

بررسی تأثیر تنش خشکی (پلی اتیلن گلیکول) بر صفات آنتی اکسیدانی و برخی صفات فیزیولوژیکی گیاه دارویی پنیرباد (*Withania coagulans* Dunal)

آی سن قهرمانی^۱، ابراهیم گنجی مقدم^{۲*}، مریم تاتاری^۳، سوسن خسرویاری^۴

۱. دانشجوی دکتری تخصصی (باغبانی) گرایش گیاهان دارویی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شیروان، شیروان، ایران
۲. دانشیار بخش تحقیقات علوم زراعی و باغی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی خراسان رضوی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، ایران
۳. استادیار گروه زراعت، دانشکده کشاورزی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شیروان، شیروان، ایران
۴. استادیار گروه مهندسی شیمی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد قوچان، قوچان، ایران

چکیده

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۱۰/۰۳

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۰۱/۱۷

زمینه و هدف: گیاه دارویی پنیرباد با دارا بودن اثرات ضدقارچی و ضدباکتریایی، کاهش دهنده قند و کلسترول خون، تقویت کننده سیستم ایمنی و آنتی اکسیدانی اخیراً مورد توجه فارماکولوژیست-ها قرار گرفته است و به دلیل سازگاری بسیار وسیع نسبت به شرایط دشوار اکولوژیکی می تواند در مناطق گرمسیر کشور از جمله استان سیستان و بلوچستان رشد کند.

مواد و روش ها: این مطالعه، تحت شرایط آزمایشگاهی در مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان خراسان رضوی در سال ۱۳۹۷ در قالب طرح کاملاً تصادفی با چهار تکرار طراحی شد. غلظت های صفر، ۲، ۴، ۶، ۸ و ۱۰ بار پلی اتیلن گلیکول برای القای تنش خشکی در محیط کشت MS حاوی بنزیل آدنین پورین بر صفات ثانویه گیاه پنیرباد مورد استفاده قرار گرفت.

یافته ها: نتایج نشان داد که تنش خشکی ۱۰ بار منجر به افزایش معنی دار فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدان کاتالاز، پراکسیداز و آسکوربات پراکسیداز، محتوی پرولین، فنل و فلاونوئید و میزان نشتی غشا شد ولی از طرف دیگر، منجر به کاهش معنی دار محتوای رطوبت نسبی، محتوی یون پتاسیم و نسبت یون پتاسیم به سدیم گردید. همچنین بیشتر صفات مورد مطالعه، همبستگی معنی دار دارند.

نتیجه گیری: نتایج نشان داد که گیاه دارویی پنیرباد از تحمل قابل قبولی در برابر القای تنش خشکی با پلی اتیلن گلیکول برخوردار است. در کاهش اثرات منفی ناشی از تنش خشکی مکانیسم های آنزیمی (فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدان) و غیر آنزیمی (محتوی پرولین، فنل، فلاونوئید و غیره) نقش بسیار مهمی دارد. از طرف دیگر، تنش خشکی، منجر به افزایش برخی متابولیت ها همچون فنل و فلاونوئید که مصارف دارویی دارند، شد.

کلیدواژه ها:

پرولین، پنیرباد، ضدقارچی، فلاونوئید، کاتالاز.

۱. مقدمه

بومی سیستان و بلوچستان می باشد (۱). تاکنون ۱۲ نوع الکلوئید و بیش از ۳۵ نوع ویتانوئید و تعدادی گلیکوویتانوئید به نام سیتوآیندوزید از اندام هوایی، ریشه و

گیاه پنیرباد در زمره گیاهان دارویی و چندمنظوره است که در ایران، پراکنش بسیار محدودی دارد و یکی از گونه های

* نویسنده مسئول: ابراهیم گنجی مقدم

نشانی: دانشیار بخش تحقیقات علوم زراعی و باغی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی خراسان رضوی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، ایران

تلفن: ۰۹۱۵۱۱۴۱۴۳۵

رایانامه: ejanji@hotmail.com

شناسه ORCID: 0000-0002-8621-7774

شناسه ORCID نویسنده اول: 0000-0003-1000-7452

مجله علمی - پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی سبزوار، دوره ۲۸، شماره ۲، خرداد و تیر ۱۴۰۰، ص ۲۷۴-۲۸۵

آدرس سایت: http://jsums.medsab.ac.ir رایانامه: journal@medsab.ac.ir

شاپای چاپی: ۱۶۰۶-۷۴۸۷

تحقیق، ارزیابی پاسخ‌های فیزیولوژیکی از جمله فعالیت پرولین، کاتالاز، پراکسیداز، آسکوربات اکسیداز، رطوبت نسبی، فنل، فلانوئید، پتاسیم، سدیم، نشت یونی و فلورسانس کلروفیل در سطوح مختلف تنش خشکی در گیاه دارویی پنیرباد می‌باشد.

۲. مواد و روش‌ها

در این پژوهش از پلی اتیلن گلیکول ۶۰۰۰ (Polyethylene glycol 6000-Merck Millipore) به منظور ایجاد سطوح مختلف تنش خشکی با هدف ارائه یک روش سریع و کارآمد برای پرورش گیاه دارویی پنیرباد (*Withania coagulans* Dunal) تحت شرایط آزمایشگاهی در آزمایشگاه مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی خراسان رضوی در قالب طرح کاملاً تصادفی (CRD)^۱ با چهار تکرار در سال ۱۳۹۷ استفاده شد. غلظت‌های پلی اتیلن گلیکول شامل صفر، ۲، ۴، ۶، ۸ و ۱۰ بار به دلیل القای تنش خشکی استفاده شد که به ترتیب شامل صفر، ۱۱۹/۵۷، ۱۷۸/۳۴، ۲۲۳/۶۶، ۲۶۱/۹۴ و ۲۹۵/۷۱ گرم پلی اتیلن گلیکول در یک لیتر آب با دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد بودند. نمونه‌های بذر پنیرباد از زیستگاه طبیعی این گیاه در استان سیستان و بلوچستان جمع‌آوری گردید. برای استریلیزاسیون بذرها، الکل ۷۰ درصد به مدت پنج دقیقه و هیپوکلریت سدیم ۱۰ درصد به مدت ۱۰ دقیقه استفاده شد. سپس بذرها در سه مرحله در آب استریل شسته شدند و به منظور شاخه‌زایی در محیط MS^۲ شامل BAP^۳ ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر کشت گردیدند. محلول تنش خشکی (پلی اتیلن گلیکول) در محیط کشت MS حاوی ایندول تری بوتیریک اسید (IBA)^۴ و نفتالین استیک اسید (NAA)^۵ ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر (به منظور تعیین بهترین غلظت IBA و NAA، آزمایش اولیه در پنج غلظت صفر، ۰/۵، ۱، ۱/۵، ۲ میلی‌گرم در لیتر انجام گرفت) که واجد محلول تنش می‌باشد، منتقل شدند. برای تهیه محیط کشت تنش، ابتدا پلی اتیلن گلیکول در نصف حجم نهایی آب مقطر با استفاده از حرارت و هم‌زدن حل شد. در نصف دیگر از حجم محلول، محیط غذایی MS تهیه شد و پس از آن به مدت بیست دقیقه در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد و فشار ۱/۲ بار اتوکلاو استریل گردید. در مرحله آخر، دو محلول در زیر هود لامینار با هم مخلوط و در ظروف

میوه از دو گونه دارویی *Withania somnifera* و *Withania coagulans* جداسازی و مطالعه شده است (۱). مهم‌ترین انواع ویتانوئیدهای موجود در این گونه ویتافرین A، ویتانوئید A و ویتانول می‌باشد. مطالعات حیوانی و بالینی نشان داده است که فراورده‌های دارویی این گیاه، محدوده وسیعی از بیماری‌های مربوط به سیستم عصبی نظیر اضطراب و هیجان، اسکیزوفرنی، آلزایمر، پارکینسون، صرع و همچنین رشد سلول‌های سرطانی را کنترل و درمان می‌کند (۲). به دلیل وجود پروتئاز آسپارتیک در عصاره این گیاه، از آن، برای لخته کردن شیر در تولید پنیر سنتی استفاده می‌شود (۳).

گیاهان در تنش خشکی با تغییر ویژگی‌های مورفولوژیکی و آناتومیکی خود، از طریق سازگاری فیزیولوژیکی، یا با استفاده از ابزارهای بیوشیمیایی و تنظیمات مولکولی در کل سطح گیاه از خود مقاومت نشان می‌دهند. انطباق بیوشیمیایی ممکن است شامل متابولیسم اولیه و ثانویه باشد. اثرات تنش بر گیاهان شامل تغییر رنگدانه‌های برگ، فیزیولوژی تغییر یافته (اختلال فتوسنتز)، در نهایت رشد ضعیف، انرژی کم و حتی گاهی مرگ گیاه است (۴). کاهش عملکرد از طریق کاهش رشد برگ و در نتیجه کاهش بهره‌وری فتوسنتزی می‌باشد (۵). خشکسالی، بسته به شدت، سرعت و مدت قرار گرفتن در معرض و مرحله رشد محصول، تقریباً بر همه فرایندهای رشد گیاه تأثیر می‌گذارد (۸). علم زیست فناوری، از طریق کشت سلول، بافت یا اندام در شرایط درون‌شیشه‌ای، رویکردی نوین در راستای توسعه روش‌های ریز ازدیادی و تولید درون‌شیشه‌ای بسیاری از ترکیبات دارویی می‌باشد. در میان گیاهان دارویی، پنیرباد، یکی از ارزشمندترین گیاهان دارویی در آیورودا (یک سیستم پزشکی با ریشه‌های تاریخی در شبه‌قاره هند) و دیگر سیستم‌های پزشکی سنتی است. مطالعات متعددی در مورد شیمی و داروشناسی (۶)، روش‌های جدیدی برای جداسازی ویتافرین A (۷) و تنوع فیتوشیمیایی در محصولات گیاهی تجاری انجام شده است (۸). به دلیل نبود اطلاعات کافی در مورد پاسخ بیوشیمی گیاه پنیرباد نسبت به تنش خشکی، اجرای این تحقیق ضروری می‌باشد.

پاسخ‌های فیزیولوژیکی و فیتوشیمیایی پنیرباد در برابر تنش خشکی در ایران گزارش نشده است. هدف از این

4. Indole 3 butric acid
5. 1-Naphthaleneacetic acid

1. Completely randomized design
2. Murashing and Skoog medium
3. 6-Benzlamino purine, benzyl adenine

میلی لیتر H_2O_2 ۱۰ میلی مولار ، ۰/۵ میلی لیتر اسید آسکوربیک ۱ میلی مولار، ۰/۵ میلی لیتر بافر ۱۰۰ میلی مولار (۷ pH: K-P) ، ۰/۵ میلی لیتر EDTA ۰/۴ میلی مولار، ۰/۳۸ میلی لیتر آب مقطر و ۰/۱ میلی لیتر عصاره آنزیم استخراج شده در یک دقیقه بود. حذف / تجزیه ASA در ۲۹۰ نانومتر اندازه گیری شد.

۲.۲. اندازه گیری میزان پرولین

میزان پرولین برگ با استفاده از روش Bates و همکاران (۱۹۷۳) تعیین شد (۱۲). ۰/۵ گرم برگ تازه خشک شده پنیرباد در هاون خرد شد و با ۱۰ میلی لیتر سولفوسالیسیلیک اسید مخلوط گردید و به مدت ۱۰ دقیقه در $g \times 13000$ سانتریفیوژ شد. لایه سطحی قرمز و نمونه های استاندارد به طور هم زمان در یک اسپکتروفتومتر قرار گرفت و جذب نمونه ها در طول موج ۵۲۰ نانومتر اندازه گیری شد. مقدار پرولین (میکرومول بر گرم وزن تر) با استفاده از معادلات رگرسیون و منحنی های استاندارد محاسبه شد.

۳.۲. استخراج و بررسی فعالیت آنتی اکسیدانی

غیر آنزیمی

اندازه گیری ترکیبات فنول کل براساس موارد زیر انجام شد. ۰/۲ گرم نمونه با استفاده از یک لوله با ۲۰ میلی لیتر آب جوش مخلوط شد و سپس به مدت یک ساعت در حمام آب قرار گرفت. سپس ۱ میلی لیتر عصاره با ۵ میلی لیتر معرف فولین- دنیز و ۱۰ میلی لیتر کربنات سدیم ۳۵ درصد مخلوط شد و سپس به حجم ۱۰۰ میلی لیتر رسانده شد. این محلول در دمای اتاق به مدت ۴۵ دقیقه بیشتر باقی نماند. در نهایت جذب نمونه ها با استفاده از منحنی استاندارد اسید گالیک محاسبه شد (۱۳). محتویات فلاونوئید از روش توسط Zhishen و همکاران تعیین شد (۱۴). جذب در ۵۱۰ نانومتر اندازه گیری شد و مقدار فلاونوئیدها به صورت میلی- گرم کروسیل بر گرم وزن تر بیان شد و به عنوان استاندارد مورد استفاده قرار گرفت.

۴.۲. اندازه گیری محتوای نسبی آب

محتوای آب نسبی (RWC) ^۱ همانند روش Sangwan با استفاده از معادله ۱ محاسبه شد (۸):

$$RWC (\%) = \frac{FW-DW}{TW-DW} \times 100 \quad \text{معادله ۱:}$$

کشت استریل توزیع شدند. بعد از کشت، در اتاق رشد با ۱۶ ساعت نور در ۲۲ درجه سانتی گراد و هشت ساعت تاریکی در دمای ۱۸ درجه سانتی گراد به مدت ۴۰ روز قرار گرفتند. در نهایت، گیاهچه های ریشه دار شده به گلدان های حاوی کوکوپیت و پرلیت (۱:۱) منتقل شدند و به مدت ۳۰ روز تحت رطوبت نسبی ۸۵ درصد، دمای ۲۵ درجه سانتی گراد و در نور ۳۰۰۰ لوکس به منظور سازگاری قرار گرفتند.

۱.۲. استخراج و بررسی فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدانت

استخراج آنزیم آنتی اکسیدان با استفاده از روش Sunohara و Matsumoto (۲۰۰۴) با تغییرات جزئی انجام شد (۹). برای تعیین فعالیت مهارکنندگی رادیکال آزاد DPPH، ۲۰۰ میلی گرم برگ گیاه پنیرباد، کاملاً ریز شد و در ۱۰ میلی لیتر بافر ۲۵ میلی مولار (۷/۸ pH: K-P) حاوی ASA یک میلی مولار، EDTA ۰/۴ میلی مولار PVPP ۲ درصد در دمای چهار درجه سانتی گراد به مدت یک دقیقه کاملاً مخلوط گردید. محلول فوق در دمای چهار درجه سانتی گراد به مدت ۲۰ دقیقه در $g \times 15000$ سانتریفیوژ شد و سوپرناتانت (محلول رویی) از کاغذ صافی (Whatman®No.1) عبور داده شد. محلول صاف شده برای تعیین فعالیت کاتالاز (CAT: EC 1.11.1.6)، پراکسیداز (POD: EC 1.11.1) و آسکوربات پراکسیداز (APX: EC 1.11.1.11) جمع آوری شد (۱۰). این آزمایش در مخلوط واکنش ۲ میلی لیتری حاوی ۱/۹ میلی لیتر از بافر (۷ pH: K-P) ۵۰ میلی مولار H_2O_2 ۲۵ میلی مولار و ۰/۱ میلی لیتر از عصاره آنزیم برای یک دقیقه اندازه گیری شد. فعالیت CAT از لحاظ تجزیه H_2O_2 در ۲۴۰ نانومتر و فعالیت پروتئین برگ در یک دقیقه محاسبه شد. فعالیت POD با روش پیشنهادی Chance و Maehly (۱۹۹۵) مورد سنجش قرار گرفت (۱۱). محلول متانولی عصاره بافت (۱۰۰ میکرولیتر) به ۳ میلی لیتر محلول آزمایش شامل ۳ میلی- لیتر مخلوط واکنش شامل گوایاکول ۱۳ میلی مولار، H_2O_2 ۵ میلی مولار و (۶/۵ pH: K-P) ۵۰ میلی مولار اضافه شد و سپس جذب مخلوط واکنش در ۴۷۰ نانومتر برای یک دقیقه در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد با استفاده از اسپکتروفتومتر ثبت شد. فعالیت APX براساس روش Sunohara و Matsumoto (۲۰۰۴) با مقداری تغییرات تعیین شد (۹). مخلوط واکنش ۲ میلی لیتری شامل ۰/۰۲

۳. یافته‌ها

۱.۳. فعالیت آنزیم کاتالاز

نتایج تجزیه و تحلیل داده‌ها نشان داد که اثر تنش خشکی بر میزان فعالیت آنزیم کاتالاز در سطح احتمال ۱ درصد معنی‌دار بود (جدول ۱). براساس مقایسه میانگین اثر تنش خشکی، افزایش سطح تنش منجر به افزایش فعالیت کاتالاز گردید؛ به طوری که بیشترین فعالیت این آنزیم در سطح خشکی ۱۰ بار با میانگین ۲/۷۶ واحد آنزیم بر میلی‌گرم پروتئین در دقیقه بود که در مقایسه با تیمار شاهد افزایش ۸۱/۸ درصدی داشت. کمترین فعالیت این آنزیم نیز در سایر سطوح تیماری مشاهده شد (جدول ۲).

۲.۳. فعالیت آنزیم پراکسیداز

فعالیت آنزیم پراکسیداز در اثر تنش خشکی تفاوت معنی‌داری نشان داد (جدول ۱). براساس مقایسه میانگین داده‌ها، بیشترین فعالیت آنزیم پراکسیداز در سطوح خشکی ۸ و ۱۰ بار به ترتیب با میانگین ۳/۱۶ و ۳/۳۹ واحد آنزیم بر میلی‌گرم پروتئین در دقیقه بود که در مقایسه با تیمار شاهد افزایش ۷۲/۸ و ۷۴/۶ درصدی داشتند. کمترین میانگین این صفت نیز در سطوح خشکی صفر و ۲ بار به ترتیب با میانگین ۰/۸۵۸ و ۱/۰۱ واحد آنزیم بر میلی‌گرم پروتئین در دقیقه به دست آمد (جدول ۲).

۳.۳. فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز

براساس تجزیه داده‌های به دست آمده، اثر تنش خشکی بر میزان فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز در سطح احتمال ۱ درصد معنی‌دار بود (جدول ۱). براساس جدول مقایسه میانگین، بیشترین فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز در سطح خشکی ۱۰ بار با میانگین ۳۱/۴۲ واحد آنزیم بر میلی‌گرم پروتئین در دقیقه بود که افزایش ۶۹/۲ درصدی در مقایسه با تیمار شاهد داشت. کمترین فعالیت نیز مربوط به سطوح خشکی صفر و ۲ بار به ترتیب با میانگین ۹/۶۵ و ۱۰/۳۹ واحد آنزیم بر میلی‌گرم پروتئین در دقیقه بود (جدول ۲).

۴.۳. محتوی پرولین

جدول تجزیه واریانس نشان داد که اثر تنش خشکی بر میزان پرولین در سطح احتمال ۱ درصد معنی‌دار بود

که در آن FW: وزن تازه، DW: وزن خشک؛ و TW: وزن آماس بودند.

۵.۲. اندازه‌گیری نشت یونی

نشت یونی با استفاده از روش Chan و Maehly تعیین شد (۱۵). ده برگ از گیاه پنبیرباد وارد یک ارلن مایر حاوی ۲۵ میلی‌لیتر آب دیونیزه در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ دقیقه قرار داده شد. هدایت اولیه (E1) مخلوط با هدایت متر (Five Easy FE 30, Mettler Toledo، سوئیس) اندازه‌گیری شد. سپس محتویات ارلن مایر در دمای ۹۸ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه گرم شد و هدایت (E2) مخلوط بعد از سرد شدن مجدداً اندازه‌گیری شد. IL^۱ با استفاده از معادله ۲ محاسبه شد.

$$\text{معادله ۲: } IL (\%) = \left(\frac{E1}{E2} \right) \times 100$$

که در آن IL: میزان نشت یونی، E1: هدایت الکتریکی اولیه و E2: هدایت الکتریکی ثانویه می‌باشد.

۶.۲. اندازه‌گیری مقدار یون‌های Na⁺ و K⁺

اندازه‌گیری میزان یون‌های Na⁺ و K⁺ با استفاده از فلم فتومتری (نورسنجی به کمک شعله) انجام شد (۱۶). در این روش، با استفاده از منحنی استاندارد و معادله ۳، محاسبه Na⁺ و K⁺ در اندام‌های مختلف به دست آمد (۱۷). معادله ۳:

$$A = y \times \frac{100}{1000} \times \frac{1000}{w}$$

Y: مقدار به دست آمده از منحنی استاندارد (mg/kg)؛ A: میزان Na⁺ و K⁺؛ w: وزن خشک اولیه (g).

۷.۲. اندازه‌گیری فلورسانس کلروفیل

فلورسانس کلروفیل با استفاده از دستگاه فلورومتر کلروفیل، PAM-2000، والز، آلمان بر اساس روش Afshar و Mohamadian و همکاران اندازه‌گیری شد (۱۸).

۸.۲. تجزیه و تحلیل آماری

داده‌ها به صورت میانگین \pm خطای معیار (SE) بیان شد. داده‌ها با استفاده از تجزیه و تحلیل واریانس یک طرفه و چندمتغیره (ANOVA) و با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن مقایسه شدند. اختلاف معنی‌دار بین متغیرها در P < 0.05 بررسی شد.

۷.۳. محتوی رطوبت نسبی (RWC)

نتایج حاکی از اثر معنی دار تنش خشکی بر میزان رطوبت نسبی گیاهچه پنیرباد بود (جدول ۱). براساس مقایسه میانگین اثر خشکی، بیشترین محتوی رطوبت نسبی در سطح بدون تنش (شاهد) با میانگین ۷۲/۹۲ درصد بود و کمترین میانگین مربوط به سطوح ۸ و ۱۰ بار بود که در مقایسه با تیمار شاهد کاهش ۲۲/۲۲ و ۲۶/۳ درصدی داشتند (جدول ۲).

۸.۳. نشتی غشاء

نتایج نشان داد که تنش خشکی اثر معنی داری در سطح احتمال ۱ درصد بر نشتی غشاء داشت (جدول ۱). در مقایسه میانگین اثر تنش خشکی، بیشترین نشتی غشاء در سطوح خشکی ۸ و ۱۰ بار (به ترتیب با ۴۵/۴۳ و ۴۸/۸۶ درصد) بود که در مقایسه با تیمار شاهد افزایش ۵۷/۷ و ۶۰/۷ درصدی داشتند. کمترین میانگین این صفت نیز با میانگین ۱۹/۲۰ درصد در تیمار بدون تنش مشاهده شد (جدول ۲).

۹.۳. غلظت پتاسیم

نتایج جدول تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که خشکی اثر معنی داری بر غلظت پتاسیم داشت (جدول ۱). براساس مقایسه میانگین داده‌ها، بیشترین محتوی یون پتاسیم در سطوح خشکی صفر، ۲ و ۴ بار به ترتیب با میانگین ۴۰/۴۰، ۴۱/۲۵ و ۴۱/۵۸ میلی گرم بر گرم بود و کمترین میانگین این صفت در سطوح خشکی ۸ و ۱۰ بار (به ترتیب با میانگین ۱۱/۲۳ و ۹/۶۳ میلی گرم بر گرم) به دست آمد. به عبارت دیگر، تنش خشکی منجر به کاهش معنی دار میانگین پتاسیم گردید (جدول ۳).

(جدول ۱). نتایج نشان داد که خشکی منجر به افزایش میزان پرولین می‌شود؛ به طوری که بیشترین محتوی پرولین در بالاترین سطح تنش خشکی (۱۰ بار) با میانگین ۱/۱۸ میکرومول بر گرم وزن تر بود که در مقایسه با شرایط بدون تنش، افزایش ۷۷/۹ درصدی داشت. کمترین میزان پرولین نیز در تیمار صفر و ۲ بار به ترتیب با میانگین ۰/۲۶ و ۰/۴۵ میکرومول بر گرم وزن تر مشاهده شد (جدول ۲).

۵.۳. محتوی فنل کل

نتایج نشان داد که خشکی در سطح احتمال ۵ درصد بر میزان فنل کل اثر معنی دار داشت (جدول ۱). مقایسه میانگین اثر تنش خشکی بر میزان فنل نشان داد که بیشترین میانگین این صفت در سطح خشکی ۱۰ بار با میانگین ۶۰/۰۲ میلی گرم گالیک بر گرم وزن تر بود که در مقایسه با تیمار بدون تنش افزایش ۳۲/۰۳ درصدی داشت. کمترین میزان فنل کل در سطح خشکی صفر بار با میانگین ۴۰/۷۹ میلی گرم گالیک بر گرم وزن تر مشاهده شد (جدول ۲).

۶.۳. محتوی فلاونوئید

براساس نتایج جدول تجزیه واریانس اثر تنش خشکی بر میزان فلاونوئید در سطح احتمال ۱ درصد معنی دار بود (جدول ۱). نتایج نشان داد که تنش خشکی منجر به افزایش میزان فلاونوئید گردید؛ به طوری که بیشترین محتوی فلاونوئید در سطح خشکی ۱۰ بار با میانگین ۱۱/۵۹ میلی گرم کروسین بر گرم وزن تر به دست آمد که افزایش ۸۴/۸ درصدی در مقایسه با تیمار شاهد داشت. کمترین میانگین نیز مربوط به سطوح خشکی صفر، ۲ و ۴ بار بود (جدول ۲).

جدول ۱. تجزیه واریانس برخی صفات فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی گیاه دارویی پنیرباد تحت تنش خشکی

میانگین مربعات (MS)																	
Fv/Fm	Fv	Fo	Fm	نسبت پتاسیم به سدیم	سدیم	پتاسیم	نشتی غشاء	محتوی رطوبت نسبی	فلاونوئید	فنل	پرولین	آسکوربات	پراکسیداز	پراکسیداز	کاتالاز	درجه آزادی	منابع تغییر
۰/۰۷**	۶/۸۷**	۰/۷۱**	۳/۲۲**	۰/۰۳۰**	۴/۴۴ns	۵۲/۴**	۴۲۳/۶**	۱۱۹/۸**	۴۹/۷**	۱۳۶/۳*	۰/۳۶**	۲۰۷/۶**	۳/۴۳**	۲/۱۱**	۲/۱۱**	۵	خشکی
۰/۰۰۶	۰/۳۵	۰/۰۶	۰/۲۲	۰/۰۰۲	۱۴/۶۳	۱/۵۰	۲۰/۹	۵/۴۲	۱/۰۰	۳۱/۷	۰/۰۱	۱۴/۶۱	۰/۰۷	۰/۲۳	۰/۲۳	۱۲	خطا
۱/۱/۸۱	۱۴/۳۹	۱۳/۳۲	۷/۷۴	۱۳/۲۹	۹/۲۳	۷/۹۲	۱۳/۸۶	۳/۵۳	۲۰/۲۲	۱۱/۵۴	۱۴/۰۸	۲۱/۱۵	۱۳/۴۶	۲۳/۱۹	-	ضرب تغییرات	
(۰)																	

* و ** به ترتیب معنی دار در سطح احتمال ۵ و ۱ درصد.

Fm: فلورسانس حداکثر، Fo: فلورسانس حداقل، Fv: فلورسانس متغیر، Fv/Fm: حداکثر کارایی کوانتومی فتوسیستم

جدول ۲. اثر تنش خشکی (صفر، ۲، ۴، ۶، ۸ و ۱۰ بار) بر برخی صفات فیزیولوژیکی گیاه دارویی پنیرباد

نشستی غشاء (درصد)	محتوی رطوبت نسبی (درصد)	فلاونوئید (میلی گرم کروسیین بر گرم وزن تر)	فنل (میلی گرم گالیک اسید بر گرم وزن تر)	محتوی پرولین (میکرومول بر گرم وزن تر)	آسکوربات پراکسیداز (میلی گرم پروتئین در دقیقه بر واحد آنزیم)	پراکسیداز (میلی گرم پروتئین در دقیقه بر واحد آنزیم)	کاتالاز (واحد آنزیم بر دقیقه در میلی-گرم پروتئین)	تنش خشکی (بار)
۱۹/۲۰ ± ۲/۰۶c	۷۲/۹۲ ± ۱/۲۷ a	۱/۷۶ ± ۰/۴۶ d	۴۰/۷۹ ± ۱/۱۲ c	۰/۲۶ ± ۰/۰۲ d	۹/۶۵ ± ۱/۱۱ d	۰/۸۵۸ ± ۰/۰۹ d	۰/۵۰۲ ± ۰/۰۵ b	شاهد
۲۵/۷۶ ± ۲/۱۸bc	۷۲/۱۰ ± ۱/۰۲ab	۱/۸۶ ± ۰/۳۴ d	۴۴/۱۶ ± ۱/۲۲ bc	۰/۴۵ ± ۰/۰۴ d	۱۰/۳۹ ± ۱/۰۶ d	۱/۰۱ ± ۰/۱۰ d	۰/۵۴۰ ± ۰/۰۶ b	۲
۲۵/۴۶ ± ۳/۱bc	۶۸/۱ ± ۱/۷۵ bc	۲/۱۷ ± ۰/۵۲ d	۴۶/۵۹ ± ۱/۵ bc	۰/۶۹ ± ۰/۰۶ c	۱۴/۶۴ ± ۰/۹۶ cd	۱/۶۷ ± ۰/۱۶ c	۰/۸۲۳ ± ۰/۰۸ b	۴
۳۳/۵۰ ± ۲/۵۵b	۶۴/۷۰ ± ۲/۴۳ c	۴/۱۴ ± ۰/۲۶ c	۴۸/۸۶ ± ۰/۹۶ bc	۰/۹۲ ± ۰/۱۴ b	۱۹/۲ ± ۰/۸۲ bc	۲/۲۳ ± ۰/۲۳ b	۰/۹۷۳ ± ۰/۰۹ b	۶
۴۵/۴۳ ± ۱/۸۶a	۵۹/۶۶ ± ۳/۱۱ d	۸/۲۳ ± ۰/۷۲ b	۵۲/۰۶ ± ۲/۲۹ ab	۰/۹۹ ± ۰/۱۵ b	۲۳/۰۶ ± ۲/۱۷ b	۳/۱۶ ± ۰/۴۴ a	۱/۰۷ ± ۰/۱۱ b	۸
۴۸/۸۶ ± ۳/۲ a	۵۷/۷۳ ± ۱/۸۵ d	۱۱/۵۹ ± ۱/۱۱ a	۶۰/۰۲ ± ۲/۰ a	۱/۱۸ ± ۰/۱۹ a	۳۱/۴۲ ± ۱/۴۵ a	۳/۳۹ ± ۰/۳۸ a	۲/۷۶ ± ۰/۰۷ a	۱۰

در هر ستون اعدادی که دارای حروف مشترک اند، تفاوت معنی داری از لحاظ آزمون مقایسه میانگین چند دامنه‌ای دانکن ندارند (α=۰/۰۵).

(Fv) و حداکثر کارایی کوانتومی (Fv/Fm) معنی داری بود (جدول ۱). بیشترین Fv، Fm و Fv/Fm در سطوح خشکی صفر و ۲ بار مشاهده شد و با افزایش سطح تنش خشکی، کاهش معنی داری در میانگین این سه صفت مشاهده شد؛ به طوری که کمترین میانگین این صفات در بالاترین سطح تنش خشکی (۱۰ بار) به دست آمد. برعکس، تنش خشکی منجر به افزایش معنی داری میانگین Fv گردید به طوری که بیشترین میانگین در سطح خشکی ۱۰ بار و کمترین میانگین در سطوح خشکی صفر و ۲ بار مشاهده شد (جدول ۳).

۱.۳.۳. همبستگی ساده بین صفات

نتایج همبستگی ساده بین صفات تحت شرایط تنش خشکی در جدول ۴ ارائه شده است. براساس نتایج، فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان کاتالاز، پراکسیداز و آسکوربات پراکسیداز با هم همبستگی مثبت و معنی دار داشتند. تحت شرایط تنش یکی از پارامترهای مهم، محتوی رطوبت نسبی است، این صفت با فعالیت آنزیم‌های کاتالاز، پراکسیداز و آسکوربات پراکسیداز، محتوی پرولین، فنل کل و فلاونوئید همبستگی منفی و معنی دار داشت و با صفات محتوی پتاسیم، نسبت پتاسیم به سدیم، فلورسانس حداکثر، فلورسانس متغیر و کارایی کوانتومی همبستگی مثبت و

۱.۰.۳. غلظت سدیم

نتایج جدول تجزیه واریانس نشان داد که تنش خشکی اثر غیر معنی دار آماری بر غلظت سدیم داشت (جدول ۱). از لحاظ میانگین عددی، تنش خشکی تا سطح ۶ بار منجر به افزایش سدیم گردید ولی در سطوح ۸ و ۱۰ بار دوباره با کاهش عددی مواجه شد (جدول ۳).

۱.۱.۳. نسبت پتاسیم به سدیم

نتایج نشان داد که خشکی اثر معنی داری بر نسبت پتاسیم به سدیم در سطح احتمال ۱ درصد داشت (جدول ۱). براساس مقایسه میانگین داده‌های آزمایش، بیشترین نسبت در سطوح خشکی صفر، ۲ و ۴ بار به ترتیب با ۰/۴۵۲، ۰/۴۶۳ و ۰/۴۷۰ بود و با افزایش سطح تنش کاهش معنی داری مشاهده شد به طوری که کمترین نسبت در بالاترین سطح خشکی (۱۰ بار) با میانگین ۰/۲۳۷ مشاهده شد (جدول ۳).

۱.۲.۳. فلورسانس کلروفیل

نتایج حاصل از تجزیه و تحلیل داده‌ها نشان داد که اثر تنش خشکی بر فلورسانس حداقل (Fo)، حداکثر (Fm) و متغیر

معنی دار نشان داد. نکته قابل ذکر، میزان سدیم گیاه با هیچ یکی از پارامترهای مورد بررسی همبستگی معنی داری نداشت.

جدول ۳. اثر تنش خشکی (صفر، ۲، ۴، ۶، ۸ و ۱۰ بار) بر محتوی یون‌های سدیم و پتاسیم و فلورسانس کلروفیل گیاه دارویی پنیرباد

Fv/Fm	Fv	Fo	Fm	نسبت پتاسیم به سدیم	سدیم (میلی گرم بر گرم)	پتاسیم (میلی گرم بر گرم)	تنش خشکی (بار)
۰/۷۸۳ ± ۰/۰۲a	۵/۵۹ ± ۰/۱۲a	۱/۵۲ ± ۰/۰۶c	۷/۱۱ ± ۰/۱۶a	۰/۴۵۲ ± ۰/۰۲a	۴۰/۴۰ ± ۲/۱۸a	۱۹/۰۸ ± ۰/۴۶a	شاهد
۰/۷۹۴ ± ۰/۰۱a	۵/۴۶ ± ۰/۱۰a	۱/۴۰ ± ۰/۰۶c	۶/۸۶ ± ۰/۲۲a	۰/۴۶۳ ± ۰/۰۲a	۴۱/۲۵ ± ۱/۱۵a	۱۹/۰۲ ± ۰/۸۴a	۲
۰/۷۴۰ ± ۰/۰۴ab	۵/۰۶ ± ۰/۰۹a	۱/۷۷ ± ۰/۰۸bc	۶/۸۳ ± ۰/۴۶a	۰/۴۷۰ ± ۰/۰۱a	۴۱/۵۸ ± ۲/۲۶a	۱۹/۴۷ ± ۱/۱۲a	۴
۰/۶۳۹ ± ۰/۰۱b	۳/۷۲ ± ۰/۱۸ b	۲/۰۹ ± ۰/۰۴b	۵/۸۱ ± ۰/۳۱b	۰/۳۵۲ ± ۰/۰۲b	۴۳/۷۹ ± ۳/۰۲a	۱۵/۴۱ ± ۱/۱b	۶
۰/۶۱۰ ± ۰/۰۱b	۳/۳۲ ± ۰/۱۵b	۲/۱۲ ± ۰/۰۷b	۵/۴۴ ± ۰/۸۵b	۰/۲۷۸ ± ۰/۰۱bc	۴۰/۷۷ ± ۱/۹۴a	۱۱/۲۳ ± ۰/۷۳c	۸
۰/۳۷۰ ± ۰/۰۲ c	۱/۷۰ ± ۰/۰۹c	۲/۷۴ ± ۰/۱۱a	۴/۴۵ ± ۰/۵۲c	۰/۲۳۷ ± ۰/۰۱c	۴۰/۸۷ ± ۰/۹۴a	۹/۶۳ ± ۰/۶۱c	۱۰

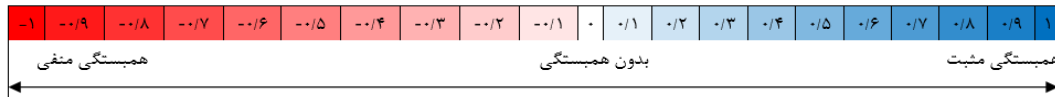
در هر ستون اعدادی که دارای حروف مشترک‌اند، تفاوت معنی داری از لحاظ آزمون مقایسه میانگین چند دامنه‌ای دانکن ندارند ($\alpha=0/05$).
Fm: فلورسانس حداکثر، Fo: فلورسانس حداقل، Fv: فلورسانس متغیر، Fv.Fm: حداکثر کارایی کوانتومی فتوسنتز

جدول ۴. ضرایب همبستگی بین صفات فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی گیاهچه‌های پنیرباد تحت تنش خشکی

۱	۲	۳	۴	۵	۶	۷	۸	۹	۱۰	۱۱	۱۲	۱۳
۱												
۰/۶۷*	۱											
*		۱										
۰/۷۲*	۰/۸۸**	۱										
*			۱									
۰/۶۸*	۰/۸۴**	۰/۹۰**	۱									
*				۱								
۰/۷۷*	۰/۷۶**	۰/۷۶**	۰/۸۰**	۱								
*					۱							
۰/۸۲*	۰/۹۲**	۰/۸۷**	۰/۸۴**	۰/۷۹**	۱							
*						۱						
-	-	-	-	-	-	۰/۹۱**	۱					
۰/۶۶*	۰/۹۷**	۰/۸۹**	۰/۹۲**	۰/۸۱**	۰/۸۱**	-	۰/۸۸**	۱				
*									۱			
۰/۶۱*	۰/۹۳**	۰/۸۷**	۰/۸۵**	۰/۶۸**	۰/۸۸**	-	۰/۸۸**	۰/۸۷**	۰/۸۶**	۱		
*											۱	
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	۰/۸۶**	۱
۰/۷۴*	۰/۸۷**	۰/۸۴**	۰/۸۰**	۰/۷۹**	۰/۹۲**	۰/۸۶**	۰/۸۶**	۰/۸۷**	۰/۸۷**	۰/۹۶**	۰/۸۵**	۰/۸۶**
*												
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
۰/۶۸*	۰/۸۵**	۰/۸۵**	۰/۷۷**	۰/۷۸**	۰/۸۶**	۰/۸۳**	۰/۸۶**	۰/۸۵**	۰/۸۵**	۰/۸۶**	۰/۸۵**	۰/۸۶**
*												
۰/۸۲*	۰/۸۸**	۰/۸۴**	۰/۸۴**	۰/۸۴**	۰/۸۹**	۰/۸۴**	۰/۸۹**	۰/۸۴**	۰/۸۸**	۰/۸۵**	۰/۸۲**	۰/۸۲**
*												
۰/۹۰*	۰/۷۹**	۰/۸۴**	۰/۸۳**	۰/۷۵**	۰/۸۵**	۰/۷۰**	۰/۸۵**	۰/۷۹**	۰/۸۳**	۰/۷۹**	۰/۷۹**	۰/۷۹**
*												

	۱	۲	۳	۴	۵	۶	۷	۸	۹	۱۰	۱۱	۱۲	۱۳	۱۴	۱۵
۱۴		۰/۹۳**	۰/۹۸**	۰/۸۶**		۰/۸۸**	-	۰/۸۹**	-	۰/۹۱**	۰/۸۴**	۰/۸۶**	۰/۸۷**	۰/۸۸**	۰/۸۷*
۱۵	۰/۹۶*		۰/۹۱**	۰/۷۹**		۰/۸۴**	-	۰/۷۹**	-	۰/۸۹**	۰/۸۰**	۰/۷۹**	۰/۸۲**	۰/۷۹**	۰/۹۶*

* و ** به ترتیب معنی دار در سطح احتمال ۵ و ۱ درصد.



۱- کاتالاز، ۲- پراکسیداز، ۳- آسکوربات پراکسیداز، ۴- پرولین، ۵- فنل کل، ۶- فلاونوئید، ۷- محتوی رطوبت نسبی، ۸- نشتی یونی، ۹- پتاسیم، ۱۰- سدیم، ۱۱- نسبت پتاسیم به سدیم، ۱۲- Fm، ۱۳- Fo، ۱۴- Fv و ۱۵- Fv/Fm ratio

۴. بحث و نتیجه گیری

خشکی از مهم ترین تنش های محیطی است و از بین عوامل محیطی تنش زاء، خشکی دومین عامل اصلی کاهش عملکرد گیاهان بعد از عوامل بیماری زا می باشد. این کاهش در نتیجه تأخیر یا عدم استقرار گیاه، تضعیف یا از بین رفتن گیاهان استقرار یافته و تغییرات فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی در سوخت و ساز گیاهان به وجود می آید (۲۲). بنابراین کشت گیاهان دارویی مقاوم به خشکی بهترین راهکار جهت استفاده از اراضی مناطق می باشد (۱۹). به دلیل تنش های زیست محیطی ناشی از خشکی، پاسخ های متابولیکی و فیزیولوژیکی و همچنین کاهش شدید جذب CO₂ به وجود خواهد آمد. در نتیجه، کاهش مصرف NADPH⁺ برای جذب CO₂ با استفاده از چرخه کالوین به طور قابل توجهی منجر به تولید استرس اکسیداتیو بزرگ و بیش از حد آنزیم های آنتی اکسیدان می شود. تنش خشکی همچنین منجر به تغییر فرایندهای متابولیک به سوی فعالیت های بیوسنتز می شود. بنابراین، بیوسنتز ایزوپرونیدها، فنل ها و آلکالوئیدها افزایش می یابد. آنزیم های کدگذاری ژنی مسیرهایی که منجر به تولید گلوکز، فروکتوز و فروکتان می شود، تبدیل فسفات سه گانه به هگزوز و فسفوریلاسیون هگزوز در برگ های تنش خشکی تنظیم می شود (۲۰).

هستند که شامل اجزای غیر آنزیمی مانند آسکوربات، گلوکاتینون، توکوفرول ها، کارتنوئیدها و فلاونوئیدها و آنزیم های مانند کاتالاز، سوپراکسید دیسموتاز، آسکوربات پراکسیداز، پراکسیداز، پلی فنل اکسیداز و گلوکاتینون ردوکتاز می باشند (۲۵). فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدان نقش مهمی را در پاک سازی گونه های اکسیژن فعال ایفا می کنند. این آنزیم ها توانایی تحمل به تنش در گیاه را افزایش می دهد و پیری را به تأخیر می اندازند (۲۵). آنزیم های آسکوربات پراکسیداز، کاتالاز و سوپراکسید دیسموتاز از سیستم های فتوسنتزی گیاهانی که در معرض تنش های محیطی قرار گرفته اند، حفاظت می کنند (۲۶). آنزیم کاتالاز نیز پراکسید هیدروژن تولید شده در مسیرهای تنفس نوری داخل پراکسی زومها را از بین می برد (۲۷). کاتالاز، یکی از آنتی اکسیدان های آنزیمی است که واکنش های زنجیره ای رادیکال های آزاد را متوقف و با حذف پراکسید هیدروژن از گیاهان در برابر تنش اکسیداتیو محافظت می کند (۲۸). در پژوهش حاضر، افزایش معنی دار میزان فعالیت آنزیم کاتالاز همراه با افزایش سطوح خشکی مشاهده شد. کاتالاز از دسته پروتئین های آهن دار محسوب می شود و هنگامی در سلول های گیاهی وارد عمل می شود که مقدار H₂O₂ در محیط زیاد باشد. کاتالاز نقش مهمی در حذف H₂O₂ در پراکسی زوم دارد. این آنزیم H₂O₂ را به H₂O و ۱/۲ O₂ تبدیل می کند. آنزیم های آنتی اکسیدانی مانند کاتالاز نقش مهمی در تحمل تنش خشکی ایفا می کنند (۲۹). فعالیت آنزیم کاتالاز از این جهت افزایش یافت تا به عنوان اسمولیت سازگار و آنزیم ضد ROSها، ضمن محافظت از ماکرو مولکول ها و غشاهای سلول، آسیب های ناشی از ROSها که در اثر تنش خشکی به وجود آمده را خنثی کنند (۲۹). آنزیم پراکسیداز به عنوان جمع کننده H₂O₂ سبب

آن‌ها تحت فشار تورژسانس می‌باشد و هر گونه کاهش در فشار تورژسانس که در نتیجه عدم تعادل در محتوی رطوبت گیاه به وجود آید، می‌تواند منجر به کاهش رشد در شرایط تنش خشکی شود (۳۵). در راستای یافته‌های این پژوهش سایر پژوهشگران نیز نتایج مشابهی گزارش کردند (۳۶). یافته‌های پژوهش حاضر نشان داد که تنش خشکی ۱۰ بار منجر به افزایش میزان نشتی غشاء شد. لیپیدها یکی از فراوان‌ترین جز غشاء می‌باشند و نقش مهمی در مقاومت سلول‌های گیاهان به تنش‌های محیطی ایفا می‌کنند. کمبود آب، سبب ایجاد اختلال در ارتباط بین چربی‌ها و پروتئین‌های غشاء و فرایندهای غشایی و همچنین انتقال مواد از خلال غشاء می‌شود (۳۷). رادیکال‌های آزاد ناشی از تنش خشکی عامل پراکسیداسیون لیپیدها و تخریب غشاء در گیاهان هستند (۳۸).

در پژوهش حاضر تنش خشکی بیش از ۶ بار منجر به افزایش سدیم و کاهش پتاسیم و نسبت پتاسیم به سدیم گردید. در همین راستا، تحقیقات نشان داد که پتاسیم موجب افزایش محتوای نشاسته، کربوهیدرات‌ها، پروتئین‌ها و افزایش سطح کاروتن در برگ ذرت می‌شود (۳۹). پتاسیم در افزایش فتوسنتز، افزایش فعالیت آنزیم‌ها، بهبود سنتز پروتئین، کربوهیدرات‌ها و روغن، زنجیره انتقال الکترون در فتوسنتز، افزایش توانایی در مقابله با آفت‌ها و بیماری‌ها نقش مهمی ایفا می‌کند (۳۹). در طی خشکی واکنش شیمیایی فتوسیستم II به شدت تحت تأثیر آب قرار می‌گیرد. در چنین شرایطی به دنبال کاهش فتوسنتز و ذخیره فراورده‌های آن، انتقال الکترون یعنی NADPH و ATP در واکنش‌های وابسته به نور در فتوسنتز، عملکرد کوانتومی فتوسیستم (PSII) کاهش پیدا می‌کند. نتایج پژوهش حاضر نشان داد که با افزایش سطوح تنش خشکی، پارامترهای Fm و حداکثر کارایی کوانتومی فتوسیستم II برای تبدیل انرژی نور جذب شده به انرژی شیمیایی کاهش می‌یابد. F0 بیانگر سطحی از فلورسانس در زمانی است که پذیرنده کوئینون آ (QA) در بالاترین مقدار شرایط اکسیداسیونی قرار دارد (مرکز فتوسیستم II باز هستند). در حقیقت F0 هر چه کمتر باشد، بدین معناست که فعالیت‌های فتوسنتزی به نحو مطلوب‌تری در جریان هستند و تثبیت کربن یا به عبارتی انتقال الکترون سریع‌تر آغاز شده است (۴۰). وقتی همه مراکز واکنشی فتوسیستم II بسته است، نشان‌دهنده افزایش تدریجی عملکرد فلورسانس و کاهش سرعت واکنش‌های فتوشیمیایی است و هرچه سیستم دیرتر بسته

افزایش تحمل به تنش اکسیداتیو می‌شود. افزایش فعالیت آنزیم پراکسیداز در گیاهچه‌ها در این مطالعه را می‌توان به دخالت این آنزیم در تعدادی از فرایندهای سلولی مانند سازوکار دفاعی میزبان، اتصال عرضی مونومرهای گلیکوپروتئین‌های غنی از هیدروکسی، پرولین موجود در دیواره سلولی، اتصال عرضی پلی‌ساکاریدهای پکتیکی به وسیله اسیدهای فنولیک در دیواره سلولی و عمل چوبی شدن و چوب پنبه‌ای شدن مربوط دانست (۳۰). در بررسی‌هایی که بر روی برنج در مرحله نشائی انجام شد، مشخص گردید که افزایش فعالیت پراکسیداز در گیاهان تحت تنش خشکی با واکنش‌های تولیدکننده رادیکال‌های آزاد و پراکسیدهای آلی همبستگی دارد و پراکسیداز نقش مؤثری در پاک‌سازی پراکسید هیدروژن دارد (۳۱).

ترکیب‌های فنولی شامل گروه بزرگی از متابولیت‌های ثانویه هستند که بسیاری از ترکیب‌های حلقوی مثل ترکیب‌های فنل، فلاون‌ها، فلاونوئیدها، تانن‌ها و لیگنین‌ها و حتی اسیدآمین‌های حلقوی مثل تریپتوفان، تیروزین و پرولین را شامل می‌شوند. این ترکیب‌ها دارای نقش‌های متعدد اکولوژیکی و فیزیولوژیکی نظیر نقش دفاعی و آنتی‌اکسیدانی می‌باشند (۳۲). در پژوهش حاضر افزایش سطوح تنش خشکی منجر به افزایش محتوی پرولین، فنل و فلاونوئید گردید؛ به طوری که بیشترین میزان این متابولیت‌های ثانویه در سطح خشکی ۱۰ بار مشاهده شد. افزایش غلظت فنل‌ها در از بین بردن رادیکال‌های آزاد و مهار پراکسیداسیون لیپیدها مؤثر است (۳۳). در مطالعات بسیاری، ارتباط مثبت بین محتوی فنولی و فعالیت آنتی‌اکسیدانی گزارش شده است و از جمله مکانیسم‌های فعالیت آنتی‌اکسیدانی این ترکیبات غیرفعال کردن رادیکال‌های آزاد لیپیدی و جلوگیری از تجزیه هیدروپروکسیدها به رادیکال‌های آزاد و نیز توانایی آن‌ها در کلات کردن یون‌های فلزی، بیان شده است. پژوهشگران بیان داشتند که تحمل برخی از گیاهان در مقابل تنش‌های محیطی از جمله خشکی می‌تواند مربوط به تجمع ترکیبات فنلی در این گیاهان باشد. یکی از ویژگی‌های مهم ترکیبات فنلی خاصیت آنتی‌اکسیدانی است که با گروه‌های هیدروکسیلی در ساختار مولکولی آن‌ها در ارتباط است (۳۴).

در پژوهش حاضر با افزایش تنش خشکی محتوی نسبی رطوبت به صورت معنی‌دار در مقایسه با تیمار عدم تنش کاهش نشان داد. اثر تنش خشکی روی توسعه دیواره سلولی بیشتر است، زیرا لازمه طویل شدن سلول‌ها انعطاف‌پذیری

آسیب دیدن چرخه تنظیم آب و یا انتقال الکترون‌ها در فتوسیستم II باشد (۴۱).
به‌طور کلی، نتایج حاصل از پژوهش حاضر نشان داد که گیاه دارویی پنیرباد از تحمل مطلوبی در برابر القای تنش خشکی با پلی اتیلن گلیکول دارد. مکانیسم‌های آنزیمی و غیرآنزیمی همچون فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان و فنل و فلاونوئید و غیره منجر به ایجاد تحمل مطلوب در این گیاه گردید. کاهش بسیار کم در میزان رطوبت نسبی و محتوی بالای پتاسیم در گیاه دارویی پنیرباد تحت شرایط تنش خشکی بالا از دلایل مهم تحمل بالای این گیاه می‌باشد.

شود؛ یعنی قادر باشد تعداد الکترون‌های بیشتری را بپذیرد، Fm آن بالاتر یا سیستم کارتر خواهد بود. در حقیقت، افزایش فلورسانس از FO به Fm به علت کاهش QB و مخزن بزرگی از پلاستوکوئینون می‌باشد. همچنین پارامتر Fv/Fm به‌عنوان یک ابزار مؤثر در کشف آسیب‌های وارده به دستگاه فتوسنتزکننده قبل از آشکار شدن آن در مورفولوژی گیاه ارزیابی می‌شود و شاخص مناسبی برای بازدارندگی نوری است (۴۰). Li و همکاران (۲۰۱۳) نیز نتایج مشابهی مبنی بر کاهش Fv/Fm گزارش کردند. همچنین گزارش شده است که کاهش نسبت Fv/Fm و Fm تحت تنش خشکی در گیاه لوبیا ممکن است ناشی از

References

- Valizadeh M. Evaluation of different masses of chewable medicinal herbs and in vitro production and anti-cancer potential of VITAFRINE A: Ferdowsi University of Mashhad; 2015;1:1-5.
- Kaykha Z, Valizadeh M, Valizadeh J, Taheri KH. Studying the quantity and quality of fatty acids in the seeds of *Withania coagulans* (Stocks) Dun. and *Withania somnifera* (L.) Dun. collected from different habitats of Sistan and Baluchestan. *Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants*. 2012; 33:730-740.
- Ghahremani A, Ganji-Moghadam E, Tatari M, Khosroyar S. Physiological responses of paneer-booti (*Withania coagulans* Dunal) to nacl stress under tissue culture conditions. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*. 2019; 47(4):1365-1373.
- Kazempour N, Salehi Inchebron M, Valizadeh J, Sepehrimanesh M. Clotting characteristics of milk by *Withania coagulans*: Proteomic and biochemical study. *International Journal of Food Properties*. 2017; 20(6):1290-301.
- Esmailzadeh Behabadi S, Sharifi M. Increasing the production of plant secondary metabolites using biotic elicitors. *Journal of Cell & Tissue*, 2013; 4(2):119-128.
- Larcher W. *Physiological Plant Ecology*. Springer-Verlag. New York. 1995.
- Ali A, Maher S, Khan SA, Chaudhary MI, Musharraf SG. Sensitive quantification of six steroidal lactones in *Withania coagulans* extract by UHPLC electrospray tandem mass spectrometry. *Steroids*. 2015; 104:176-181.
- Prasad SK, Kumar R, Patel DK, Hemalatha S. Wound healing activity of *Withania coagulans* in streptozotocin-induced diabetic rats, *Pharm. Biol.* 2010; 48: 1397-1404.
- Gamoh K, Hirayama M, Ikekawa N. Stereocontrolled synthesis of Withanolide D and related compounds. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions*. 1984; 1:449-54.
- Kannan N, Kulandaivelu G. Novel method to isolate Withaferin A from *Withania somnifera* roots and its bioactivity. *Allelopathy Journal*. 2007; 20(1): 213-20.
- Sangwan R, Chaurasiya N, Misra L, Lal P, Uniyal G, Sharma R, et al. Phytochemical variability in commercial herbal products and preparations of *Withania somnifera* (Ashwagandha). *Current Science*. 2004; 10: 461-5.
- Sunohara Y, Matsumoto H. Oxidative injury induced by the herbicide quinclorac on *Echinochloa oryzicola* Vasing and the involvement of antioxidative ability in its highly selective action in grass species. *Plant Science*. 2004; 167(3): 597-606.
- Khunpon B, Suriyan C-U, Faiyue B, Uthaibutra J, Saengnil K. Regulation on antioxidant defense system in rice seedlings (*Oryza sativa* L. ssp. indica cv. Pathumthani 1) under salt stress by paclobutrazol foliar application. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*. 2019; 47(2): 368-77.
- Shahverdi MA, Omidi H, Tabatabaei SJ. Stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni) responses to NaCl stress: Growth, photosynthetic pigments, diterpene glycosides and ion content in root and shoot. *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences*, 2019; 18:355-360.
- Aghighi Shahverdi M, Omidi H, Tabatabaei SJ. Effect of nutri-priming on germination indices and physiological characteristics of stevia seedling under salinity stress. *Journal of Seed Science*. 2017; 39:353-362.
- Blainski A, Lopes G, de Mello J. Application and analysis of the folin ciocalteu method for the determination of the total phenolic content from *Limonium brasiliense* L. *Molecules*. 2013; 18(6): 6852-65.
- Maghsoudi Moud A, Heravi M. Salt stress effects on seedling growth rate and sodium, potassium, and calcium ions content of wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars. *JCPP*. 2015; 5(15):115-128.
- Afshar Mohamadian A., Omidipour M. and Jamal Omidi F. Effect of different drought stress levels on content and chlorophyll fluorescence indices of two bean cultivars (*Phaseolus vulgaris* L.). *Journal of Plant Research*, 2019; 31(3): 511-525.
- Enders ALJ. Comparison of wet-digestion and dry-ashing methods for total elemental analysis of biochar. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*. 2012; 43(7): 1042-52.
- Aghighi Shahverdi M, Omidi H, Tabatabaei SJ. Stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni) responses to NaCl stress: Growth, photosynthetic pigments, diterpene glycosides and ion content in root and shoot. *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences*. 2019; 18(4):355-360.
- Abdeshahian M, Nabipour M, Meskarbashee M. Chlorophyll fluorescence as criterion for the diagnosis salt stress in wheat (*Triticum aestivum*) plants. *Int J Chem Biol Eng*. 2010; 4: 184-6.
- Chai Q, Gan Y, Zhao C, Xu HL, Waskom RM, Niu Y, Siddique KH. Regulated deficit irrigation for crop production under drought stress. A review. *Agronomy for Sustainable Development*. 2016; 36: 1-21.
- Biglouei M, Assimi M, Akbarzadeh A. Effect of water stress at different growth stages on quantity and quality traits of Virginia (flue-cured) tobacco type. *Plant, Soil and Environment*. 2010; 56(2): 67-75.
- Singh R, Gupta P, Khan F, Singh SK, Mishra T, Kumar A, et al. Modulations in primary and secondary metabolic pathways and adjustment in physiological behaviour of *Withania somnifera* under drought stress. *Plant Science*. 2018; 272: 42-54.
- Agarwal S, Pandey V. Antioxidant enzyme responses to NaCl stress in *Cassia angustifolia*. *Biology Plant*. 2004; 48: 555-560.

- [26]. 26. Cavalcanti FR, Oliveira JT, Martins-Miranda A, Viegas AS, Silveira RA. Superoxide dismutase, catalase and peroxidase activities do not confer protection against oxidative damage in saltstressed cowpea leaves. *New Phytol.* 2004; 163: 563-571.
- [27]. Mittler R. Oxidative stress, antioxidant and stress tolerance. *Trend in Plant Science.* 2002; 7(9): 405-415.
- [28]. 28. Rukmini MS, Benedicta DS, Vivan DS. Superoxide dismutase and catalase activities and their correlation with malon dialdehyde in schizophrenic patients. *Clinical Biochemistry.* 2004; 19: 114-118.
- [29]. Hameed A, Goher M, Iqbal N. Drought induced programmed cell death and associated changes in antioxidants, proteases and lipid peroxidation in wheat leaves. *Biologia Plantarum.* 2013; 57(2): 370-374.
- [30]. Reddy AR, Kolluru VC, Munusamy V. Drought-induced responses of photosynthesis and antioxidant metabolism in higher plants. *Journal of Plant Physiology* 2004; 11: 1189-1202.
- [31]. Sharma P, Jha AB, Dubey SS, Pessarakli M. Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions. *Journal of Botany,* 2012; 26:1-10.
- [32]. André CM, Schafleitner R, Legay S, Lefèvre I, Aliaga CAA, Nomberto G, Hoffmann L, Hausman JF, Larondelle Y, Evers D. Gene expression changes related to the production of phenolic compounds in potato tubers grown under drought stress. *Phytochemistry.* 2009; 70(9): 1107-1116.
- [33]. Blasco BA, Leyva R, Romero L, Ruiz JM. Iodine effects on phenolic metabolism in lettuce plants under salt stress. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 2013; 61:2591-2596.
- [34]. Halliwell B, Gutteridge JM. *Free radicals in biology and medicine.* Oxford University Press, USA. 2015.
- [35]. Farooq MWA, Kobayashi N, Fujita D, Basra SM. *Plant drought stress: effects, mechanisms and management.* *Agron. Sustain Dev.* 2009; 29: 185-212.
- [36]. Jiang Y, Huang B. Protein alternations in tall fescue in response to drought stress and abscisic acid. *Crop Science.* 2002; 42: 202-207.
- [37]. Rahdari P, Hoseini SM. Drought stress: a review. *International Journal of Agronomy and Plant Production.* 2012; 3: 443-446.
- [38]. Nair AS, Abraham T, Jaya D. Studies on the changes in lipid peroxidation and antioxidants in drought stress-induced cowpea (*Vigna unguiculata* L.) varieties. *Journal Environment Biology.* 2008; 29: 689-691.
- [39]. Perry TW, Rhykerd CL, Holt DA, Mayo HH. Effect of potassium fertilization on chemical characteristics, yield and nutritive value of corn silage. *Journal of Animal Science.* 2011; 34: 642-646.
- [40]. Tilahun A, Sven S. Mechanisms of drought resistance in grain: PSII stomatal regulation and root growth. *Ethiopian Journal of Science.* 2003; 26: 137-144.
- [41]. Li GL, Wu HX, Sun YQ, Zhang SY. Response of chlorophyll fluorescence parameters to drought stress in sugar beet seedlings. *Russian Journal of Plant Physiology.* 2013; 60: 337-342.

Effect of drought stress (polyethylene glycol) on antioxidant and some physiological traits of Paneer-boot (*Withania coagulans Dunal*)

Aysan Ghahremani¹, Ebrahim Ganji-Moghadam^{2*}, Maryam Tatari³, Sosan Khosroyar⁴

1. Ph.D. student, Department of Horticultural Sciences, Shirvan Branch, Islamic Azad University, Shirvan, Iran
2. Associate Professor, Crop And Horticultural Science Research Department, Khorasan Agricultural and Natural Resources Research and Education Center, Areeo Mashhad, Iran
3. Assistant Professor, Department of Agronomy, Shirvan Branch, Islamic Azad University, Shirvan, Iran.
4. Assistant Professor, Department of Chemical Engineering, Quchan Branch, Islamic Azad University, Quchan, Iran

Abstract

Introduction: Paneer-boot, with its antifungal and antibacterial effects, blood sugar and cholesterol-lowering, immune system, and antioxidant activity, has recently received pharmacologists' attention due to its high compatibility. Due to difficult ecological conditions, it can grow in the country's tropical regions such as Sistan and Baluchestan Province.

Materials & Methods: This study was designed in a completely randomized design with four replications under laboratory conditions at Khorasan Razavi Agricultural and Natural Resources Research and Education Center. Concentrations of 0, 2, 4, 6, 8, and 10 bar PEG were used to induce the effect of drought stress on MS medium containing BAP on secondary traits of cheese .

Results: The results showed that the drought stress significantly increased antioxidant enzymes such as catalase, peroxidase, ascorbate peroxidase, proline, phenol, and flavonoid content membrane leakage. On the other hand, it resulted in a significant decrease in the relative humidity content, potassium ion content and potassium to sodium ratio. Also, most of the studied traits had a significant correlation.

Conclusion: The results showed that the Paneer-boot plant had acceptable tolerance to induction of drought stress with polyethylene glycol. Enzymatic and non-enzymatic mechanisms had a significant role in reducing the adverse effects of drought stress. On the other hand, drought stress increased some metabolites, such as phenol and flavonoids, which have medicinal uses.

Received: 2019/12/24

Accepted: 2020/04/05

Keywords: Proline, Paneer-boot, Antifungal, Flavonoid, Catalase.