تاثیر محلول‌پاشی آسکوربات و متانول بر مکانیسم‌های دفاعی، عملکرد دانه و روغن سیاه‌دانه (*Nigella sativa* L.) در شرایط تنش کم آبیاری

مجتبی برادران فیروزآبادی[۱]، مهدی برادران فیروزآبادی*[۲]، مهدیه پارسائیان[۳]

۱. کارشناس ارشد گیاهان دارویی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج

۲. استادیار گروه زراعت، دانشگاه شاهرود

۳. استادیار گروه زراعت، دانشگاه شاهرود

* مسوول مکاتبه: m.baradaran.f@gmail.com

تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۱۰/٦ تاریخ پذیرش: ۱۳۹٤/۲/۱۰

چکیده

امروزه کاربرد برگی ترکیبات مختلف به منظور کاهش اثرات منفی تن ش‌های محیطی مطرح شده است که آسکوربات و متانول از جمله آن‌هاست. بدین منظور جهت بررسی اثرات ترکیبات یاد شده بر مکانیسم‌های دفاعی و عملکرد دانه و روغن سیاه‌دانه آزمایشی در سال ۱۳۹۰ به صورت اسپلیت پلات فاکتوریل در قالب طرح پایه بلوک‌های کامل تصادفی در سه تکرار در مزرعه تحقیقاتی دانشکده کشاورزی دانشگاه شاهرود انجام شد. فاکتور اصلی شامل دو سطح آبیاری (عدم تنش و تنش کم‌آبی) و فاکتورهای فرعی شامل سه سطح محلول‌پاشی متانول در غلظت‌های (صفر، ۱۵ و ۳۰ درصد حجمی- حجمی) و آسکوربات در غلظت‌های (صفر، ۱۰ و ۲۰ میلی‌مولار) بود. نتایج نشان داد که عملکرد دانه تحت تاثیر تنش کم‌آبی کاهش یافت. با این حال، افزایش غلظت محلول‌پاشی با متانول سبب بهبود این صفت در هر دو شرایط تنش و عدم تنش گردید. متانول در شرایط تنش میزان روغن دانه را به طور قابل توجهی افزایش داد. بیشترین درصد روغن دانه از ترکیب تیماری آبیاری هشت روز و متانول ۱۵ درصد حجمی- حجمی حاصل گردید. بالاترین فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسمیوتاز و میزان مالون‌دی‌آلدئید از شرایط تنش کم‌آبیاری حاصل گردید. با محلول‌پاشی آسکوربات آنزیم‌های آسکوربات پراکسیداز و کاتالاز افزایش و مقدار پراکسید هیدروژن روند کاهشی را نشان دادند و با کاربرد متانول در شرایط تنش، آنزیم سوپراکسید دیسمیوتاز و میزان مالون‌دی آلدئید و پراکسید هیدروژن کاهش یافتند و این به مفهوم مهار تنش توسط تیمارهای یاد شده است.

واژه‌های **کلیدی:** آسکوربات، آنتی اکسیدانت، تنش کم‌آبیاری، سیاه‌دانه، متانول

مقدمه

سیاه‌دانه (*Nigella sativa* L.) گیاهی یک‌ساله است که ۳۰ تا ٤۰ درصد وزن دانه سیاه رنگ آن را روغن تشکیل می‌دهد و آثار ضداکسایشی، ضد التهابی، تقویت‌کننده سیستم ایمنی و آنتی هیستامینی روغن و عصاره دانه این گیاه، خواص دارویی متعددی را برای آن به ثبت رسانده است (علی و بلاندن، ۲۰۰۳ و جزایری، ۲۰۰٤). این گیاه نیز مانند سایر گیاهان ممکن است که در دوره رشد خود با انواع تنش‌های محیطی روبرو شود که در نهایت به کاهش عملکرد و کیفیت محصول منجر می‌گردد. در بین تنش‌های محیطی، خشکی یکی از مهمترین عوامل محدودکننده رشد گیاهان است که واکنش‌های بیولوژیکی و فیزیولوژیکی

متعددی را در گیاهان القا می‌کند. یکی از تغییرات بیوشیمیایی که در تنش‌های محیطی از جمله تنش کم‌آبی رخ می‌دهد، تولید انواع اکسیژن فعال (ROS) در پی بسته شدن زنجیر انتقال الکترون کلروپلاستی و کاهش نسبت $NADP^+/NADPH,H^+$ است (گارات و همکاران، ۲۰۰۲). رادیکال سوپراکسید، پراکسید هیدروژن و رادیکال هیدروکسیل از مهمترین انواع اکسیژن فعال هستند که تولید آن‌ها به هنگام تنش کم‌آبی افزایش می‌یابد. انواع اکسیژن فعال به دلیل پتانسیل ردوکس بالا از میل الکترون‌خواهی بالایی برخوردارند و این ویژگی سبب آسیب آن‌ها به بیومولکول‌های حیاتی مانند اسیدهای نوکلئیک، لیپیدها و پروتئین می‌گردد که به ترتیب موجب جهش در توالی نوکلئوتیدها، پراکسیداسیون لیپیدی و دناتوره شدن ترکیبات یاد شده می‌گردد. برآیند این آسیب‌ها سبب اختلال متابولیسمی و در نهایت بروز تنش اکسیداتیو خواهد شد (ژانگ و همکاران، ۲۰۰۳).

سلول‌های گیاهی برای مقابله با اثرات منفی ناشی از انواع اکسیژن فعال به مکانیسم‌های دفاعی ویژه‌ای متشکل از آنتی‌اکسیدانت‌ها (آسکوربات، گلوتاتیون، آنتوسیانین، فلاونوئیدها و برخی دیگر) و آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت (سوپراکسید دیسمیوتاز، کاتالاز،آسکوربات پراکسیداز و برخی دیگر) مجهز هستند. از همکاری آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت و آنتی‌اکسیدانت‌ها، چرخه‌های گلوتاتیون-آسکوربات، مهلر و گزانتوفیل به‌وجود می‌آیند که مانع از تولید انواع اکسیژن فعال می‌شود و یا آن‌ها را به‌طور کامل احیا و به آب تبدیل می‌کند (اسفندیاری و همکاران، ۱۳۸۸). آسکوربات به عنوان آنتی‌اکسیدانتی بسیار قوی با احیای رادیکال‌های آزاد موجب بازدارندگی فعالیت آن‌ها می‌شود و نقش بسیار مهمی در مسیر آسکوربات-گلوتاتیون و حذف اکسیژن‌های واکنش‌گر در کلروپلاست و سیتوسول دارد (فچ کریستوفرز و همکاران، ۲۰۰۳). بنابر تحقیقات انجام شده، محلول‌پاشی آسکوربات عوارض تنش کم‌آبی را کاهش می‌دهد و سبب افزایش تولید در شرایط طبیعی و تنش می‌گردد. به‌طوری که قربانلی و همکاران (۲۰۱۰) گزارش کردند که محلول‌پاشی آسکوربات اثر جبران‌کننده قابل ملاحظه‌ای بر پارامترهای رشدی سیاه‌دانه دارد. در پژوهشی که توسط کریما و سلاما (۲۰۰۹) در پیاز و امام و هلال (۲۰۰۸) در کتان انجام شد، محلول‌پاشی آسکوربات توانست با افزایش ظرفیت آنتی‌اکسیدانتی گیاه، پایداری بیشتر غشای پلاسمایی را به ویژه در سطح بالای تنش شوری به‌وجود آورد. با این حال، پاسخ گونه‌های گیاهی مختلف به کاربرد خارجی این ترکیب و نیز غلظت موثر آن بسیار متنوع است.

علاوه بر آسکوربات، کاربرد ترکیباتی نظیر متانول نیز از راه‌کارهای دیگر کاهش آثار تنش کم‌آبی و تثبیت عملکرد گیاهان است. گیاهان می‌توانند متانول محلول‌پاشی شده روی برگ‌ها را که در مقایسه با CO_2 مولکول کوچکتری است، به‌راحتی جذب کنند و آن را به‌عنوان منبع کربنی اضافه بر کربن اتمسفر مورد استفاده قرار دهند (گوت، ۲۰۰۰). از آثار مثبت محلول‌پاشی متانول می‌توان به افزایش رشد، بیوماس و افزایش تثبیت CO_2 درگیاهان تحت تنش اشاره کرد (میرآخوری و همکاران، ۲۰۰۹). نونومرا و بنسون (۱۹۹۲) افزایش رشد به‌وجود آمده بر اثر محلول‌پاشی متانول را در هندوانه ۳۶ درصد، در پنبه، گوجه فرنگی و گل کلم ۵۰ درصد و در توت فرنگی ۶۰ درصد گزارش کردند. همچنین، محلول‌پاشی این ماده افزایش شاخص سطح برگ، رشد و عملکرد نیام و دانه در بادام‌زمینی (صفرزاده ویشگاهی و همکاران، ۲۰۰۵) و افزایش ۱۶ تا ۲۲ درصدی عملکرد سویا را به دلیل بهبود ظرفیت فتوسنتزی گیاه در مرحله رشد زایشی، به دنبال داشته است (لی و همکاران، ۱۹۹۵).

از آن جایی که استفاده از روش‌هایی با اثرگذاری سریع بلافاصله پس از بروز تنش در گیاهان کمک شایانی به

کاهش صدمات وارده ناشی از تنش می‌کند، این‌گونه استنباط می‌شود که شاید بتوان با محلول‌پاشی ترکیباتی نظیر آسکوربات و متانول که آثار مثبتی در گیاه دارند، هزینه‌های گیاه را در شرایط تنش کاهش داد و به شرایط نرمال نزدیک شد. بنابراین، در این پژوهش چگونگی واکنش گیاه سیاه‌دانه به محلول‌پاشی این ترکیبات در هر دو شرایط عدم تنش و حضور تنش کم آبی به عنوان هدف آزمایش مطرح و مورد آزمون قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

این پژوهش در سال ۱۳۹۰ در مزرعه تحقیقاتی دانشگاه شاهرود به اجرا درآمد. آزمایش به صورت اسپلیت پلات فاکتوریل با طرح پایه بلوک‌های کامل تصادفی در ۳ تکرار روی گیاه سیاه‌دانه انجام شد. فاکتور اصلی شامل دو سطح آبیاری (دور آبیاری ۸ روز و ۱۶ روز به ترتیب به عنوان عدم تنش و تنش کم‌آبی) و فاکتورهای فرعی شامل سه سطح آسکوربات (صفر، ۱۰ و ۲۰ میلی‌مولار) و سه سطح متانول (صفر، ۱۵ و۳۰ درصد حجمی- حجمی) بودند. در این آزمایش در مجموع ٥٤ کرت کشت گردید که هر کرت شامل ٤ خط ٥ متری با فاصله روی ردیف ۱۰ سانتی‌متر و بین ردیف ٥٠ سانتی‌متر بود. تیمارهای آبیاری پس از استقرار بوته‌ها اعمال شدند. محلول‌پاشی آسکوربات و متانول با غلظت‌های تعیین شده در ٤٥ روز پس از کاشت انجام شد که ۱۰ روز بعد از این تاریخ دوباره تکرار شد. از هر کرت تعداد ۱۵ بوته درگیر در رقابت با در نظر گرفتن حاشیه برای تعیین عملکرد برداشت گردید. میزان روغن نمونه‌های ۲ گرمی با استفاده از دستگاه سوکسله اندازه‌گیری شد.

استخراج آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت:

به منظور استخراج آنزیم‌های کاتالاز و سوپراکسید دیسمیوتاز، ۰/۵ گرم از نمونه‌های برگی با استفاده از نیتروژن مایع درون هاون چینی سرد یکنواخت گردیدند. سپس، ٥ میلی‌لیتر بافر فسفات سرد با pH =۷/۵ محتوی ۰/۵ میلی‌مولار EDTA به آن اضافه شد. همگنای به‌دست آمده پس از انتقال به لوله‌های آزمایش در g ۱۵۰۰۰ و دمای ٤°C به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شدند. جهت پیشگیری از آثار مضر انجماد و ذوب متوالی، روشناور حاصل به دو قسمت تقسیم و تا زمان سنجش فعالیت آنزیم‌ها در دمای ۲۰°C- نگهداری گردیدند. جهت حفظ ساختار و پایداری آنزیم آسکوربات پراکسیداز که فعالیت خود را در مدت زمان کمی در محیط خارج از سلول حفظ می‌کند، به محلول استخراج این آنزیم علاوه بر ترکیبات فوق، پلی وینیل پیرولیدین (٥٪) و آسکوربات ۲ میلی‌مولار اضافه شد (اسفندیاری وهمکاران، ۲۰۰۷).

سنجش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت:

اساس سنجش فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسمیوتاز، مهار واکنش رادیکال سوپراکسید با نیتروبلوتترازولیوم و ممانعت از تشکیل سوپراکسید- نیتروبلوتترازولیوم است. ۳ میلی‌لیتر از کمپلکس واکنش که حاوی۰/۰۱ میلی‌لیتر از نیتروبلوتترازولیوم (NBT) ۲/۲۵ میلی‌مولار، ۰/۱ میلی‌لیتر از متیونین ۲۰۰ میلی‌مولار، ۰/۱ میلی‌لیتر از EDTA ۳ میلی-مولار، ۱/۵ میلی‌لیتر از بافر فسفات پتاسیم ۰/۱ مولار و ۱ میلی‌لیتر آب دوبار تقطیر و ۰/۰۵ میلی‌لیتر از آنزیم استخراجی بود، مورد استفاده قرار گرفت. لوله‌های آزمایش بدون آنزیم سوپراکسید دیسمیوتاز به‌عنوان شاهد مورد استفاده قرار گرفت. واکنش با اضافه کردن ۰/۱ میلی‌لیتر از ریبوفلاوین ٦٠ میکرومولار و قرار دادن لوله‌های آزمایش در زیر لامپ فلورسنت ۱۵ وات (به مدت ۱۵ دقیقه) شروع شد و با شروع تاریکی متوقف گردید. از کمپلکس واکنشی بدون آنزیم که به مدت ۱۵ دقیقه در نور قرار گرفته بود، برای ارزیابی توان تولید کمپلکس سوپراکسید- نیتروبلوتترازولیوم و به‌عنوان معیار سنجش فعالیت آنزیمی استفاده شد. همچنین، از کمپلکس واکنشی کامل دیگری که

از ابتدا در تاریکی مطلق قرار گرفته بود، به عنوان blank استفاده گردید. پس از توقف واکنش میزان جذب نمونه‌ها در طول موج ٥٦٠ نانومتر قرائت شد (سن گوپتا و همکاران، ۱۹۹۳).

فعالیت آنزیم کاتالاز بر طبق روش ابی (١٩٨٤) اندازه گیری گردید. کمپلکس واکنش دارای ۱/۵ میلی‌لیتر از بافر پتاسیم فسفات ۱۰۰ میلی‌مولار با pH=۷، ۰/۵ میلی‌لیتر از پراکسید هیدروژن ۷/۵ میلی‌مولار و ۵۰ میکرولیتر از محلول آنزیمی بود. حجم نمونه‌ها با اضافه کردن آب مقطر به ۳ میلی‌لیتر رسانده شد. با افزودن پراکسید هیدروژن واکنش آغاز شد و کاهش در جذب نمونه‌ها در طول موج ٢٤٠ نانومتر در مدت یک دقیقه ثبت گردید. فعالیت آنزیمی با استفاده از ضریب خاموشی $mmol^{-1}$ cm^{-1} ٣٦ محاسبه شد. عدد حاصل میزان فعالیت آنزیم براساس واحد آنزیمی بر میلی‌گرم پروتئین در دقیقه را نشان می‌دهد.

فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز از طریق بررسی میزان اکسیداسیون آسکوربات به روش یوشیمورا و همکاران (۲۰۰۰) اندازه‌گیری شد. یک میلی‌لیتر از کمپلکس واکنش حاوی۲۵۰ میکرولیتر بافر فسفات ۱۰۰ میلی‌مولار با pH=۷، ۲۵۰ میکرولیتر آسکوربات ۱ میلی‌مولار، ۲۵۰ میکرولیتر ٠/٤EDTA میلی‌مولار، ۱۰ میکرولیتر پراکسید هیدروژن ۱۰ میلی‌مولار، ۱۹۰ میکرولیتر آب دو بار تقطیر و ۵۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی استخراج شده بود. با اضافه شدن پراکسید هیدروژن فعالیت آنزیمی شروع گردید. تغییرات جذب کمپلکس واکنش در طول موج ۲۹۰ نانومتر شروع و پس از یک دقیقه یادداشت شد. سپس، با استفاده از ضریب خاموشی $cm^{-1}mmol^{-1}$ ۲/۸ میزان فعالیت آنزیم محاسبه گردید. عدد حاصل میزان فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز را براساس میکرومول آسکوربات اکسید شده در دقیقه نشان می‌دهد.

استخراج و سنجش میزان پراکسیداسیون لیپیدی و پراکسید هیدروژن:

میزان مالون‌دی آلدئید یا پراکسیداسیون لیپیدی براساس روش استوارت و بولی (۱۹۸۰) اندازه‌گیری شد. ۰/۵ گرم از برگ در ۱۰ میلی‌لیتر از محلول ۰/۱ درصد تری-کلرواستیک اسید همگن شد و همگنای حاصل به مدت ۱۰ دقیقه با دور g ۱۵۰۰۰سانتریفیوژ گردید. ۲ میلی‌لیتر از روشناور حاصل با ٤ میلی‌لیتر از محلول ۲۰ درصد تری‌کلرواستیک‌اسید حاوی ۰/۵ درصد تیوباربیتوریک اسید (TBA) مخلوط شد. کمپلکس حاصل به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری و سپس، به حمام آب سرد منتقل گردید. نمونه‌ها دوباره به مدت ۱۰ دقیقه در ۱۰۰۰۰g سانتریفیوژ شدند. میزان جذب نمونه‌ها در طول موج‌های ۵۳۲ و ٦٠٠ نانومتر ثبت گردید. از اختلاف بین موج‌های جذبی و ضریب خاموشی $cm^{-1}mmol^{-1}$ ۱۵۵ برای محاسبه میزان پراکسیداسیون لیپیدی براساس نانومول بر گرم وزن تر برگ استفاده شد.

برای سنجش میزان پراکسید هیدروژن، ۰/۵ گرم از هر نمونه برگی در ۵ میلی لیتر محلول ۰/۱ درصد تری کلرواستیک اسید (وزنی- حجمی) همگن گردید. سپس، همگنای حاصل در دور ۱۲۰۰۰g به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شد. کمپلکس واکنش شامل ۰/۵ میلی‌لیتر روشناور، ۰/۵ میلی‌لیتر بافر فسفات ۱۰ میلی‌مولار با pH=۷ و یک میلی لیتر یدید پتاسیم ۱ مولار بود که میزان جذب آن در طول موج ۳۹۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. میزان پراکسید هیدروژن در نمونه‌های برگی با استفاده از منحنی استاندارد به‌دست آمد (سرگیو و همکاران،۱۹۹۷)

تجزیه داده‌ها با استفاده از نرم افزارهای SAS 9.1 و MSTATC و رسم نمودارها توسط نرم افزار EXCEL انجام شد. مقایسه میانگین با استفاده از آزمون LSD در سطح احتمال ۵ درصد صورت گرفت.

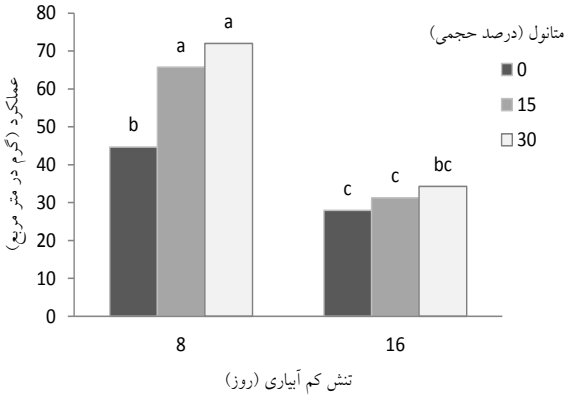
نتایج و بحث

عملکرد دانه: میزان عملکرد در شرایط عدم تنش ۹۵/۱ درصد بیشتر از شرایط تنش کم‌آبی بود (شکل۱). محلول‌پاشی با متانول ۳۰ درصد حجمی- حجمی در شرایط تنش میزان عملکرد دانه را ۲۲ درصد بهبود بخشید، در حالی که در شرایط عدم تنش، استفاده از متانول ۱۵ و ۳۰ درصدحجمی- حجمی به ترتیب ۴۷/۱ و ۶۱/۱ درصد افزایش عملکرد را در پی داشت (شکل۱). به نظر می‌رسد که کاربرد متانول موجب افزایش دسترسی گیاه به کربن حاصل از تجزیه متانول و بهبود تثبیت دی‌اکسید کربن در چرخه کالوین در گیاهان تیمار شده می‌شود. اجرای چرخه کالوین منجر به باز شدن زنجیر انتقال الکترون و افزایش نسبت $NADP^+/NADPH,H^+$ و کاهش هدررفت انرژی مکانیسم‌های دفاعی می‌گردد (اسفندیاری و همکاران، ۱۳۸۸). راه‌هایی که موجب افزایش تثبیت CO_2 در گیاهان زراعی می‌شوند، می‌تواند به‌عنوان راه‌کارهای مناسب برای افزایش عملکرد و زیست‌توده گیاهان زراعی مورد استفاده قرار گیرند. بررسی‌ها نشان داده است که عملکرد و رشد گیاهان C_3 به واسطه محلول‌پاشی متانول افزایش یافته است (مخدوم و همکاران، ۲۰۰۲).

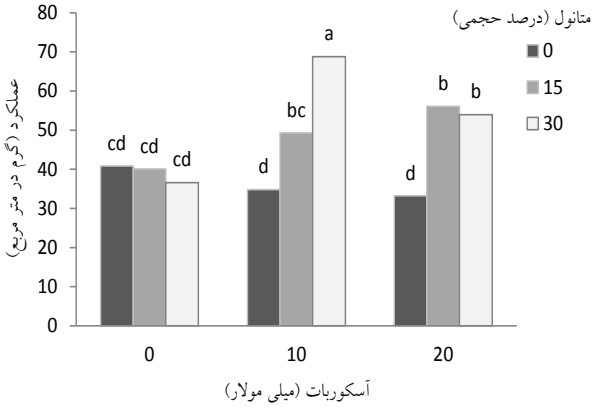
در مقایسه‌ای که بین ترکیبات تیماری حاصل از آسکوربات و متانول انجام شد، نقش موثر کاربرد توام آسکوربات و متانول بر عملکرد دانه مشهود بود، به طوری که بیشترین میزان عملکرد دانه با میانگین ۶۸/۸ گرم در متر مربع از ترکیب تیماری آسکوربات ۱۰ میلی‌مولار و متانول ۳۰ درصد حجمی- حجمی به‌دست آمد. کاربرد توام آسکوربات ۲۰ میلی مولار و هر دو سطح ۱۵ و ۳۰ درصد حجمی- حجمی متانول نیز سبب افزایش قابل توجه در عملکرد دانه گردید (شکل۲). عبدالحمید و همکاران (۲۰۱۰) در سویا، رافت و همکاران (۲۰۱۱) و فارگهال و همکاران (۲۰۰۸) در گندم نیز افزایش عملکرد از طریق کاربرد خارجی آسکوربات تحت تنش را مشاهده کردند.

درصد روغن دانه: در مجموع محلول‌پاشی متانول با غلظت ۱۵ درصد حجمی- حجمی با تولید ۴۰/۲۵ درصد روغن، این صفت را به طور معنی‌داری نسبت به دو سطح دیگر متانول افزایش داد. در شرایط تنش و عدم محلول‌پاشی متانول درصد روغن دانه ۳۶/۵۸ درصد بود که بر اثر محلول‌پاشی با متانول ۱۵ و ۳۰ درصدحجمی- حجمی به ترتیب ۳/۰۹ و ۲/۵۹ درصد افزایش یافت (شکل۳).

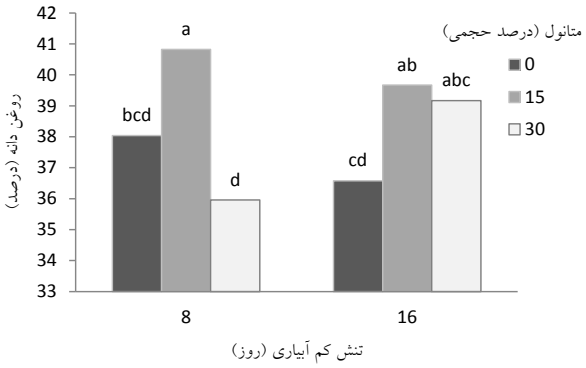
تنش کم‌آبی درصد روغن دانه را کاهش می‌دهد که ناشی از کاهش تثبیت دی‌اکسید کربن در چرخه کالوین است. تریوز فسفات‌های حاصل از اجرای این چرخه با تبدیل شدن به استیل کوآنزیم‌آ سوبسترای اولیه لازم برای بیوسنتز اسیدهای چرب را فراهم می‌کنند. افت کارکرد چرخه کالوین بر اثر عوامل محیطی مانند تنش کم‌آبی بیوسنتز اسیدهای چرب و روغن را کاهش می‌دهد. ولی، با کاربرد متانول و نفوذ آن در برگ تثبیت دی‌اکسید کربن بیشتر می‌شود و با تامین بهتر سوبستراهای اولیه لازم برای بیوسنتز روغن، میزان این ترکیب افزایش می‌یابد (اسفندیاری و محبوب، ۱۳۹۳).در این پژوهش نیز افزایش میزان روغن با استفاده از کاربرد برگی متانول مشاهده گردید. به‌علاوه، افزایش میزان روغن می‌تواند ناشی از افزایش دوره رشد گیاه باشد. در همین رابطه گزارش شده است که در کلزا به دلیل افزایش طول دوره رشد، درصد روغن دانه افزایش نشان داد (دانشمند و همکاران، ۱۳۸۸).



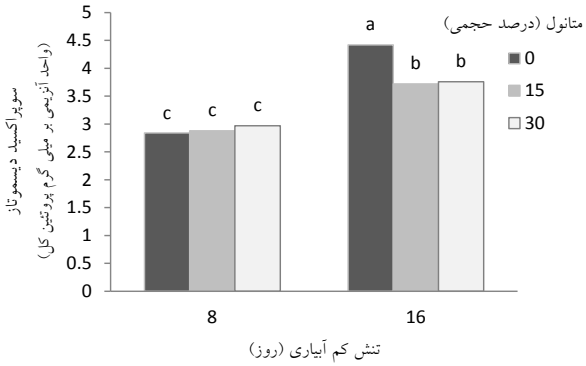
شکل ۱- مقایسه میانگین عملکرد دانه تحت تاثیر ترکیبات تیماری حاصل از تنش کم‌آبیاری و متانول



شکل ۲- مقایسه میانگین عملکرد دانه تحت تاثیر ترکیبات تیماری حاصل از آسکوربات و متانول



شکل ۳- مقایسه میانگین درصد روغن دانه تحت تاثیر ترکیبات تیماری حاصل از تنش کم‌آبیاری و متانول



شکل ٤- مقایسه میانگین سوپر اکسید دیسمیوتاز تحت تاثیر ترکیبات تیماری حاصل از تنش کم‌آبیاری و متانول

نتیجه قابل توجه این بود که در شرایط عدم تنش کاهش قابل توجهی در روغن دانه بر اثر محلول‌پاشی با متانول ۳۰ درصد حجمی- حجمی مشاهده شد (شکل۳).

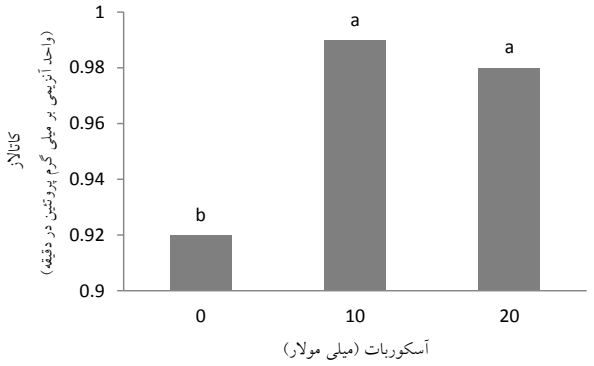
به نظر می‌رسد روغن دانه تابع میزان فتوسنتز گیاه و شدت تنش وارده به گیاه باشد و در گیاهانی که تحت تنش شدید قرار می‌گیرند به علت تسریع در رسیدگی و کاهش فتوسنتز مقدار پروتئین دانه افزایش و روغن دانه کاهش یابد.

در پژوهش حاضر، محلول‌پاشی با متانول سبب کاهش تنش وارده به گیاه گردید. از طرفی متانول به عنوان منبع کربن می‌تواند در بهبود وضعیت فتوسنتزی گیاه مفید باشد. بنابراین، می‌توان چنین استنباط کرد که افزایش درصد روغن دانه بر اثر محلول‌پاشی با متانول به احتمال زیاد به دلیل کاهش شدت تنش تحت تاثیر این ماده و افزایش فتوسنتز بوده است.

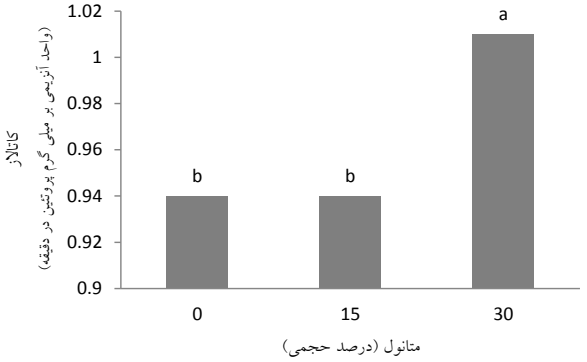
آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت

سوپراکسید دیسمیوتاز: در شرایط عدم تنش استفاده از متانول تاثیر معنی‌داری بر فعالیت این آنزیم در برگ نداشت. با این حال، در شرایط تنش هر دو سطح متانول موجب کاهش معنی‌دار فعالیت این آنزیم نسبت به عدم مصرف متانول در شرایط تنش گردید. به این ترتیب، بیشترین فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسمیوتاز با میانگین ٤/٤٢ واحد آنزیمی بر میلی‌گرم پروتئین کل از ترکیب تیماری متانول صفر × تنش کم‌آبیاری حاصل شد (شکل٤). افزایش فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسمیوتاز تحت شرایط تنش خشکی می‌تواند نشان‌دهنده نیاز سیستم به این آنزیم جهت کاهش خسارات تنش اکسیداتیو حاصل از کم‌آبی باشد. در مقابل، متانول موجب بهبود در اجرای چرخه کالوین در شرایط تنش می‌شود که نتیجه آن کاهش نیازمندی گیاه به مکانیسم‌های دفاعی و هدر رفت انرژی از این طریق است (مخدوم و همکاران، ۲۰۰۲). به گزارش حبیبی و همکاران (۲۰۰٤) نیز فعالیت تعدادی از آنزیم‌های آنتی اکسیدانت در ارقام مختلف آفتابگردان تحت شرایط تنش خشکی افزایش یافت.

کاتالاز: کاتالاز یکی از مهمترین آنزیم‌های جمع‌آوری کننده پراکسید هیدروژن است. در برگ گیاهانی که توسط غلظت‌های ۱۰ و ۲۰ میلی‌مولار آسکوربات محلول‌پاشی شده بودند، فعالیت بیشتری برای آنزیم کاتالاز ثبت گردید. اگرچه بین دو غلظت آسکوربات اختلاف معنی‌داری وجود نداشت، ولی اختلاف این دو با شاهد از لحاظ آماری معنی‌دار بود (شکل۵). فعالیت آنزیم کاتالاز تحت تاثیر متانول ۱۵ درصد حجمی- حجمی قرار نگرفت، به‌طوری که فعالیت این آنزیم در هر دو سطح صفر و ۱۵ درصد حجمی- حجمی متانول ۰/۹٤ واحد آنزیمی بر میلی‌گرم پروتئین در دقیقه بود. دو برابر شدن غلظت متانول سبب شد که فعالیت این آنزیم با افزایشی معادل ۷/٤ درصد به ۱/۰۱ واحد آنزیمی بر میلی‌گرم پروتئین در دقیقه برسد (شکل٦). نتایج به‌دست آمده بیانگر بهبود وضعیت آنتی‌اکسیدانتی گیاه بر اثر استفاده از آسکوربات و متانول است که سبب مقاومت بیشتر گیاه در مواجهه با تنش‌های محیطی خواهد شد. در پژوهش قربانلی و همکاران (۱۳۸۹) تیمار تنش خشکی و آسکوربات روی سیاه‌دانه به‌طور قابل توجهی سبب افزایش میزان آنزیم کاتالاز گردید. این افزایش آنزیمی بدان معنی است که در سیاه‌دانه نیز برای کاهش اثر تنش، سیستم‌های آنتی‌اکسیدانت فعال‌تر می‌شوند.



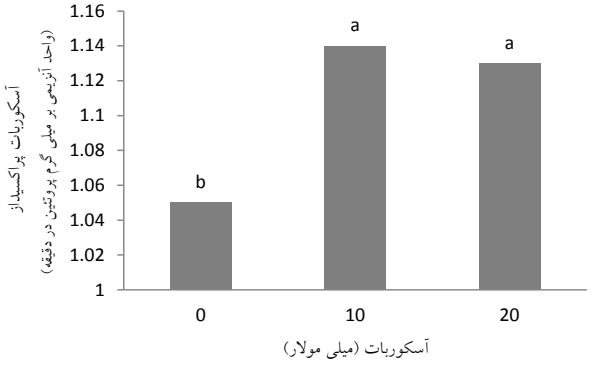
شکل ۵- مقایسه میانگین کاتالاز تحت تاثیر سطوح مختلف محلول‌پاشی آسکوربات



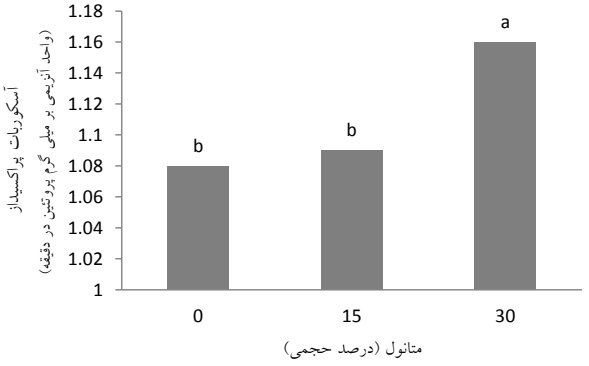
شکل ٦- مقایسه میانگین کاتالاز تحت تأثیر سطوح مختلف محلول‌پاشی متانول

آسکوربات پراکسیداز: در شرایط عدم مصرف آسکوربات فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز ۱/۰۵ واحد آنزیمی بر میلی‌گرم پروتئین در دقیقه بود که بر اثر محلول‌پاشی با آسکوربات و دو برابر شدن غلظت آن به ترتیب ۸/٦ و ۷/٦ درصد افزایش نشان داد و به مقادیر ۱/۱٤ و ۱/۱۳ واحد آنزیمی بر میلی‌گرم پروتئین در دقیقه رسید که از لحاظ آماری نیز معنی‌دار بود (شکل۷). آسکوربات پراکسیداز از آنزیم‌های مداخله کننده در کاهش آسیب اکسیداتیو وارده به گیاهان است (آسادا و تاکاشی، ۱۹۸۷). افزایش فعالیت آسکوربات پراکسیداز در برنج تحت تاثیر سرما (حسیبی و همکاران، ۱۳۸۷) و در گندم تحت تنش خشکی (اسفندیاری و همکاران، ۱۳۸۸) گزارش شده است. محلول‌پاشی متانول با غلظت ۱۵ درصد حجمی- حجمی تاثیر معنی‌داری بر فعالیت این آنزیم نداشت. در حالی‌که محلول‌پاشی با متانول ۳۰ درصد حجمی- حجمی میزان فعالیت آسکوربات پراکسیداز در برگ را با ۷/٤ درصد افزایش به حدود ۱/۱٦ واحد آنزیمی بر میلی‌گرم پروتئین در دقیقه رساند (شکل۸).

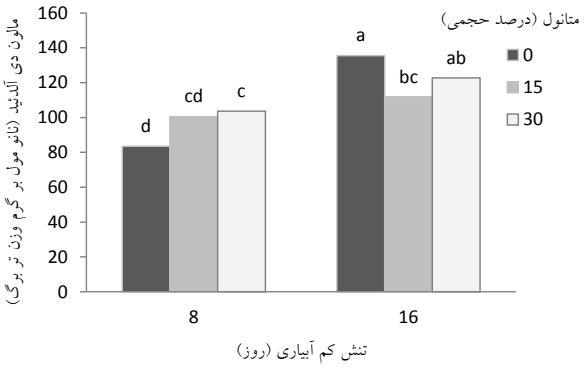
مالون‌دی‌آلدئید: مالون‌دی‌آلدئید ترکیبی است که بر اثر پراکسیداسیون لیپیدها در گیاهان تحت تنش تولید می‌شود. بررسی غلظت مالون‌دی‌آلدئید بافت گیاهی می‌تواند بیانگر میزان تخریب غشای سلولی باشد، زیرا این ترکیب تحت تاثیر تخریب و پراکسیده شدن غشای سلولی آزاد می‌شود (مولاسیوتیس و همکاران، ۲۰۰۵). بهاتاچارجی و ماخرجی (۲۰۰۲) با بررسی واکنش سه رقم برنج به تنش شوری دریافتند که تنش شوری سبب تخریب غشاهای سلولی و افزایش تولید مالون‌دی‌آلدئید شد که میزان تولید مالون‌دی‌آلدئید در رقم حساس به شوری بسیار بیشتر از رقم مقاوم به شوری بود. با توجه به نتایج این تحقیق، مالون‌دی‌آلدئید موجود در برگ گیاهانی که در معرض تنش بودند بیشتر از شرایط عدم تنش بود. بیشترین مقدار این متابولیت با میانگینی معادل ۱۳۵/٤۵ نانومول بر گرم وزن تر برگ از ترکیب تیماری تنش کم‌آبیاری در متانول صفر به‌دست آمد. محلول‌پاشی با متانول به‌ویژه متانول ۱۵ درصد حجمی- حجمی موجب کاهش معنی‌دار این متابولیت در برگ گیاهان تنش دیده شد. در شرایط عدم تنش و گیاهانی که متانول دریافت نکردند میزان مالون‌دی‌آلدئید با میانگینی معادل ۸۳/٤۸ نانومول بر گرم وزن تر برگ کمترین مقدار را داشت. محلول‌پاشی با متانول در شرایط عدم تنش موجب افزایش این متابولیت در برگ شد (شکل۹).



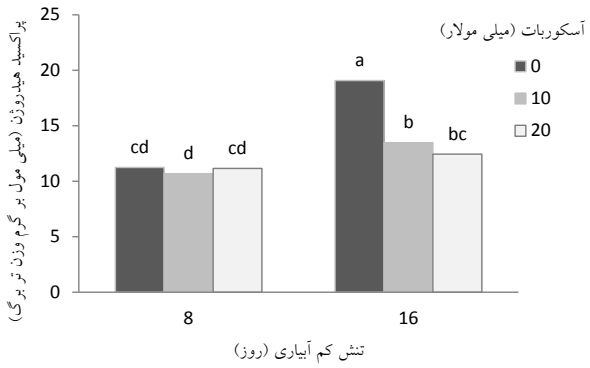
شکل ۷- مقایسه میانگین آسکوربات پراکسیداز تحت تاثیر سطوح مختلف محلول‌پاشی آسکوربات آآسکوربیک



شکل ۸- مقایسه میانگین آسکوربات پراکسیداز تحت تاثیر سطوح مختلف محلول‌پاشی متانول



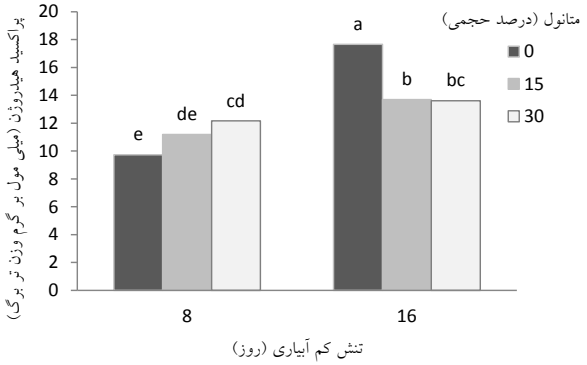
شکل ۹- مقایسه میانگین مالون دی آلدئید تحت تاثیر ترکیبات تیماری حاصل از تنش کم‌آبیاری و متانول



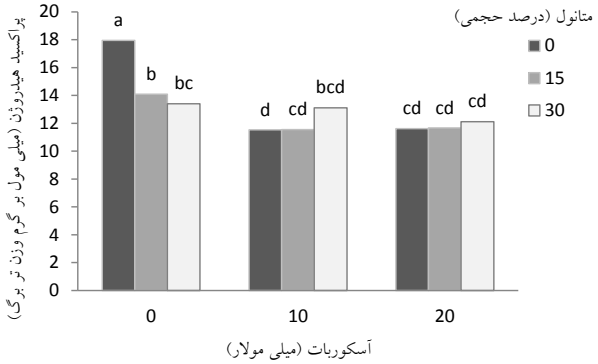
شکل ۱۰- مقایسه میانگین پراکسید هیدروژن تحت تاثیر ترکیبات تیماری حاصل از تنش کم‌آبیاری و آسکوربات

پراکسید هیدروژن: بیشترین میزان پراکسید هیدروژن با میانگینی معادل ۱۹/۰۶ میلی مول بر گرم وزن تر برگ از ترکیب تیماری تنش× آسکوربات صفر حاصل شد. محلول‌پاشی با آسکوربات در شرایط تنش به طور چشمگیری پراکسید هیدروژن برگ را کاهش داد و برگ تا حدود زیادی از لحاظ این پارامتر به حالت نرمال نزدیک شد. در شرایط عدم تنش تفاوت قابل توجهی بین سطوح آسکوربات و شاهد مشاهده نشد (شکل۱۰). آسکوربات اسپری شده طبق نتایج فوق سبب افزایش فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز نیز گردید. آسکوربات توانایی واکنش مستقیم با انواع اکسیژن فعال را دارد و سبب جمع‌آوری آن-ها می‌گردد. به‌علاوه، آسکوربات علاوه بر شرکت در چرخه‌های مهلر و گلوتاتیون-آسکوربات، در چرخه گزانتوفیل در تبدیل دهیدروآسکوربات به آسکوربات و تامین هیدروژن لازم برای فعالیت آنزیم‌های داپوکسیداز نقش ویژه‌ای دارد. همچنین، آسکوربات در احیای دوباره توکوفرول نقش دارد و بر این اساس افزوده شدن این ترکیب نقش ویژه‌ای در ممانعت از تولید انواع اکسیژن فعال و یا جمع‌آوری آن‌ها دارد و مانع از تجمع انواع اکسیژن فعال و آسیب به غشاهای بیولوژیک می‌شود (فویر و همکاران، ۱۹۹۷ و فویر و نوکتور، ۲۰۰۵). بنابراین، کاربرد خارجی آسکوربات به علت داشتن خواص آنتی اکسیدانتی، سبب پاک کردن رادیکال‌های اکسیژن تولید شده می‌شود. در این زمینه تحقیقاتی روی گیاهان مختلف از قبیل پیاز (کریما و سلاما، ۲۰۰۹)، سویا (سعیدی سار و همکاران، ۱۳۸۵) و باقلا (یونیس و همکاران، ۲۰۱۰) صورت پذیرفته است.

مانند نتایج به‌دست آمده در ارتباط با مالون‌دی‌آلدئید، تاثیر منفی محلول‌پاشی متانول در شرایط عدم تنش از طریق افزایش میزان پراکسید هیدروژن برگ مشاهده گردید. در حالی که محلول‌پاشی با هر دو غلظت متانول در شرایط تنش میزان پراکسید هیدروژن موجود در برگ را به طور معنی‌داری کاهش داد و وضعیت گیاه را بهبود بخشید (شکل۱۱). در واقع بین میزان مالون‌دی‌آلدئید و پراکسید هیدروژن رابطه مستقیمی وجود دارد. هر چه تنش کم‌آبیاری در گیاه بیشتر باشد، تنش اکسیداتیو وارد شده به سلول بیشتر و در نتیجه پراکسید هیدروژن بیشتری تولید می‌شود که این امر نیز خود منجر به افزایش پراکسیداسیون اسیدهای چرب غیر اشباع غشایی می‌گردد و میزان مالون‌دی‌آلدئید افزایش می‌یابد. با افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت، از میزان پراکسید هیدروژن سلولی و در نهایت مالون‌دی‌آلدئید کاسته می‌شود.



شکل ۱۱- مقایسه میانگین پراکسید هیدروژن تحت تاثیر ترکیبات تیماری حاصل از تنش کم‌آبیاری و متانول



شکل ۱۲- مقایسه میانگین پراکسید هیدروژن تحت تاثیر ترکیبات تیماری حاصل از آسکوربات و متانول

در برگ گیاهانی که آسکوربات و متانول را دریافت نکرده بودند، مقدار پراکسید هیدروژن برگ ۱۷/۹۵ میلی‌مول بر گرم وزن تر برگ بود که از لحاظ آماری بالاترین مقدار را نشان داد. محلول‌پاشی متانول به تنهایی توانست میزان این متابولیت در برگ را به طور معنی‌داری کاهش دهد، ولی هنگامی که محلول‌پاشی متانول توام با آسکوربات انجام شد نتیجه بهتری حاصل گردید و ترکیب مخرب پراکسید هیدروژن کاهش بیشتری نشان داد که می‌تواند ناشی از فعال‌تر شدن چرخه کالوین و نیز عملکرد مطلوب‌تر چرخه-های گلوتاتیون- آسکوربات، مهلر و گزانتوفیل باشد. تفاوت معنی‌داری از لحاظ آماری بین ترکیبات تیماری حاصل از متانول و آسکوربات با هر دو غلظت محلول‌پاشی شده مشاهده نگردید (شکل۱۲).

نتیجه‌گیری کلی

براساس نتایج به‌دست آمده، بروز تنش به دنبال ۸ روز تاخیر در آبیاری سیاه‌دانه با افزایش پراکسید هیدروژن، مالون‌دی‌آلدئید و سوپراکسید دیسمیوتاز مشهود بود و کاهش عملکرد را در پی داشت. در حالی که با محلول‌پاشی متانول و نیز در بسیاری از موارد آسکوربات ترکیبات و آنزیم فوق کاهش و در مقابل کاتالاز و آسکوربات پراکسیداز افزایش یافت. بنابراین، با کاهش هزینه‌های گیاه، عملکرد و روغن دانه بهبود یافت. در این بین آثار مثبتی برای کاربرد توام متانول و آسکوربات با بالاترین غلظت‌های مورد مطالعه ثبت گردید، چرا که هر کدام از این ترکیبات به طریقی در رفع محدودیت‌های گیاه در شرایط تنش موثرند و کاربرد برگی آن‌ها می‌تواند به عنوان راه‌کاری سریع پس از برخورد ناگهانی گیاه با انواع تنش‌ها مطرح باشد.

منابع

اسفندیاری، ع.، شکیبا، م.، محبوب، س.، آلیاری، ه.، برادران فیروزآبادی، م. ۱۳۸۸. اثرات تنش خشکی بر فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدان و پراکسیداسیون لیپیدی گیاهچه‌های گندم. دانش کشاورزی. ۱۹(۲):۱۲۹- ۱۳۸.

اسفندیاری، ع.، محبوب، س.ع. ۱۳۹۳. بیوشیمی گیاهی. جلد دوم. انتشارات عمیدی. ۳۲۲ صفحه.

حسیبی، پ.، مرادی، ف.، نبی پور، م. ۱۳۸۷. اثر دمای پایین بر سازوکار آنتی اکسیدآن‌های ژنوتیپ‌های حساس و مقاوم برنج در مرحله گیاهچه‌ای. مجله علوم زراعی ایران. ۱۰(۳):۲۸۰-۲٦۲.

دانشمند، ع.، شیرانی‌راد، ا.ح.، نورمحمدی، ق.، زارعی، ق.، دانشیان، ج. ۱۳۸۸. بررسی روغن دانه و پروتئین دانه دو رقم کلزا و ارتباط آن با عملکرد روغن دانه و عملکرد پروتئین دانه. مجله‌ی دانش کشاورزی ایران. ۵(۳):۳۱٤-۲۹۵.

سعیدی سار، س.، خاوری نژاد، ر.، فهیمی، ح.، قربانلی، م.، مجد، ا. ۱۳۸۵. نقش حفاظتی اسید آسکوربیک در مقابل تنش اکسیداتیو ناشی از نیکل در گیاه سویا. مجله پژوهش و سازندگی در زراعت و باغبانی. ۷۰ :۸۰-۸۷ .

قربانلی، م.، بخشی خانیکی، غ.، سلیمی الیزئی، ص.، هدایتی، م. ۱۳۸۹. اثر کمبود آب و برهم کنش آن با اسیدآسکوربیک بر مقدار پرولین، قندهای محلول و فعالیت آنزیم‌های کاتالاز و گلوتاتیون پراکسیداز در سیاه‌دانه (*Nigella sativa* L.). فصلنامه علمی- پژوهشی تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران. ۲٦(٤): ٤۷٦-٤٦٦.

Abdelhamid, M., Gaballah, M.S., Rady, M., Gomaa, A. 2010. Bio fertilizer and ascorbic acid alleviated the detrimental effects of soil salinity on growth and yield of soybean. Proceedings of the Second Science with Africa Conference. PP 73-81.

Aebi, H. 1984. Catalase *in vitro*. Method of Enzymology. 105: 121-126.

Ali, B.H., Blunden,G. 2003. Pharmacological and toxicological properties of *Nigella sativa*. L. *Phytother. Res.* 17: 299-305.

Asada, K., Takahashi, M. 1987. Production and scavenging of active oxygen in photosynthesis. In: Kyle, D. J. (Eds.). *Photoinhibition. Elsevier*. PP. 227-287.

Bhattacharjee, S., Mukherjee, A.K. 2002. Salt stress induced cytosolute accumulation, antioxidant response and membrane deterioration in three rice cultivars during early germination. *Seed Sci. and Technol.* 30: 279- 287.

Emam, M. M.,Helal, N. M. 2008. Vitamins Minimize the Salt-Induced Oxidative Stress Hazards. *Aust. J. of Basic and Appli. Sci.* 2: 1110-1119.

Esfandiari, E.A., Shakiba, M.R., Mahboob, S.A., Alyari, H., Toorchi, M.2007. Water stress, antioxidant enzyme activity and lipid peroxidation in wheat seedling. *J. of Food, Agric. and Environ.* 5:149-153.

Farghal A. Z., Osama, M., Shihy, El., El Rahman, A., Ghallab, M., El Zahraa, A.I. F. 2008. Effect of exogenous ascorbic acid on wheat tolerance to salinity stress conditions. *Arab J. Biotech.* 12: 149-174.

FechtChristoffers, M. M., Maier, P., Horst, W. J. 2003. Apoplastic peroxidases and ascorbate are involved in manganese toxicity and tolerance of *Vignaunguiculata. J. of Plant Physiol.* 117: 237-244.

Foyer, C.H., Lopez-Delgado, H., Dat, J.F., Scott, I.M. 1997. Hydrogen peroxide and glutathione-associated mechanisms of acclimatory stress tolerance and signaling. *Physiol. of Plant.* 100: 241-254.

Foyer, C.H.,Noctor, G. 2005. Oxidant and antioxidant signalling in plants: a re-evaluation of the concept of oxidative stress in a physiological context. *Plant Cell Environ.* 28:1056–1071.

Garratt, L.C., Janagoudr, B. S., Lowe, K.C., Anthony, P., Power, J. B., Davey,M. R. 2002. Salinity tolerance and antioxidant status in cotton cultures. *Free Radical Biology and Medicine.* 33(4): 502-511.

Ghorbanli, M., Adibhashemi, N.,Peyvandi,M. 2010. Study of salinity and ascorbic acid on some physiological responses of Nigella *sativa* L. *Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants.* 26(3): 370-388.

Gout, E., Aubert, S., Bligny, R., Rebeille, F., Nonomura, A.R., Benson, A.,Douce, R. 2000. Metabolism of methanol in plant cells. Carbon-13 nuclear magnetic resonance studies. *Plant Physiol.* 123: 287-296.

Habibi, D., Ardakani, M.R., Bojar, M.M., Taleghani, D.E.,Mohammadi, A. 2004. Antioxidative in sunflower subjected to drought stress. *4 th international Crop science congress*. 26 sep-10 oct. Australia.

Jzayeri, Gh.A. 2004. Black cumin, In Zaban-e-Khorakiha, Volom 3, AmirKabir press. Tehran Iran. PP: 53-4.

Karima, H.,Salama, A.2009. Amelioration of NaCl-induced alterations on the plasma membrane of (*Allium cepa*L.) by Ascorbic Acid. *Aust. J. of Basic and Applied Sci*. 3: 990-994.

Li, Y., Gupta, J., Siyumbano, A.K. 1995. Effect of methanol on soybean photosynthesis and chlorophyll. *J. Plant Nutr*. 18: 1875–1880.

Makhdum, M.I., Malik, M.N.A., Din, S.U., Ahmad, F.,Chaudhry, F.I. 2002. Physilogical response of cotton to methanol foliar application. *J. Res. Sci.* 13: 37-43.

Mirakhori, M., Paknejad, F., Moradi, F., Ardakani, M.R., Zahedi, H.,Nazeri. P. 2009. Effect of Drought Stress and Methanol on Yield and Yield Components of Soybean max (L17). *Ame. J. of Biochem. and Biotech*. 5(4): 162-169.

Molassiotis, A., Tanou, G., Diamantidis, G.,Patakas, A. 2005. Effects of 4-month Fe deficiency exposure on Fe reduction mechanism, photosynthetic gas exchange chlorophyll fluorescence and antioxidant defence in two peach rootstocks differing in Fe deficiency tolerance. *J. of Plant Physiol*, 163(2): 176-185.

Nonomura, A.M.,Benson,A.A. 1992. The path of carbon in photosynthesis: improved crop yields with methanol. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89: 9794–9798.

Raafat, N.Z.,Radwan, T. E.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. *J. Appi. Sci. Res.* 7(1): 42-55.

SafarzadeVishgahi, M.N., Normohamadi, G.H., MjidiHaravan, E.,Rabiei,B. 2005. Effect of methanol on peanut Growth and yield (*Arachishypogaea* L.). *J. Agric. Sci.* 103-188.

Sengupta, R.,Bhattacharyya,D.K.,1993. Enzymatic extraction of mustard seed and rice bran. *J. of American Oil Chemists Society*. 73: 687-692.

Sergiv, I., Alexieva, V., Karanov, E.1997. Effect of spermine, atrazine and combination between them on some endogenous protective systems and stress markers in plants. *Compt. Rend. Academy Bulg. Sci.* 51:121-124.

Stewart, R.R.C., Bewley, J.D. 1980. Lipid peroxidation associated aging of soybean axes. *Plant Physiol*. 65:245-248.

Yoshimura, K., Yabute, Y., Ishikawa,T., Shigeoka, S. 2000. Expression of spinach ascorbate peroxidase isoenzymes in response to oxidative stresses.*Plant Physiol*. 123: 223-233.

Younis, M.E., Hasaneen, M.N.A.,Kazamel, A.M.S. 2010. Exogenously applied ascorbic acid ameliorates detrimental effects of NaCl and mannitol stress in *Viciafaba* seedlings. *Protoplasma*, 239: 39–48.

Zhang, S., Weng, J., Pan, J., Tu, T., Yao, S.,Xu, C. 2003. Study on the photogeneration of superoxide radicals in Photosystem II with EPR spin trapping techniques. *Photosynthesis Res.* 75: 41–48.

The Effect of Ascorbat and Methanol Foliar Application on Defense Mechanisms, Seed and Oil Yield of *Nigella Sativa* L. Subjected to Water Deficit Stress

Mojtaba Baradaran Firouzabadi[1], Mehdi Baradaran Firouzabadi[2*], Mahdieh Parsaeian[3]

1. M.Sc. in plant medicine, Islamic Azad University, Karaj
2. Assistant professor in agronomy, Department of agronomy, Shahrood University
3. Assistant professor in plant breeding, Department of agronomy, Shahrood University

*For Correspondence: m.baradaran.f@gmail.com

Received: 30.04.2015 **Accepted: 27.12.2014**

Abstract

Nowadays, the foliar application of some substances such as ascorbate and methanol is discussed in order to reduce the negative effects of various stresses. In order to examine the effect of these materials on defense mechanisms and seed and oil yield of *Nigella sativa* L., a split plot factorial experiment based on randomized complete block design was conducted with three replications at Shahrood University in 2011. The main factor was two irrigation levels (no stress and severe stress) and sub factors were foliar application of methanol in three levels (0, 15 and 30 %V) and ascorbic acid in three levels (0, 10 and 20 mM). The results indicated that seed yield was decreased by water deficit stress significantly. However, the increasing in methanol foliar concentration increased the seed yield in both stress and non-stress conditions. Methanol treatment in stress conditions was improved the amount of seed oil content considerably. The highest seed oil percentage was obtained from 8 days irrigation and 15 volume percentage of methanol. The water deficit stress conditions caused the highest activity of superoxide dismutase enzyme and the amount of malondialdehyde. Foliar application of ascorbic acid increased the content of ascorbate peroxidase and catalase enzymes nevertheless; hydrogen peroxide was decreased by this treatment. This is despite the fact that superoxide dismutase, malondialdehyde and hydrogen peroxide were reduced by methanol leaf application.

Keywords: *Nigella sativa* L., ascorbate, methanol, water deficit stress, antioxidant