

## اثر تنش خشکی بر خصوصیات فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی گیاه سیاه‌دانه (*Nigella sativa* L.)

رزیتا کبیری<sup>۱</sup>، حسن فرح‌بخش<sup>۲\*</sup> و فاطمه نصیبی<sup>۳</sup>

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه زراعت، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید باهنر کرمان

۲- نویسنده مسئول، دانشیار، گروه گیاهان دارویی، پژوهشکده باغبانی، دانشگاه شهید باهنر کرمان. پست الکترونیک: hfarahbakhsh@yahoo.com

۳- استادیار، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه شهید باهنر کرمان

تاریخ پذیرش: آذر ۱۳۹۱

تاریخ اصلاح نهایی: آذر ۱۳۹۱

تاریخ دریافت: اسفند ۱۳۹۰

### چکیده

به منظور بررسی اثر تنش خشکی ناشی از پلی اتیلن گلاکول بر برخی پارامترهای فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی شامل وزن خشک اندام هوایی، نشت یونی، محتوی نسبی آب برگ، رنگیزه‌های فتوسنتزی (کلروفیل a، b، کل و کاروتنوئیدها)، مالون‌دآلدئید و سایر آلدئیدها، آنتوسیانین‌ها، ترکیب‌های پلی‌فنلی، فلاونوئیدها، فعالیت آنزیم فنیل‌آلانین آمونیا لیاز، محتوی قندهای محلول و پروتئین در گیاه دارویی سیاه‌دانه (*Nigella sativa* L.)، آزمایشی در سال ۱۳۹۰ در آزمایشگاه تحقیقاتی دانشگاه شهید باهنر کرمان در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار و در شرایط کشت هیدروپونیک انجام شد. تیمارهای آزمایشی شامل تنش خشکی در سطوح صفر، ۲۰٪، ۴۰٪ و ۶۰٪ مگاپاسکال بودند. نتایج نشان داد که تنش خشکی باعث کاهش معنی‌دار وزن خشک اندام هوایی، محتوی نسبی آب برگ، رنگیزه‌های فتوسنتزی، آنتوسیانین‌ها، ترکیب‌های پلی‌فنلی، فلاونوئیدها و پروتئین و افزایش نشت یونی، مقدار مالون‌دآلدئید و سایر آلدئیدها، فعالیت آنزیم فنیل‌آلانین آمونیا لیاز و محتوی قندهای محلول گردید. براساس نتایج بدست آمده به نظر می‌رسد که این گیاه در برابر تنش خشکی حساس بوده، بنابراین بکار بردن ترکیب‌های حفاظتی خارجی می‌تواند ظرفیت آنتی‌اکسیدانی این گیاه را در برابر شرایط تنش افزایش دهد.

واژه‌های کلیدی: سیاه‌دانه (*Nigella sativa* L.)، آنتوسیانین، پلی‌فنل‌ها، فلاونوئیدها، آنزیم فنیل‌آلانین آمونیا لیاز.

### مقدمه

کم‌آبی از تنش‌های مهم محیطی است که تولید گیاهان را محدود می‌کند. تطابق با کم‌آبی نتیجه یک سری واکنش‌های بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی است که به حفظ آب، کلروپلاست و نگهداری هموستازی یون‌ها کمک می‌کند. تنش خشکی مانع فتوسنتز گیاه و باعث تغییر در محتوای کلروفیل و خسارت به دستگاه فتوسنتزی می‌شود. این تنش همچنین فعالیت فتوشیمیایی را باز داشته و فعالیت آنزیم‌های چرخه کلوین را کاهش می‌دهد (Monakhova & Chernyad'ev, 2002). یکی از تغییرات بیوشیمیایی که در گیاه تحت تنش ایجاد می‌شود، تجمع گونه‌های فعال اکسیژن است که محصول اجتناب‌ناپذیر متابولیسم طبیعی سلول

است. کلروپلاست و میتوکندری سلول‌های گیاهی از مهمترین تولیدکننده‌های گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) هستند. الکترون‌های نشت کرده از زنجیره انتقال الکترون می‌توانند با اکسیژن مولکولی حاصل از متابولیسم طبیعی گیاه ترکیب شده و تولید گونه‌های فعال اکسیژن مثل سوپراکسید، هیدروژن پراکسید و رادیکال هیدروکسیل کنند. این گونه‌های اکسیژن سمی و بسیار واکنش‌پذیرند و در غیاب سازوکارهای حفاظتی می‌توانند متابولیسم طبیعی سلول را به میزان زیادی مختل کنند (Sharma & Dubey, 2005). این رادیکال‌ها از طریق پراکسیداسیون لیپیدها و در نتیجه تخریب غشاء، تخریب پروتئین‌ها (Moran et al., 1994)، غیرفعال کردن آنزیم‌ها، از بین بردن رنگیزه‌ها و اختلال در

شامل ۴ تیمار و بدین صورت تعداد کل واحدهای آزمایشی برابر ۱۲ بود.

#### نحوه اعمال تیمارها

گیاهان پس از ۴ هفته رشد برای اعمال تیمار از گلدانها خارج شدند و در ظرفهای حاوی محلول غذایی هوگلند (Ingle et al., 2005) 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 محلولهای پلی اتیلن گلیکول ۶۰۰۰ (PEG<sub>6000</sub>) 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 اندازه گیریهای بعدی در فریزر ۸۰- درجه سانتیگراد قرار داده شدند.

#### وزن خشک

وزن خشک اندام هوایی بعد از خشکاندن نمونهها در آون در دمای ۷۰ درجه سانتیگراد به مدت ۴۸ ساعت و با استفاده از ترازوی دیجیتال دقیق اندازه گیری شد. نتایج برحسب میلی گرم محاسبه و ارائه گردید.

#### نشت یونی

برای سنجش میزان آسیب به غشاء، میزان نشت یونی از روش Hamed و همکاران (۲۰۰۷) استفاده شد. ۰/۲ گرم از بافت سالم و تازه اندام هوایی گیاه را بعد از شستشو با آب مقطر برای شستشوی یونهای احتمالی از سطح گیاه، درون لوله آزمایش در پیچدار قرار داده و ۱۰ میلی لیتر آب یونگیری شده به آن اضافه گردید. سپس لولههای آزمایش را به مدت ۲ ساعت درون حمام آب گرم با دمای ۳۲ درجه سانتیگراد قرار داده و میزان هدایت الکتریکی نمونهها (EC<sub>1</sub>) با استفاده از EC متر (مدل Winlab Data Windaus) اندازه گیری شد. سپس لولههای آزمایش در دمای ۱۲۱ درجه سانتیگراد و فشار یک اتمسفر به مدت ۲۰ دقیقه اتوکلاو گردیده و بعد از خنک شدن لولهها تا

عملکرد DNA ایجاد تنش ثانویه اکسیداتیو کرده که منجر به خسارتهای جدی به ساختارهای سلولی و گیاه می گردند (Tian & Li, 2006). گیاهان در مقابله با تنش خشکی سازوکارهای حفاظتی متفاوتی را در پیش می گیرند که از آن جمله می توان به تجمع اسمولیت هایی مثل پرولین و قندهای محلول و سازوکارهای آنزیمی و غیر آنزیمی در برابر تنش اکسیداتیو ناشی از خشکی (Tian & Li, 2006؛ Yamasaki et al., 1997) اشاره کرد.

با وجود تحقیقات نسبتاً زیاد و مفصلی که در مورد اثر تنش خشکی بر روی محصولات زراعی شده است، این گونه تحقیقات در مورد گیاهان دارویی کمتر انجام شده است. سیاه دانه با نام علمی *Nigella sativa* از خانواده آلاله، گیاهیست دولپه، علفی، یکساله و بومی غرب آسیا که در بیشتر نواحی اروپا، آسیا و ایران می روید (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 لته و شیرآور می باشد (Salem, 2005).

ارزیابی تحمل به خشکی گیاهان دارویی به منظور کشت در مناطق خشک از اهمیت ویژه ای برخوردار است. در ایران در سالهای اخیر کشت گیاهان دارویی از جمله سیاه دانه مورد توجه قرار گرفته است و با توجه به مشکل کمبود آب و ناکارآمدی روشهای استفاده از آن به ویژه در نواحی خشک و نیمه خشک، این آزمایش با هدف بررسی اثرات تنش خشکی بر روی پارامترهای اکسیداتیو ناشی از این تنش محیطی در گیاه سیاه دانه انجام شده است.

#### مواد و روشها

این آزمایش در سال ۱۳۹۰ در آزمایشگاه دانشگاه شهید باهنر کرمان اجرا شد. گیاه مورد مطالعه در این پژوهش، گیاه سیاه دانه (*Nigella sativa*) بود. بذرهای گیاه سیاه دانه در گلدانهای حاوی شن کشت گردید و روزانه آبیاری شدند. پس از اینکه برگهای لپه ای کاملاً توسعه پیدا کردند، هفته ای یک بار با محلول غذایی با رقت ۱/۲ آبیاری شدند. گیاهان پس از ۴ هفته رشد برای اعمال تیمار در محیط کشت هیدروپونیک مورد استفاده قرار گرفتند. آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۳ تکرار اجرا شد. آزمایش

به مدت ۲۴ ساعت در دمای اتاق قرار داده شد و بعد به مدت ۱۰ دقیقه در  $2000 \times g$  سانتریفوژ گردید. از محلول رویی برای سنجش فنل‌های محلول استفاده شد. برای محاسبه غلظت فنل‌های محلول از منحنی استاندارد گالیک اسید استفاده گردید و نتایج بر حسب میلی‌گرم بر گرم وزن تر ارائه شد.

#### سنجش مقدار فلاونوئیدها

اندازه‌گیری فلاونوئیدها به روش اسپکتروفوتومتری با استفاده از روش Krizek و همکاران (۱۹۹۸) انجام شد.  $0/1$  گرم از اندام هوایی گیاه در هاون چینی با  $10$  میلی‌لیتر اتانول اسیدی (الکل اتیلیک و اسید استیک گلاسیال به نسبت حجمی ۱:۹۹) ساییده شده و پس از سانتریفوژ عصاره به مدت ده دقیقه در حمام آب گرم با دمای  $80$  درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. شدت جذب در طول موج‌های  $270$ ،  $300$  و  $330$  نانومتر خوانده شد. نتایج بر حسب درصد جذب گزارش گردید.

#### سنجش مقدار آنتوسیانین‌ها

از روش Wanger (۱۹۷۹) جهت اندازه‌گیری مقدار آنتوسیانین‌های اندام هوایی استفاده شد.  $0/1$  گرم از اندام هوایی را در هاون چینی با  $10$  میلی‌لیتر متانول اسیدی (متانول خالص و اسید کلریدریک خالص به نسبت حجمی ۱:۹۹) کاملاً ساییده و عصاره در لوله‌های آزمایش سرپیچ‌دار ریخته شد و به مدت  $24$  ساعت در تاریکی و دمای  $25$  درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. سپس به مدت  $10$  دقیقه در  $4000 \times g$  سانتریفوژ و جذب محلول بالایی در طول موج  $550$  نانومتر اندازه‌گیری شد. محاسبه غلظت با استفاده از ضریب خاموشی  $M^{-1}cm^{-1}$   $33000$  انجام و نتایج بر حسب میکرومول بر گرم وزن تر ارائه گردید.

سنجش فعالیت آنزیم فنیل‌آلانین آمونیلایز (PAL) (EC 4.3.1.5)

$0/5$  گرم از برگ منجمد شده در بافر فسفات پتاسیم  $50$  میلی‌مولار ( $pH=7$ ) حاوی پلی‌وینیل پیرولیدون  $1\%$  و EDTA یک میلی‌مولار همگن گردیدند. هم‌ژنه حاصل در  $2000 \times g$  به مدت  $20$  دقیقه سانتریفوژ گردید و عصاره رویی برای سنجش آنزیم‌های مورد نظر و مقدار

دمای  $25$  درجه سانتی‌گراد، میزان هدایت الکتریکی نمونه‌ها ( $EC_2$ ) مجدداً اندازه‌گیری شد و با فرمول زیر درصد نشت یونی محاسبه گردید.

$$\text{درصد نشت یونی} = \frac{EC_1}{EC_2} \times 100$$

#### اندازه‌گیری محتوی نسبی آب برگ

$0/1$  گرم از بافت برگ با ترازوی دقیق آزمایشگاهی با دقت  $0/0001$  وزن شد (FW). سپس بافت برگ در ظروف پتری حاوی آب مقطر برای مدت  $4-5$  ساعت غوطه‌ور گردید. در طول این مدت ظروف پتری در نور قرار داشتند. سپس نمونه‌ها از پتری خارج شده و با استفاده از کاغذ صافی خشک گردیدند، دوباره وزن شدند تا وزن حالت تورژسانس کامل (TW) بدست آید. برای محاسبه وزن خشک (DW) بافت‌های برگ درون فویل آلومینیوم پیچیده شدند و به مدت  $24$  ساعت در دمای  $70^\circ C$  در آون قرار داده شدند و بعد وزن گردیدند. محتوای نسبی آب برگ از رابطه زیر محاسبه شد (Wheatherley, 1950).

$$RWC = \frac{Fw - Dw}{Tw - Dw} \times 100$$

#### اندازه‌گیری محتوی رنگیزه‌های فتوسنتزی

سنجش میزان کلروفیل بر طبق روش Lichtenthaler (۱۹۸۷) انجام گردید.

#### سنجش میزان پراکسیداسیون لیپیدها

برای سنجش میزان پراکسیداسیون لیپیدها، غلظت مالون‌دآلدئید (MDA) و سایر آلدئیدها اندازه‌گیری شد. برای محاسبه غلظت MDA در طول موج  $532$  نانومتر از ضریب خاموشی معادل  $M^{-1}cm^{-1}$   $1/55 \times 10^5$  (Heath & Packer, 1968) و برای سایر آلدئیدها در طول موج  $455$  از ضریب خاموشی معادل  $M^{-1}cm^{-1}$   $0/457 \times 10^5$  (Meir *et al.*, 1992) استفاده شد. نتایج حاصل از اندازه‌گیری بر حسب میکرومول بر گرم وزن تر محاسبه و ارائه گردید.

#### سنجش مقدار پلی‌فنل‌ها

محتوای فنل‌های محلول کل با استفاده از معرف فولین اندازه‌گیری شد (Gao *et al.*, 2000).  $0/1$  گرم از بافت گیاهی در  $1$  میلی‌لیتر اتانول  $80\%$  ساییده شد. عصاره حاصل

## نتایج

وزن خشک اندام هوایی

نتایج نشان داد که این صفت تحت تأثیر تیمار خشکی (۰/۰۱)  $p \leq$  قرار گرفت (جدول ۱). تیمارهای خشکی ۰/۴- و ۰/۶- مگاپاسکال بدون اختلاف با یکدیگر، از نظر آماری تفاوت معنی‌داری را با تیمار خشکی ۰/۲- مگاپاسکال و شاهد نشان دادند. در بالاترین سطح خشکی، وزن خشک اندام هوایی حدود ۶۲/۶٪ در مقایسه با شاهد کاهش نشان داد (جدول ۳).

پراکسیداسیون لیپیدهای غشایی و نشت یونی

مقدار مالون‌دآلدهید (MDA) و سایر آلدئیدها به‌عنوان شاخص پراکسیداسیون لیپید در این تحقیق اندازه‌گیری شد. نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که تنش خشکی باعث افزایش میزان پراکسیداسیون لیپیدهای غشاء می‌شود و این افزایش از نظر آماری معنی‌دار بود (جدول ۲). بیشترین و کمترین مقدار MDA به ترتیب متعلق به تیمار خشکی ۰/۶- مگاپاسکال و تیمار شاهد بود (جدول ۴). البته کلیه سطوح خشکی با تیمار شاهد اختلاف معنی‌داری را نشان دادند. افزایش مقدار MDA در سطح خشکی ۰/۶- مگاپاسکال نسبت به گیاهان شاهد ۶۵/۹٪ بود (جدول ۴). مقدار سایر آلدئیدها همانند MDA، با افزایش خشکی افزایش معنی‌داری را نشان داد (جدول ۴). تیمار ۰/۴- مگاپاسکال بدون اختلاف معنی‌دار با تیمارهای خشکی ۰/۲- و ۰/۶- مگاپاسکال، تفاوت معنی‌داری را با شاهد نشان داد. در غلظت ۰/۶- مگاپاسکال، مقدار سایر آلدئیدها حدود ۶۳/۷٪ در مقایسه با شاهد افزایش نشان داد (جدول ۴).

برای بررسی اثر تنش خشکی بر نفوذپذیری غشاء، درصد نشت یونی اندازه‌گیری شد. نتایج نشان داد که تنش خشکی باعث افزایش نشت یون به فضای خارج سلولی گردید (جدول ۱). در بالاترین سطح خشکی، میزان نشت یونی ۶۶٪ نسبت به شاهد افزایش معنی‌داری را نشان داد (جدول ۳).

محتوی نسبی آب برگ

نتایج نشان داد که محتوی نسبی آب برگ، تحت تأثیر تیمار خشکی (۰/۰۱)  $p \leq$  قرار گرفت (جدول ۱). محتوی

پروتئین برداشته شد. فعالیت آنزیم PAL براساس مقدار تبدیل فنیل‌آلانین به سینامیک اسید اندازه‌گیری شد. مخلوط واکنش حاوی بافر Tric-Hcl ۱۰۰ میلی‌مولار (pH= ۸/۵)، بتامرکاتواتانل ۱ میلی‌مولار، L- فنیل‌آلانین ۵۰ میلی‌مولار و ۱۰۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی بود. مخلوط واکنش به مدت ۱۵ دقیقه در ۳۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. واکنش با اضافه کردن اسید کلریدریک ۶ مولار خاتمه یافت و جذب محلول شفاف در ۲۹۰ نانومتر خوانده شد. هر واحد آنزیمی معادل با مقدار آنزیمی است که باعث تبدیل یک میکرومولار سوپسترا به سینامیک اسید در یک دقیقه می‌شود (D'cunha et al., 1996).

اندازه‌گیری مقدار قندهای محلول

محتوای قند محلول نمونه‌ها با استفاده از معرف آنترون و براساس روش Roe (۱۹۵۵) تعیین گردید. ۰/۱ گرم بافت تر برگ در ۲/۵ میلی‌لیتر اتانول ۸۰٪ در دمای ۹۵°C به مدت ۶۰ دقیقه قرار گرفت و کربوهیدرات‌های محلول استخراج شدند. عصاره حاصل با استفاده از کاغذ صافی صاف و بعد الکل آن تبخیر شد. رسوب حاصل در ۲/۵ میلی‌لیتر آب مقطر حل گردید. ۲۰۰ میکرولیتر از هر نمونه در یک لوله آزمایش ریخته شد و ۵ میلی‌لیتر معرف آنترون به آن اضافه گردید. پس از مخلوط شدن به مدت ۱۷ دقیقه در بن‌ماری ۹۰°C قرار گرفت و پس از سرد شدن، جذب نمونه‌ها در ۶۲۵ نانومتر خوانده شد. برای محاسبه مقدار قند از منحنی استاندارد گلوکز استفاده شد.

سنجش مقدار پروتئین کل

محتوای پروتئین کل با روش برادفورد و استفاده از آلبومین گاوی به‌عنوان استاندارد اندازه‌گیری شد (Bradford, 1976).

آنالیز آماری

آنالیز داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار آماری SAS و مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون LSD در سطح احتمال ۵٪ انجام شد.

نتایج حاصل از اندازه‌گیری مقدار آنتوسیانین‌ها نشان داد که تنش خشکی (در سطوح بالا) باعث کاهش مقدار این رنگیزه‌ها گردیده‌است. مقدار آنتوسیانین در تیمار خشکی ۰/۶- مگاپاسکال حدود ۵۶/۸٪ در مقایسه با تیمار شاهد کاهش نشان داد (جدول ۴).

اندازه‌گیری فعالیت آنزیم فنیل‌آلانین آمونیلایز (PAL) در گیاه سیاه‌دانه نشان داد که فعالیت این آنزیم در تمامی سطوح خشکی افزایش معنی‌داری نسبت به گیاهان شاهد داشت. به طوری که بیشترین مقدار فعالیت این آنزیم متعلق به سطح خشکی ۰/۶- مگاپاسکال بود که نسبت به شاهد افزایش ۸۴/۵ درصدی را نشان داد (جدول ۴).

#### محتوی قندهای محلول

تغییرات مقدار قندهای محلول بین سطوح مختلف خشکی معنی‌دار ( $p \leq 0/01$ ) بود (جدول ۲). نتایج حاصل از اندازه‌گیری مقدار قندهای محلول در جدول ۴ آورده شده‌است. این نتایج نشان داد که مقدار قندهای محلول تحت تنش خشکی افزایش یافت. تنش خشکی در سطح ۰/۶- مگاپاسکال، باعث افزایش مقدار کربوهیدرات‌های محلول به میزان ۵۴/۵٪ نسبت به شاهد گردید (جدول ۴).

#### پروتئین

واکنش مقدار پروتئین‌های محلول به سطوح خشکی معنی‌دار بود (جدول ۲). به طوری که با افزایش در سطوح خشکی این شاخص به طور معنی‌داری کاهش یافت و کلیه سطوح با یکدیگر تفاوت داشتند (جدول ۴). بیشترین کمترین مقدار این صفت به ترتیب متعلق به تیمار شاهد و تیمار ۰/۶- مگاپاسکال بود و کاهش در این شاخص در تیمار ۰/۶- مگاپاسکال نسبت به شاهد ۴۴/۹٪ بود.

نسبی آب برگ با افزایش سطح خشکی، رابطه معکوس داشت و هر چه میزان خشکی در محیط ریشه افزایش یافت، درصد آب برگ کاهش معنی‌داری پیدا کرد (جدول ۳). تیمارهای خشکی ۰/۴- و ۰/۶- مگاپاسکال بدون اختلاف با یکدیگر، از نظر آماری تفاوت معنی‌داری را با تیمار خشکی ۰/۲- مگاپاسکال و شاهد نشان دادند.

#### رنگیزه‌های فتوسنتزی

اختلاف بین سطوح مختلف خشکی از نظر مقدار کلروفیل b و کاروتنوئیدها معنی‌دار ( $p \leq 0/05$ ) بود. اما از نظر مقدار مقدار کلروفیل a و کلروفیل کل اختلاف معنی‌داری مشاهده نگردید (جدول ۱).

تنش خشکی (۰/۶- مگاپاسکال) مقدار کلروفیل a، کلروفیل b، کلروفیل کل و کاروتنوئیدها را به ترتیب حدود ۳۴٪، ۳۳٪، ۳۳٪/۷۵ و ۲۱/۷۳٪ نسبت به گیاهان شاهد کاهش داد (جدول ۳). به هر حال بیشترین مقدار رنگیزه‌های فتوسنتزی متعلق به تیمار شاهد بود و با افزایش خشکی، مقدار این رنگیزه‌ها کاهش یافت (جدول ۳).

ترکیب‌های پلی‌فنلی، فلاونوئیدها، آنتوسیانین‌ها و فعالیت آنزیم

#### PAL

همان‌طور که در جدول ۴ مشاهده می‌شود تیمار خشکی با پتانسیل ۰/۲- مگاپاسکال تأثیر معنی‌داری بر مقدار پلی‌فنل‌ها و درصد جذب فلاونوئیدها نداشت اما با افزایش سطح خشکی این ترکیب‌ها کاهش معنی‌داری نسبت به شاهد نشان دادند (جدول ۴). پتانسیل‌های ۰/۴- و ۰/۶- مگاپاسکال باعث کاهش معنی‌دار ترکیب‌های پلی‌فنلی در مقایسه با گیاهان شاهد شده‌است. به طوری که تنش خشکی در این پتانسیل‌ها، ترکیب‌های فنلی کل را حدود ۲۶/۹٪ نسبت به شاهد کاهش داد.

جدول ۱- نتایج تجزیه واریانس صفات فیزیولوژیکی مربوط به اثر سطوح مختلف خشکی در گیاه سیاه‌دانه

میانگین مربعات					منبع تغییر	درجه آزادی	وزن خشک اندام هوایی	نشت یونی	محتوی نسبی آب برگ	کلروفیل a	کلروفیل b	کلروفیل کل	کاروتنوئیدها
خشکی	۳	۱۸/۵۵ ***	۱۴۴۵/۵ ***	۶۴۲/۵ ***	۴/۲ ns	۰/۶۳ *	۸/۰۵ ns	۰/۱۷ *					
خطا	۸	۰/۲۴۷	۱۳/۶	۷/۲	۲/۱۷	۰/۱۲	۲/۷۸	۰/۰۳					

\*\*\*، \*\* و ns به ترتیب معنی‌دار در سطح احتمال ۵٪، ۱٪ و بدون اختلاف معنی‌دار

ول ۲- نتایج تجزیه واریانس صفات بیوشیمیایی مربوط به اثر سطوح مختلف خشکی در گیاه سیاه‌دانه

میانگین مربعات								
پروتئین	محتوی قندهای محلول	آنزیم PAL	آنتوسیانین	جذب ۳۳۰ نانومتر	جذب ۳۰۰ نانومتر	جذب ۲۷۰ نانومتر	ترکیبات پلی‌فنلی	سایر هیدها
۳۹۵/۱ **	۱۵۰۹/۱۲ **	۸۲۳/۹۲ **	۲/۷ **	۴۶/۳۸ *	۲۸/۴۳ *	۶۸/۸ ns	۳/۶۵ *	۲/۴۱
۵/۹	۳۵/۲	۸/۷	۰/۰۶	۹/۰۸	۴/۲۸	۲۷/۹	۰/۶	۰/۱

و بدون اختلاف معنی‌دار

جدول ۳- مقایسه میانگین اثر تنش خشکی بر برخی پارامترهای فیزیولوژیکی گیاه سیاه‌دانه

کاروتنوئیدها (mg.gFW <sup>-1</sup> )	کلروفیل کل (mg.gFW <sup>-1</sup> )	کلروفیل b (mg.gFW <sup>-1</sup> )	کلروفیل a (mg.gFW <sup>-1</sup> )	محتوی نسبی آب برگ (%)	نشت یونی (%)	ام‌هواایی (mg)
۲/۶۱۸ a	۱۱/۳۵ a	۳/۲۰۶ a	۸/۱۵۲ a	۸۶/۸ a	۲۴/۶ c	۸
۲/۴۵۰ a	۱۰/۴۶ ab	۲/۹۸۶ a	۷/۴۷۷ ab	۶۹/۳ b	۶۲/۱ b	۶
۲/۳۷۷ ab	۹/۷۵ ab	۲/۸۴۴ a	۶/۹۰۹ ab	۵۷/۵ c	۶۸/۸ ab	۴
۲/۰۴۹ b	۷/۵۳ b	۲/۱۴۷ b	۵/۳۷۷ b	۵۴/۵ c	۷۲/۲ a	۲

ه از نظر آماری اختلافی ندارند.

جدول ۴- مقایسه میانگین اثر تنش خشکی بر برخی پارامترهای بیوشیمیایی گیاه سیاه‌دانه

پروتئین (mg.gFW <sup>-1</sup> )	قندهای محلول (mg.gFW <sup>-1</sup> )	فعالیت آنزیم PAL (U.mg Protein <sup>-1</sup> )	آنتوسیانین (μmol.gFW <sup>-1</sup> )	فلاونوئیدها (۳۳۰ nm)	فلاونوئیدها (۳۰۰ nm)	فلاونوئیدها (۲۷۰ nm)	ترکیب‌های پلی‌فنلی (mg.gFW <sup>-1</sup> )	لد‌هیدها (μmol.g)
۶۰/۳۵ a	۴۲/۶۸ c	۶/۹۴ d	۴/۰۳ a	۲۱/۱۸ a	۱۶/۶۳ a	۲۵/۸۹ a	۸/۵۶ a	۱/۱۲
۴۵/۳۸ b	۸۰/۹ b	۱۹/۷۲ c	۲/۸۹ b	۱۶/۰۷ ab	۱۶/۱۱ a	۱۷/۳۰ ab	۷/۴۶ a	۲/۲۷
۴۰/۳۸ c	۸۳/۹۷ ab	۳۵/۱۹ b	۲/۵۸ b	۱۳/۲۳ b	۱۱/۵۱ b	۱۶/۵۸ ab	۶/۳۴ b	۲/۹۰
۳۳/۲۵ d	۹۳/۷۱ a	۴۴/۳۸ a	۱/۷۴ c	۱۲/۵۳ b	۱۰/۶۵ b	۱۵/۴۴ b	۶/۱۹ b	۳/۱۵

ه از نظر آماری اختلافی ندارند.

## بحث

در شرایط طبیعی بین میزان تولید ROS و فعالیت مکانیسم‌های از بین برنده ROS تعادل وجود دارد، اما در تنش‌های زیستی و غیرزیستی این تعادل به هم می‌خورد و موجب تنش اکسیداتیو در گیاهان می‌گردد (Sharma & Dubey, 2005). گیاهان برای مقاومت در برابر تنش اکسیداتیو ایجاد شده توسط تنش‌های محیطی نظیر خشکی یا شوری باید از سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی آنزیمی یا غیرآنزیمی استفاده نمایند. گزارش‌های بسیاری وجود دارد که بیان‌کننده افزایش تنش اکسیداتیو در هنگام تنش خشکی و شوری و به تبع آن افزایش سیستم دفاع آنتی‌اکسیدان می‌باشد (Hamed *et al.*, 2007). ایجاد تنش اکسیداتیو ناشی از خشکی در چندین گونه گیاهی مثل نخود (Moran *et al.*, 1994) و گندم (Sgherri *et al.*, 2000) گزارش شده‌است. اصلی‌ترین علت اثرات تخریبی و مضر ROS توانایی آنها برای شروع واکنش‌های زنجیره‌ای اتواکسیداتیو اسیدهای چرب غیراشباع است که منجر به پراکسیداسیون لیپید و تخریب غشاء می‌شود (Sharma & Dubey, 2005). غشاء سلولی یکی از هدف‌های اولیه بسیاری از تنش‌های محیطی از جمله خشکی محسوب می‌شود و حفظ تمامیت و ثبات غشاء، تحت تنش خشکی یکی از نشانه‌های تحمل به خشکی است. در اثر آسیب‌پذیری غشای سیتوپلاسمی محتویات سلول به بیرون تراوش کرده که مقدار این خسارت را می‌توان با اندازه‌گیری مقدار نشت یونی تعیین نمود (Hamed *et al.*, 2007).

در این آزمایش تنش خشکی نشت یونی (جدول ۳)، مقدار مالون‌دآلدئید (جدول ۴) و سایر آلدئیدها (جدول ۴) را افزایش داد. گزارش‌های متعددی نشان می‌دهند که در تنش خشکی یا شوری مقدار پراکسیداسیون لیپیدها و نشت یونی در گیاهان حساس به این تنش‌ها بیشتر از گیاهان مقاوم است (Juan *et al.*, 2005). بنابراین به نظر می‌رسد افزایش پراکسیداسیون لیپید یا نشت یونی در گیاه مورد مطالعه در شرایط تنش خشکی ناشی از افزایش تولید گونه‌های فعال اکسیژن در شرایط تنش اکسیداتیو باشد که حذف، جاروب کردن و یا خاموش نمودن آنها خارج از توان گیاه بوده‌است و نشان می‌دهد که مکانیسم‌های دفاعی ایجاد شده در گیاه در مقابل تنش اکسیداتیو کافی نبوده‌است. وزن خشک اندام هوایی تحت تیمار خشکی کاهش

یافت (جدول ۳). چنین به نظر می‌رسد که کاهش وزن خشک اندام هوایی گیاه سیاه‌دانه، نتیجه اختلال در رشد، کاهش برگ و از بین رفتن سطح فتوسنتزکننده باشد. اندازه‌گیری محتوای نسبی آب برگ یکی از شاخص‌هایی است که مقاومت گیاه به تنش خشکی را تخمین می‌زند. در این آزمایش، درصد آب برگ در گیاه مورد بررسی در تنش اسمزی کاهش یافت (جدول ۳). محققان بسیاری با بررسی گیاهان مختلف اظهار داشتند که محتوای نسبی آب برگ می‌تواند به‌عنوان شاخص سنجش میزان تنش مورد استفاده قرار گیرد (Good & Zaplachinski, 1994). کاهش مقدار آب بافت در شرایط تنش خشکی، به دلیل کاهش میزان آب در محیط یا منفی شدن پتانسیل آبی محیط است. برای ادامه ورود آب به سلول، سلول‌ها باید پتانسیل آبی خود را از محیط اطراف منفی‌تر نمایند که می‌تواند با کمک اسمولیت‌ها (ترکیب‌های اسمزی نظیر قندها و پروتئین و ...) این کار را انجام دهند. اما به نظر می‌رسد در این آزمایش، اسمولیت‌ها نیز این گیاه را قادر به غلبه بر اثرات اسمزی حاصل از PEG نکرده‌اند، بنابراین درصد آب بافت در گیاهان تحت تنش اسمزی کاهش یافته‌است (جدول ۳).

تنش خشکی در سطح بالا (۶/۰ - مگاپاسکال)، موجب کاهش مقدار کلروفیل a, b، کلروفیل کل و کاروتنوئیدها در گیاه سیاه‌دانه گردید (جدول ۳). کاهش مقدار رنگیزه‌های فتوسنتزی در شرایط تنش خشکی و شوری می‌تواند عمدتاً به دلیل تخریب ساختمان کلروپلاست و دستگاه فتوسنتزی، فتواکسیداسیون کلروفیل‌ها، واکنش آنها با اکسیژن یکتایی، تخریب پیش‌ماده‌های سنتز کلروفیل و ممانعت از بیوسنتز کلروفیل‌های جدید و فعال شدن آنزیم‌های تجزیه‌کننده کلروفیل از جمله کلروفیلاز و اختلالات هورمونی باشد (Sultana *et al.*, 1999). کاهش مقدار کاروتنوئید در شرایط تنش نیز احتمالاً به علت تجزیه بتاکاروتن و تشکیل زآزانتین در چرخه زانتوفیل می‌باشد (Sultana *et al.*, 1999).

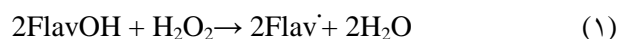
ترکیب‌های فنلی، آنتوسیانین‌ها و فلاونوئیدها از مسیر فنیل‌پروپانوئید سنتز می‌شوند. این متابولیت‌های ثانویه می‌توانند به‌عنوان آنتی‌اکسیدان، خاموش‌کننده و یا جاروب‌کننده گونه‌های فعال اکسیژن در گیاهان عمل کنند (Syvacy & Sokmen, 2004). ترکیب‌های فنلی به‌عنوان

اکسیژن یکتایی یا تجزیه پراکسیدها، این ترکیب‌های سلول‌ها را علیه تکثیر زنجیره پی در پی اکسیداسیون و گونه‌های فعال اکسیژن را محافظت می‌نمایند (Navarro *et al.*, 2006). از آنجا که همه این ترکیب‌ها از سینامیک اسید مشتق می‌شوند که خود محصول عمل دامیناز آنزیم فینیل‌آلانین آمونیلایز (PAL) روی فینیل‌آلانین می‌باشند، به نظر می‌رسد که تغییرات در فعالیت آنزیم PAL می‌تواند یکی از دلایل تغییر مقدار این ترکیب‌ها در گیاهان باشد. فینیل‌آلانین آمونیلایز آنزیم اصلی مسیر فینیل‌پروپانویید می‌باشد که با واکنش دامیناسیون، L فینیل‌آلانین را به ترانس‌سینامیک اسید تبدیل می‌کند. سینامیک اسید اولین حدواسط برای سنتز ترکیب‌های فنلی، آنتوسیانین، فلاونوئیدها، تانن و لیگنین می‌باشد (Wen *et al.*, 2005).

قندهای محلول جزء اسمولیت‌هایی هستند که در پاسخ به تنش خشکی و شوری برای تنظیم اسمزی در گیاهان تجمع می‌یابند و نقش آنها در حفظ ساختار ماکرومولکول‌های سلول و از جمله ثبات بخشیدن به ساختار DNA گزارش شده‌است، به طوری که برخی دانشمندان مقدار قندها را به عنوان شاخص خوبی برای بیان مقاومت به تنش خشکی و شوری ذکر نموده‌اند (Juan *et al.*, 2005). اما با وجود این نتایج بسیار متفاوتی در مورد اثر تنش خشکی و شوری بر تجمع قندها در گیاهان وجود دارد. تجمع قندهای محلول تحت تنش خشکی احتمالاً در تنظیم اسمزی نقش اساسی ایفاء می‌کنند، اما در تغییر مقدار کربوهیدرات‌ها در گیاهان عوامل بسیار گسترده‌ای دخیل هستند و مقدار قندها در ارتباط مستقیم با فرایندهایی نظیر فتوسنتز، تنفس و انتقال می‌باشند. بنابراین تغییر مقدار کربوهیدرات‌ها را نمی‌توان به راحتی تفسیر نمود (Watkinson *et al.*, 2008).

در این آزمایش تنش اسمزی کاهش مقدار پروتئین را به دنبال داشت (جدول ۴). کاهش مقدار پروتئین در گیاه برنج (Hsu & Kao, 2003) و نخود (Iturbe-Ormaechea *et al.*, 1998) در تنش خشکی تأییدی بر نتیجه بدست آمده در این آزمایش می‌باشد. دلایل مختلفی در مورد کاهش مقدار پروتئین در گیاهان تحت تنش خشکی و شوری ذکر شده‌است. تنش اکسیداتیو و اکسیداسیون پروتئین‌ها و در نتیجه افزایش پروتئین‌های اکسید شده (Iturbe-Ormaechea *et al.*, 1998; Hsu & Kao, 2003)، سرکوب سنتز پروتئین از طریق تأثیر بر

یکی از ترکیب‌های آنتی‌اکسیدان شناخته شده‌اند که با مکانیسم‌های متعددی مثل جاروب کردن رادیکال‌های آزاد و قطع کردن واکنش‌های زنجیره‌وار اکسیداسیون، دادن هیدروژن، خاموش کردن اکسیژن یکتایی، کلات کردن یون‌های فلزی و یا قرار گرفتن به عنوان سوبسترای آنزیم‌های پراکسیداز نقش آنتی‌اکسیدانی خود را ایفاء می‌کنند. این ترکیب‌ها همچنین با دادن سریع هیدروژن به رادیکال‌های لیپید از ادامه زنجیره پراکسیداسیون ممانعت می‌کنند و قادرند محصولاتی با قدرت اکسیدکنندگی کمتر از ترکیب‌های اولیه بوجود آورند (Chu *et al.*, 2000). در سلول‌های گیاهی معمولاً ترکیب‌های فنلی به خصوص پلی‌فنل‌ها در سم‌زدایی پراکسید هیدروژن بسیار کارا عمل کرده و به عنوان سیستم پشتیبان چرخه آسکوربات-گلوتاتیون در از بین بردن پراکسید هیدروژن شرکت می‌کنند. وقتی فنل‌ها به عنوان آنتی‌اکسیدان در این واکنش‌ها شرکت می‌کنند، به رادیکال فنوکسیل اکسید می‌شوند (واکنش ۱)، رادیکال‌های فنوکسیل از طریق واکنش غیرآنزیمی با آسکوربات به حالت اولیه برمی‌گردند (واکنش ۲). همچنین آنزیم مونودهیدروآسکوربات ردوکتاز نیز می‌تواند مونودهیدروآسکوربات (MDA) را به آسکوربات تبدیل کند (واکنش ۳). البته مونودهیدروآسکوربات می‌تواند به دهیدروآسکوربات (DHA) تبدیل شده و دهیدروآسکوربات از طریق واکنش آنزیمی به آسکوربات تبدیل شود (Sakihama *et al.*, 2002).



تجمع ترکیب‌های فنلی در گیاهان در پاسخ به تنش‌های زیستی و غیرزیستی متعددی مانند اشعه ماورابنفش، دمای پایین، کاهش تغذیه، حمله پاتوژن‌ها و خشکی گزارش شده‌است (Yamasaki *et al.*, 1997). در این مطالعه مقدار ترکیب‌های پلی‌فنلی در تنش اسمزی به دلیل نقش مستقیم آنها در سم‌زدایی از  $\text{H}_2\text{O}_2$  و تشکیل رادیکال فنوکسیل کاهش یافت (جدول ۴). نتایج مشابه مربوط به کاهش سطح ترکیب‌های فنلی در گیاه لفل تحت تنش شوری گزارش شده‌است (Navarro *et al.*, 2006). با توجه به نقش ترکیب‌های پلی‌فنلی در کاهش یا مهار پراکسیداسیون لیپیدها، جاروب کردن رادیکال‌های آزاد و خاموش کردن



- Chemistry, 48(5): 1458-1490.
- Good, A.G. and Zaplachinski, S.T., 1994. The effects of drought stress on free amino acid accumulation and protein synthesis in *Brassica napus*. *Physiologia Plantarum*, 90(1): 9-14.
  - Hamed, K.B., Castagna, A., Salem, E., Ranieri, A. and Abdelly, C., 2007. Sea fennel (*Crithmum maritimum* L.) under salinity conditions: a comparison of leaf and root antioxidant responses. *Plant Growth Regul*, 53(3): 185-194.
  - 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.
  - Hsu, S.Y. and Kao, C.H., 2003. The protective effect of free radical scavengers and metal chelators on polyethylene glycol-treated rice leaves. *Biologia Plantarum*, 46(4): 617-619.
  - Ingle, R.A., Mugford, S.T., Rees, J.D., Campbell, M.M. and Smith, J.A.C., 2005. Constitutively high expression of the histidine biosynthetic pathway contributes to nickel tolerance in hyper accumulator plants. *The Plant Cell*, 17(7): 2089-2106.
  - 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.
  - 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. *Environmental and Experimental Botany*, 54(3): 193-201.
  - Krizek, D.T., Britz, S.J. and Mirecki, R.M., 1998. Inhibitory effect of ambient levels of solar UV-A and UV-B radiation on growth of cv. new red fire lettuce. *Physiologia Plantarum*, 103: 1-7.
  - Lichtenthaler, H.K., 1987. Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. *Methods in Enzymology*, 148: 350-382.
  - Meir, S., Philosoph-Hadas, S. and Aharoni, N., 1992. Ethylene increased accumulation of fluorescent lipid peroxidation products detected during senescence of parsley by a newly developed method. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 117:128-132.
  - Monakhova, O.F. and Chernyad'ev, I.I., 2002. Protective role of kartolin-4 in wheat plants exposed to soil drought. *Prikladnaia Biochemiia Microbiologiia*, 38: 373-380.
  - Moran, J.F., Becana, M., Iturbe-Ormaetxe, I., Frechilla, S., Klucas, R.V. and Aparicio-Tejo, P., 1994. Drought induces oxidative stress in pea plants. *Planta*, 194(3): 346-352.
- پلی‌ریبوزوم‌ها و افزایش تجزیه پروتئین‌ها و پروتولیز، کاهش کارایی مکانیسم‌های دخیل در ترمیم و بازسازی پروتئین‌ها (Iturbe-Ormaetxe et al., 1998) از دلایل کاهش مقدار پروتئین در تنش خشکی و شوری ذکر شده‌است. تنش اکسیداتیو می‌تواند یکی از دلایل کاهش مقدار پروتئین‌ها باشد. تولید رادیکال‌های سوپر اکسید یا هیدروکسیل باعث اکسیداسیون اسیدهای آمینه شده و به ساختار و عملکرد پروتئین‌ها آسیب جدی وارد می‌کنند. رادیکال‌های آزاد اکسیژن با ایجاد تغییر در موقعیت اسیدهای آمینه در رشته‌های پروتئینی تجزیه آنها را توسط آنزیم‌های تجزیه‌کننده موجب می‌گردد. در بررسی حاضر نیز به نظر می‌رسد، افزایش تنش اکسیداتیو و کاهش فتوسنتز می‌تواند از دلایل کاهش مقدار پروتئین در گیاه مورد مطالعه باشد.
- با بررسی پارامترهای فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی گیاه سیاهدانه تحت تنش خشکی، بنظر می‌رسد که این گیاه به تنش خشکی تقریباً حساس بوده و به‌خصوص با افزایش سطح خشکی خسارت جدی به آن وارد می‌شود. امروزه با کاربرد مواد شیمیایی و هورمون‌های برون‌زا، تحمل برخی گیاهان را به تنش‌های محیطی افزایش داده‌اند که استفاده از آنها بر روی گیاه جهت افزایش مقاومت به خشکی می‌تواند مورد مطالعه قرار گیرد.
- ### منابع مورد استفاده
- دوازده‌امامی، س. و مجنون حسینی، ن.، ۱۳۸۷. زراعت و تولید برخی گیاهان دارویی و ادویه‌ای. انتشارات دانشگاه تهران، ۳۰۰ صفحه.
  - Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72: 248-254.
  - Chu, Y.H., Chang, C.L. and Hsu, H.F., 2000. Flavonoid content of several vegetable and their antioxidant activity. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80(5): 561-566.
  - D'cunha, G.B., Satyanarayan, V. and Nair, P.M., 1996. Purification of phenylalanine ammonialyase from *Rhodotorula glutinis*. *Phytochemistry*, 42: 17-20.
  - Gao, X., Ohlander, M., Jeppsson, N., Bjork, L. and Trajkovski, V., 2000. Changes in antioxidant effects and their relationship to phytonutrients in fruit of sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) during maturation. *Journal of Agricultural and Food*

- in antioxidant activity, total phenolic and anthocyanin constituent of the stems of two *Morus* species (*Morus alba* L. and *Morus nigra* L.). *Plant Growth Regulation*, 44(3): 251-256.
- Tian, X. and Li, Y., 2006. Nitric oxide treatment alleviates drought stress in wheat seedlings. *Biologia Plantarum*, 50(4): 775-778.
  - Wanger, G.J., 1979. Content and vacuole/ extra vacuole distribution of neutral sugars, free amino acids, and anthocyanins in protoplast. *Plant Physiology*, 64: 88-93.
  - Watkinson, J.I., Hendricks, L., Sioson, A.A., Heath, L.S., Bohnert, H.J. and Grene, R., 2008. Tuber development phenotypes in adapted and acclimated, drought-stressed *Solanum tuberosum* ssp. *andigena* have distinct expression profiles of genes associated with carbon metabolism. *Plant Physiology and Biochemistry*, 46: 34-45.
  - Wen, P.F., Chen, J.Y., Wan, S.B., Kong, W.F., Zhang, P., Wang, W., Zhan, J., Pan, Q.H. and Hung, W.D., 2005. Salicylic acid activates phenylalanine ammonia-lyase in grape berry in response to high temperature stress. *Plant Growth Regulation*, 55: 1-10.
  - Wheutherley, P.E., 1950. Studies in water relations of cotton plants. The field measurement of water deficit in leaves. *New Phytologist*, 49: 81-87.
  - Yamasaki, H., Sakihama, Y. and Ikehara, N., 1997. Flavonoid-peroxidase reaction as a detoxification mechanism of plant cells against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. *Plant Phytologist*, 115(4): 1405-1412.
  - Navarro, J.M., Flores, P., Garrido, C. and Martinez, V., 2006. Changes in the contents of antioxidant compounds in pepper fruits at different ripening stages, as affected by salinity. *Food Chemistry*, 96: 66-73.
  - Roe, J.H., 1955. The determination of sugar in blood and spinal fluid with anthrone reagent. *The Journal of Biological Chemistry*, 212: 335-343.
  - Sakihama, Y., Cohen, M.F., Grace, S.C. and Yamasaki, H., 2002. Plant phenolics antioxidant and prooxidant activity: phenolics-induced oxidative damage mediated by metal in plants. *Toxicology*, 177: 67-80.
  - Salem, M.L., 2005. Immunomodulatory and therapeutic properties of the *Nigella sativa* L. seeds. *International Immunopharmacology*, 5(13-14): 1749-1770.
  - Sgherri, C.L.M., Maffei, M. and Navari-Izzo, F., 2000. Antioxidative enzymes in wheat subjected to increasing water deficit and re watering. *Journal of Plant Physiology*, 157(3): 273-279.
  - Sharma, P. and Dubey, R.S., 2005. Drought induces oxidative stress and enhances the activities of antioxidant enzymes in growing rice seedlings. *Plant Growth Regulation*, 46(3): 209-221.
  - Sultana, N., Ikeda, T. and Itoh, R., 1999. Effect of NaCl salinity on photosynthesis and dry matter accumulation in developing rice grains. *Environmental and Experimental Botany*, 42(3): 211-220.
  - Syvacy, A. and Sokmen, M., 2004. Seasonal changes

## Effect of drought stress on physiological and biochemical characteristics of *Nigella sativa* L.

R. Kabiri<sup>1</sup>, H. Farahbakhsh<sup>2\*</sup> and F. Nasibi<sup>3</sup>

1- MSc. Student, Faculty of Agriculture, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran

2\*- Corresponding author, Horticultural Research Institute, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran

E-mail: hfarahbakhsh@yahoo.com

3- Department of Biology, Faculty of Sciences, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran

Received: March 2012

Revised: November 2012

Accepted: December 2012

### Abstract

This research was aimed to evaluate the effect of drought stress, induced by polyethylene glycol (PEG<sub>6000</sub>), on physiological and biochemical parameters of black cumin (*Nigella sativa* L.). The traits were included: shoot dry weight, electrolyte leakage, relative water content, photosynthetic pigments (chlorophyll a, b, total chlorophyll and carotenoids), malondialdehyde and other aldehyde's contents, anthocyanines, polyphenol compounds, flavonoids, phenylalanine ammonialayse activity, soluble sugar content and protein. An experiment was conducted as a completely randomized design with three replications under hydroponic culture at research laboratory of Shahid Bahonar University of Kerman in 2011. Treatments were four levels of drought stress (0, -0.2, -0.4 and -0.6 MPa). Results showed that drought stress caused a significant reduction in shoot dry weight, relative water content, photosynthetic pigments, anthocyanines, polyphenol compounds, flavonoids and protein and an increase in electrolyte leakage, malondialdehyde content, phenylalanine ammonialayse activity and soluble sugar. Based on the obtained results, it seems that this plant is sensitive to drought stress, and the application of exogenous protective compounds could increase the antioxidant capacity of plant against stress condition.

**Key words:** *Nigella sativa* L., anthocyanin, polyphenol compounds, flavonoids, phenylalanine ammonialayse.