشکی باعث افزایش فعالیت سوپراکسیددیسموتاز، پراکسیداز و مالون دی آلدئید می‌گردد. افزایش تجمع در فعالیت آنزیم‌های سوپراکسیددیسموتاز و پراکسیداز نشان‌دهنده فعال شدن توان آنتی‌اکسیدانی گیاه در مقابل تنش اکسیداتیو ناشی از خشکی (افزایش تجمع پراکسید هیدروژن) است، اما این ظرفیت آنتی‌اکسیدانی در گیاه سیاه‌دانه برای مقابله با تنش کافی نبود، زیرا افزایش تجمع مالون دی آلدئید را به‌دنبال داشت. بنابراین می‌توان استنباط کرد که ظرفیت آنتی‌اکسیدانی گیاه به‌تنهایی و بدون راهکارهای مدیریتی، قادر نخواهد بود تا تمامی اکسیدانت‌ها را حذف نماید. در این مطالعه بکارگیری بیوچار اگرچه بر افزایش توان آنتی‌اکسیدانی سیاه‌دانه تأثیر مستقیم نداشت، اما توانست با کاهش تولید پراکسید هیدروژن، زمینه را برای کاهش تولید مالون دی آلدئید فراهم کند. Safahani و Noora (۲۰۱۸) کاهش اثرهای منفی تنش خشکی در اثر کاربرد بیوچار و کاهش در تجمع پراکسید هیدروژن، سوپراکسیددیسموتاز، پراکسیداز و مالون دی آلدئید را در گیاه کدو پوست کاغذی گزارش کردند.

براساس نظر پژوهشگران، محتوای پرولین طی تنش خشکی افزایش می‌یابد (Darvizheh *et al*., 2019). پرولین نقش کلیدی در ثبات پروتئین‌ها و غشاء سلولی در زمان وقوع تنش‌های اسمزی دارد (Zaki & Radwan, 2011). در برگ‌های بالغ تجزیه پروتئین‌ها باعث کاهش غلظت آنها و در نتیجه افزایش اسیدهای آمینه آزاد ازجمله پرولین می‌شود. گزارش شده است که پرولین با پیوستن به فسفولیپیدهای غشایی و تغییرات در لایه هیدراته اطراف ماکرومولکول‌های زیستی در حفظ و ثبات غشاءها نقش دارد (Matysik *et al*., 2002؛ Verbruggen & Hermans, 2008). پرولین با حذف یا کاهش تولید اکسیژن یگانه در کاهش آسیب نوری در غشای تیلاکوئیدها مؤثر بوده است (Chaitanya *et al*., 2009). افزایش مقدار پرولین تحت تنش خشکی ممکن است هم مربوط به خاصیت اسمولیتی و هم مربوط به خاصیت آنتی‌اکسیدانی آن در شرایط تنش باشد. به‌خوبی مشخص شده است که پرولین در محدوده وسیعی از موجودات از باکتری تا گیاهان عالی به‌هنگام مواجه با تنش‌های غیرزیستی تجمع می‌یابد. سنتز پرولین در کاهش ظرفیت اسمزی سیتوپلاسمی و حفظ نسبت $NADP^+/NADPH$ دخالت دارد. همچنین پرولین به‌عنوان یک اسمولیت، حذف کننده رادیکال‌های آزاد، تثبیت کننده ماکرومولکول‌ها و یک جزء دیواره سلولی عمل می‌کند. اهمیت تجمع پرولین در حفظ وضعیت آبی گیاه بیشتر از اهمیت سایر مواد آلی است و پرولین به‌عنوان رایج‌ترین اسمولیت انباشته شده در شرایط تنش عمل می‌کند. پرولین به‌عنوان یک محافظ شیمیایی باعث پایداری فرم طبیعی پروتئین‌ها شده و از به‌هم‌خوردن شکل طبیعی ترکیبات آنزیمی ممانعت می‌نماید و کلات کننده فلزات است و از پراکسیداسیون لیپیدها جلوگیری می‌کند و باعث حفظ

تمامیت غشاء می‌گردد، بنـابراین در هنگام تنش خشکی، تولید پرولین افزایش می‌یابد تا گیاه در مقابل تنش اکسیداتیو حفظ گردد (Hayat *et al.*, 2012). از سوی دیگر در تیمارهای کاربرد بیوچار نسبت به عدم کاربرد آن، تجمع پرولین کمتر بود، به این معنی که کاربرد بیوچار اثرهای منفی تنش خشکی را تقلیل داد. در این ارتباط Safahani و Noora (۲۰۱۸)، کاهش تجمع پرولین در شرایط تنش خشکی و کاربرد بیوچار را نسبت به عدم کاربرد بیوچار گزارش نمودند و بیان کردند که بیوچار با افزایش رطوبت خاک سبب کاهش اثرهای منفی تنش خشکی گردید. در همین ارتباط محققان بیان کردند که کاربرد بیوچار در شرایط تنش سبب کاهش محتوای پرولین و پروتئین‌های محلول در برگ‌های نعناع شد (Farhangi-Abriz & Ghassemi-Golezani, 2022).

کربوهیدرات‌ها نقش دوگانه‌ای در سلول‌های گیاهی بر عهده دارند. از یک سو، به‌عنوان یک عامل اسموتیک ظرفیت اسمزی را منفی کرده و باعث حفظ حالت تورژسانس و شادابی سلول‌ها می‌شوند و از سوی دیگر، با تأمین انرژی و اسکلت کربنی مورد نیاز فرایندهای بیوسنتزی، رشد و نمو سلول‌ها را به‌دنبال دارد. در حقیقت می‌توان اظهار داشت که در شرایط تنش کربوهیدرات‌ها به‌عنوان یک عامل اسموتیک عمل نمودند و در شرایط عدم تنش کربوهیدرات‌ها در رشد و نمو گیاه مشارکت داشتند. در هنگام کمبـود آب، حفـظ ظرفیت آب گیاه برای ادامه رشد ضروری است و می‌تواند از طریق سازوکارهـای تنظیم اسمزی ناشی از تجمـع محلـول‌های سـازگار مانند پـرولین و کربوهیدرات‌های محلول در آب و الکل در سیتوپلاسم ایجاد گردد (Ajithkumar & Panneerselvam, 2013).

گیاهان برای تنظیم قابلیت اسمزی درون سـلول در شـرایط محیطی نامساعد مانند تنش خشکی، مواد محلول سازگار بـا وزن مولکولی کم مانند اسیدهای آمینـه، قنـدها و اسیدهای آلی را تولید می‌کنند. پرولین و کربوهیدرات‌های محلـول برگ از عمده‌ترین این ترکیب‌ها بوده و نقش آنها در حفظ آماس سلول‌ها و سازگاری در شرایط تنش خشکی است. پرولین و قندهای محلول نیز با افزایش غلظت اسمزی به حذف رادیکال‌های آزاد اکسیژن از سلول‌های گیاهی کمک می‌کنند و اثرهای تنش خشکی بر واکنش‌های فیزیولوژیک مانند باز و بسته شدن روزنه‌ها و فتوسنتز را کاهش می‌دهند (Tiryaki, 2016). اما اگر شرایط مساعد باشد (عدم تنش خشکی)، اسمولیت‌های سازگار می‌توانند صرف رشد گیاه شوند. از آنجا که در این آزمایش، افـزایش شدت تنش (کاهش آبیاری)، افزایش تجمع در فعالیت آنزیم‌های سوپراکسیددیسموتاز و پراکسیداز نشان دهنده فعال شدن توان آنتی‌اکسیدانی گیاه در مقابل تنش اکسیداتیو ناشی از خشکی (افزایش تجمع پراکسید هیدروژن) است، افزایش تجمع مالون دی آلدئید، حکایت از کافی نبودن ظرفیت آنتی‌اکسیدانی در گیاه سیاه‌دانه برای مقابله با تنش بود. همچنین افزایش شدت تنش خشکی سبب افزایش تجمع پرولین، کربوهیدرات‌های محلول در آب و در الکل و در نهایت منفی‌تر شدن ظرفیت اسمزی شد. در طرف مقابل کاربرد بیوچار با کاهش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان و اسمولیت‌های محافظت کننده، بیان‌کننده نقش مفید بیوچار در کاهش اثرهای نامطلوب تنش خشکی بر گیاه سیاه‌دانه بود. مطابق با نتایج این مطالعه، محققان دیگر نیز گزارش کردند که کاربرد بیوچار در شرایط تنش نسبت به عدم کاربرد بیوچار، با کاهش اثرهای مخرب تنش موجب کاهش تجمع کربوهیدرات‌های محلول می‌گردد و از منفی شدن بیشتر ظرفیت اسمزی جلوگیری می‌کند (Ghassemi-Golezani & Farhangi-Abriz, 2023).

به‌عنوان نتیجه‌گیری کلی باید گفت که، اگرچه تجمع اسمولیت‌های سازگار سبب افزایش تحمل به خشکی می‌گردد اما برای گیاه هزینه دارد. افزایش پراکسیداسیون لیپید و مقدار پراکسید هیدروژن در شرایط تنش خشکی ناشی از افزایش تولید گونه‌های فعال اکسیژن در شرایط تنش اکسیداتیو می‌باشد که حذف یا غیرفعال کردن آنها خارج از توان گیاه بوده است و نشان می‌دهد که سازوکارهای دفاعی ایجاد شده در گیاه در مقابل تنش اکسیداتیو کافی نبوده است. در چنین شرایطی راهکارهای

مدیریتی می‌تواند رابطه را به سود گیاهان تغییر دهد. در این پژوهش، کاربرد بیوچار به کاهش تجمع اسمولیت‌ها و آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان منجر شد و توانست اثرهای منفی تنش خشکی را تقلیل دهد؛ بنابراین با توجه به اثرهای زیست‌محیطی مثبتی که کاربرد بیوچار می‌تواند به ارمغان بیاورد از یک سو و از سوی دیگر ماندگاری آن به مدت طولانی (به طور میانگین ۳۰ سال) و عدم نیاز کاربرد دوباره آن در این بازه زمانی و قابل دسترس بودن و ارزان بودن ماده اولیه برای تولید بیوچار مانند کودهای دامی و ضایعات گیاهی که منجر به صرفه اقتصادی استفاده از این نهاده طبیعی می‌گردد، بکارگیری بیوچار می‌تواند به‌عنوان یک ابزار مفید در خدمت کشاورزی محسوب گردد.

سپاسگزاری

بدین وسیله از مسئولان محترم دانشگاه کردستان برای حمایت مالی این پژوهش قدردانی می‌گردد.

References

- Abbaspour, F., Asghari, H.R., Rezvani Moghaddam, P., Abbasdokht, H., Shabahang, J. and Baig Babaei, A., 2017. Effects of biochar application on yield and yield components of black seed (*Nigella sativa* L.) under low irrigation conditions. Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants, 33: 837-852.
- Abbas, T., Rizwan, M., Ali, S., Rehman, M.Z., Qayyum, M.F., Abbas, F., Hannan, F., Rinklebe, J. and Ok, Y.S., 2017. Effect of biochar on cadmium bioavailability and uptake in wheat (*Triticum aestivum* L.) grown in a soil with aged contamination. Ecotoxicology and Environmental Safety, 140: 37-47.
- Ajithkumar, P. and Panneerselvam, R., 2013. Osmolyte accumulation, photosynthetic pigment and growth of *Setaria italica* under droght stress. Asian Pacific Journal, 2: 220-224.
- Alexieva, V., Sergei, 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 Environment, 24: 1337-1344.
- Bates, L.S., Waldern, R.P. and Tear, I.D., 1973. Rapid determination of free proline for water stress studies. Plant and Soil, 39: 205-207.
- Berek, A.K., Hue, N. and Ahmad, A., 2011. Beneficial use of biochar to correct soil acidity. The Food Provider, Available at www.ctahr.hawaii.edu/huen/nvh/biochar.
- Bradford, M.M., 1979. 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.
- 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.
- Darvizheh, H., Zahedi, M., Abbaszadeh, B., Razmjoo, J., 2019. Changes in some antioxidant enzymes and physiological indices of purple coneflower (*Echinacea purpurea* L.) in response to water deficit and foliar application of salicylic acid and spermine under field condition. Scientia Horticulturae, 247: 390-399.
- Davey, M.W., Stals, E., Panis, B., Keulemans, J. and Swennen, R.L., 2005. High throughput of malondialdehyde in plant tissues. Analytical Biochemistry, 347: 201-207.
- Dhindsa, R.S., Plumb-Dhindsa, P. and Thorpe, A., 1981. Leaf senescence: correlated with increased levels of membrane permeability and lipid peroxidation, and decreased levels of superoxide dismutase and catalase. Journal of Experimental Botany, 32: 93-101.
- Farhangi-Abriz, S. and Ghassemi-Golezani, K., 2022. The modified biochars influence nutrient and osmotic statuses and hormonal signaling of mint plants under fluoride and cadmium toxicities. Frontiers in Plant Scince, 13: 1064409.
- Fallaha, S., Malekzadeha, S. and Pessarakli, M., 2018. Seed priming improves seedling emergence and reduces oxidative stress in *Nigella sativa* under soil moisture stress. Journal of Plant Nutrition, 41: 29-40.
- Haj Seyed Hadi, M.R., Darzi, M.T. and Riazi, G.H., 2016. Black cumin (*Nigella sativa* L.) yield affected by irrigation and plant growth promoting bacteria. Journal of Medicinal Plants and By-products, 2: 125-133.
- Hasanuzzaman, M., Alam, M.M., Rahman, A., Hasanuzzaman, M., Nahar, K. and Fujita, M., 2014. Exogenous proline and glycine betaine mediated upregulation of antioxidant defense and glyoxalase systems provides better protection against salt-induced oxidative stress in two rice (*Oryza sativa* L.) varieties. BioMed Research International, 2014: 757219 doi: 10.1155/2014/757219.
- Hayat, S., Hayat, Q., Alyemeni, M.N., Wani, A.S., Pichtel, J. and Ahmad, A., 2012. Role of proline

potential for plant growth promotion and alleviation of chromium-induced phytotoxicity in Ficus elastica. Chemosphere, 243: 1-23.
- Laird, D.A., Fleming, P.D., Karlen, D.L., Wang, B. and Horton, R., 2010. Biochar impact on nutrient leaching from a Midwestern agricultural soil. Geoderma, 158: 436-442.
- Lehmann, J. and Joseph, S. 2015. Biochar for Environmental Management Science, Technology and Implementation Second Edition. Scientific Research Publishing, Routledge, New York, 977p.
- Liang, B., Lehmann, J., Solomon, D., Kinyangi, J., Grossman, J., O'Neill, B., Skjemstad, J.O., Theis, J., Luizao, F.J., Peterson, J. and Neves, E.G., 2006. Black carbon increases cation exchange capacity in soils. Soil Science Society of America Journal, 70: 1719-1730.
- Lim, T.J., Spokas, K.A., Feyereisen, G. and Novak, J.M., 2016. Predicting the impact of biochar additions on soil hydraulic properties. Chemosphere, 142: 136-144.
- Lotfi, R., Pessarakli, M., Gharavi-Kouchebagh, P. and Khoshvaghti, H., 2015. Physiological responses of *Brassica napus* to fulvic acid under water stress: chlorophyll a fluorescence and antioxidant enzyme activity. Crop Journal, 3: 434-439.
- Mac-Adam, J.W., Nelson, C.J. and Sharp, R.E., 1992. Peroxidase activity in the leaf elongation zone of tall fescue. Plant Physiology, 99: 872-878.
- Manavalan, p. and Nguyen, H.T., 2017. Drought Tolerance in Crops: Physiology to Genomics. Plant Stress Physiology, 2nd Edition Edited by Sergey Shabala. Boston, MA: CABI, 362p.
- 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.
- Naumann, G., Alfieri, L., Wyser, K., Mentaschi, L., Betts, R.A. and Carrao, H., 2018. Global changes in drought conditions under different levels of warming. Geophysical Research Letters, 45: 3285-3296.
- Páscoa, P., Gouveia, C.M., Russo, A. and Trigo, R.M., 2012. The role of drought on wheat yield interannual variability in the *Iberian Peninsula* from 1929 to 2012. International Journal of Biometeorology, 61(3): 439-451.
- Rahimzadeh, S. and Ghassemi-Golezani, K., 2022. Biochar-based nutritional nanocomposites altered nutrient uptake and vacuolar h+-pump activities of dill under salinity. Soil Science Plant Nutrient, 22: 3568-3581.
- Rezaei-Chiyaneh, E., Seyyedi, S., Ebrahimian, M., Siavash, E., Moghaddam, S. and Damalas, C.A., under changing environments. Plant Signaling and Behavior, 7(11): 1456-1466.
- Hayati, A., Rahimi, M., Kelidari, A. and Hosseini, M., 2021. Effects of humic acid and iron nanochelate on osmolytes content of black cumin (*Nigella sativa* L.) under drought stress conditions. Iranian Journal of Medicinal and AromaticPlants Research, 37(5): 809-821.
- Hedge, J.E. and Hofreiter, B.T., 1962. Carbohydrate chemistry: In R.L. Whistler, J.N. Be Miller, (Eds). Academic Press, New York, 1962p.
- Hertig, E. and Tramblay, Y., 2017. Regional downscaling of Mediterranean droughts under past and future climatic conditions. Global and Planetary Change, 151: 36-48.
- Hoerling, M., Eischeid, J., Perlwitz, J., Quan, X., Zhang, T. and Pegion, P., 2012. On the increased frequency of Mediterranean drought. Journal of Climate, 25: 2146-2161.
- Kabiri, R., Nasibi, F. and Farahbakhsh, H., 2014. Effect of exogenous salicylic acid on some physiological parameters and alleviation of drought stress in *Nigella sativa* plant under hydroponic culture. Plant Protection Science, 50: 43-51.
- Ghassemi-Golezani, K., Farhangi-Abriz, S., 2023. Biochar related treatments improved physiological performance, growth and productivity of *Mentha crispa* L. plants under fluoride and cadmium toxicities. Industrial Crops and Products, 194(1): 1-13.
- Khaleghi Gazik, S., Saffari, V.R. and Daneshvar, S., 2021. Effect of different levels of biochar, hydrochar and salicylic acid on the growth of *Calendula officinalis* L. Iranian Journal of Horticultural Science, 53(3): 553-566.
- KhasheiSiuki, A., Shahidi, A., Yaghoubzadeh, M. and Dastorani, M., 2019. Effect of Biochar Application and Irrigation Management on Yield and Yield Components Medicinal Plant *(Trachyspermum ammi*.). Journal of Irrigation and Drainage, 2: 319-328.
- Khatun, S., Babar Ali, M., Hahn, E.J. and Paek, K.Y., 2008. Copper toxicity in *Withania somnifera*: Growth and antioxidant enzymes responses of in vitro grown plants. Environmental and Experimental Botany, 64: 279-285.
- Kim, H.S., Kim, K.R., Yang, J.E., Ok, Y.S., Owens, G., Nehls, T., Wessolek, G. and Kim, K.H., 2016. Effect of biochar on reclaimed tidal land soil properties and maize (*Zea mays* L.) response. Chemosphere, 142: 153-159.
- Kumar, A., Joseph, S., Tsechansky, L., Schreiter, I., Schuth, C., Taherysoosavi, S., Mitchell, D. and Graber, E., 2019. Mechanistic evaluation of biochar

2018. Exogenous application of gamma-aminobutyric acid (GABA) alleviates the effect of water deficit stress in black cumin (*Nigella sativa* L.) Esmaeil. Industrial Crops and Products, 112: 741-748.
- Safahani, A. and Noora, R., 2018. Effect of different levels of biochar on physiological traits of pumpkin under water shortage stress. Plant Environmental Physiology Journal, 13(49): 13-32.
- Shahid, M., Pourrut, B., Dumat, C., Nadeem, M., Aslam, M. and Pinelli, E., 2014. Heavy-metal induced reactive oxygen species: phytotoxicity and physicochemical changes in plants. Reviews of Environmental Contamination and Toxicology, 232: 1-44.
- 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.
- Sun, Y., Geng, Q., Du, Y., Yang, X. and Zhai, H., 2017. Induction of cyclic electron flow around photosystem I during heat stress in grape leaves. Plant Science, 256: 65-71.
- Tiryaki, I., 2016. Drought stress and tolerance mechanisms in alfalfa (*Medicago sativa* L.). KSU Journal of Natural Science, 19: 296-305.
- Unyayar, S., Kele, Y. and Cekic, F.O., 2005. The antioxidative response of two tomato species with different drought tolerances as a result of drought and cadmium stress combinations. Plant Soil Environment, 51(2): 57-64.
- Verbruggen, N. and Hermans, C., 2008. Proline accumulation in plants: a review. Amino acids, 35: 753-759.
- Zaki, R.N. and Radwan, T.E., 2011. Improving wheat grain yield and its quality under salinity conditions at a newly reclaimed soil by using different organic sources as soil or foliar applications. Journal of Applied Science Research, 7: 42-55.

Effects of biochar and drought stress on some protective mechanisms of *Nigella sativa* L.

H. Kiani[1], Sh. Khalesro[*2], A. Mokhtassi-Bidgoli[3] and Z. Sharifi[4]

1- Ph.D. student, Department of Plant Production and Genetics, Faculty of Agriculture, University of Kurdistan, Sanandaj, Iran
2*- Corresponding author, Department of Plant Production and Genetics, Faculty of Agriculture, University of Kurdistan, Sanandaj, Iran, Email: sh.khalesro@uok.ac.ir
3- Department of Agronomy, Faculty of Agriculture, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
4- Department of Soil Science, Faculty of Agriculture, University of Kurdistan, Sanandaj, Iran

Received: November 2022 Revised: May 2023 Accepted: May 2023

Abstract

Nigella sativa L. is a valuable medicinal plant that is widely used in different industries. Accumulation of compatible osmolytes is one of the common responses of plants under drought stress. To investigate the effects of irrigation regimes and biochar (resulting from the heating of cattle manure) on *N. sativa*, a factorial experiment was conducted in a completely randomized design with three replications in the greenhouse of the Faculty of Agriculture at the University of Kurdistan in 2018. The experimental factors consisted of three drought stress levels (40, 70, and 100% of FC) and two biochar use levels (0 and 15 tons.ha^{-1}). The ANOVA results showed that the interaction effects of drought stress and biochar were significant on hydrogen peroxide, malondialdehyde, superoxide dismutase, peroxidase, proline, soluble carbohydrates (water and ethanol soluble), and osmotic potential. Increasing the intensity of drought stress enhanced the amount of hydrogen peroxide, malondialdehyde, superoxide dismutase, peroxidase, proline, and soluble carbohydrates (water and ethanol soluble) and caused the osmotic potential to become more negative. Biochar application decreased the negative effects of drought stress so that hydrogen peroxide, malondialdehyde, superoxide dismutase, peroxidase, proline, and soluble carbohydrates (water and ethanol soluble) amounts were lower than the treatments without biochar. Overall, the present research results proved the useful and effective role of biochar in improving the physiological traits and protective osmolytes of *N. sativa* under drought stress.

Keywords: Antioxidant enzymes, compatible osmolytes, proline, oxidative stress, water deficiency.