

اثر کاربرد مтанول بر برخی ویژگی‌های بیوشیمیابی و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در گیاه نخود (*Cicer arietinum L.*)

سعید رضا حسین زاده^۱، اعظم سلیمی^۲، علی گنجعلی^۳ و راحله احمدپور^{۴*}

۱- عضو هیئت‌علمی بورسیه دانشگاه صنعتی خاتم‌الانبیاء بهبهان

۲- استادیار دانشکده علوم، دانشگاه خوارزمی تهران

۳- دانشیار دانشکده علوم، دانشگاه فردوسی مشهد

۴- عضو هیئت‌علمی دانشگاه صنعتی خاتم‌الانبیاء بهبهان

تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۱۱/۱۵

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۵/۲۵

چکیده

این مطالعه به منظور بررسی اثر محلول‌پاشی مтанول بر ویژگی‌های بیوشیمیابی و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در گیاه نخود تحت تنش خشکی به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار در شهریور سال ۹۰ در پژوهشکده علوم گیاهی دانشگاه فردوسی مشهد به اجرا درآمد. عامل محلول‌پاشی مтанول با ۵ سطح، شاهد (بدون محلول‌پاشی)، ۲۰، ۲۵، ۳۰ و ۳۵ درصد حجمی بود که به هر کدام از سطوح ۲ گرم در لیتر گلیسین اضافه شد. محلول‌پاشی ۳ بار طی فصل رشد گیاه و با فواصل ۱۰ روز صورت گرفت. محلول‌پاشی گیاهچه‌ها تا زمان جاری شدن قطره‌های محلول روی برگ ادامه یافت. عامل خشکی نیز شامل تنش خشکی (۲۵ درصد ظرفیت زراعی) و بدون تنش خشکی (۱۰۰ درصد ظرفیت زراعی) اعمال شد. نتایج نشان داد بین سطوح مختلف مтанول اختلاف معنی‌داری از نظر پروتئین محلول برگی، پرولین، کربوهیدرات محلول برگی، پراکسید هیدروژن، مالون دی‌آلدید، کاتالاز، پراکسیداز و سوپراکسید دیسموتاز وجود داشت ($P \leq 0.01$). مقایسه میانگین صفات مورد بررسی نشان داد که سطح ۳۰ درصد حجمی مтанول بیشترین تأثیر را بر صفات مورد بررسی دارد. اثرات متقابل تنش خشکی و مтанول تأثیر معنی‌داری بر میزان پروتئین محلول برگی، کربوهیدرات محلول برگی، پراکسید هیدروژن، مالون دی‌آلدید، کاتالاز، پراکسیداز و سوپراکسید دیسموتاز نداشت اما بر محتوی پرولین معنی‌دار است ($P \leq 0.05$).

واژگان کلیدی: مтанول، ویژگی‌های بیوشیمیابی، تنش خشکی، آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان

* نویسنده مسئول، آدرس پست الکترونیکی: ahmadpour@bkatu.ac.ir

2000). از پاسخ‌های گیاهان به تنش خشکی تجمع اسمولیت‌ها است که منجر به سازگاری اسمزی گیاه می‌شود (Ashraf and Iram, 2005). تجمع پرولین یک نشانگر مهم مقاومت به تنش خشکی در باکتری‌ها، جلبک‌ها و گیاهان عالی به حساب می‌آید (Bates *et al.*, 1973). بررسی‌های انجام شده در مناطق خشک پاکستان نشان داد، که محلول‌پاشی متابول ۳۰ درصد در گیاه پنبه موجب افزایش مقاومت به تنش خشکی و افزایش میزان پرولین در گیاه می‌شود (Makhduma *et al.*, 2002). در آزمایش دیگری محلول‌پاشی متابول باعث افزایش میزان کلروفیل، کارتنتوئید و پرولین در برگ گندم، یولاف و مو (Ramandant and Omran, 2005). تنش خشکی سبب تولید گونه‌های اکسیژن فعال در گیاهان شده و عدم حضور مکانیسم محافظتی جهت حذف آن‌ها، سبب تخریب لیپیدها، پروتئین‌ها و اسیدهای نوکلئیک می‌گردد (Ahmed *et al.*, 2002). در گیاهان، سیستم‌های دفاعی آنتی‌اکسیدانی وجود دارد که سبب محافظت از لیپیدها، پروتئین‌ها و نوکلئیک اسیدها در مقابل اثرات تخریبی گونه‌های اکسیژن فعال می‌گردد (Sairam *et al.*, 1997). در مطالعه بر روی گیاهان گندم و یولاف افزایش فعالیت بعضی از آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان از قبیل کاتالاز و پراکسیداز در اثر محلول‌پاشی متابول مشاهده شد (Ramandant and Omran, 2005). با توجه به موارد اشاره شده از آنجا که نخود یک محصول با ارزش اقتصادی است و در رژیم غذایی جامعه نقش مهمی را ایفا می‌نماید و نظر به این که این گیاه حساس به خشکی است، لذا تحقیق حاضر با هدف بررسی تأثیر متابول بر ویژگی‌های بیوشیمیایی و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان از قبیل محتوای پروتئین برگی، پرولین، کاتالاز، پراکسیداز و سوپراکسید دیسموتاز بهمنظور بهبود شرایط تنش خشکی در گیاه نخود انجام شد.

مواد و روش‌ها

بهمنظور بررسی اثر تنش خشکی و محلول‌پاشی متابول بر روی خصوصیات بیوشیمیایی نخود (رقم کرج) آزمایشی

مقدمه

تنش خشکی یکی از مشکلات عمده تولید گیاهان زراعی در ایران و جهان به شمار می‌رود و تهدید جدی برای تولید موفقیت‌آمیز محصولات زراعی در سراسر جهان است (Ober, 2001). در حدود یک سوم از زمین‌های قابل کشت دنیا به طور قابل توجهی با کمبود آب مواجه هستند (Clover *et al.*, 1998). با اینکه نخود گیاهی نسبتاً مقاوم به خشکی است اما جهت حصول عملکرد بالا اتخاذ راهکارهایی که بتواند اثر تنش خشکی را کاهش دهد، مورد توجه محققان بسیاری بوده است (Hsiao, 2000). افزایش غلظت دی‌اکسید کربن می‌تواند اثر ناشی از تنش خشکی را خنثی کند. بنابراین به کار بردن موادی که بتواند سبب افزایش غلظت دی‌اکسید کربن در گیاه شود (Zebic *et al.*, 2003) یکی از راهکارهای افزایش غلظت دی‌اکسید کربن در گیاهان استفاده از ترکیباتی نظیر متابول، اتابول، پروپانول، بوتانول و همچنین استفاده از اسیدهای آمینه گلیسین، گلوتامات و آسپارتات می‌باشد (Nonomura *et al.*, 1997). در بین این ترکیبات متابول ماده کاملاً شناخته شده برای گیاهان می‌باشدند زیرا این ماده یکی از ساده‌ترین فرآورده‌های گیاهی بوده که توسط گیاهان خصوصاً طی رشد برگ‌ها و در اثر دمتیلامیون (Haston, 2001) و پکتین در دیواره‌های سلولی آن‌ها تولید می‌شود. پس از تولید این ماده آلی فرار در داخل گیاهان، مقداری از آن از برگ‌ها خارج و وارد لایه مرزی (Mudgett and clarke, 1993) و سپس اتمسفر می‌شود (Roj, 2001). بخش دیگر آن تبدیل به فرم آلدھید و سپس به اسید فرمیک و در نهایت به CO_2 تبدیل می‌شود. این CO_2 تولید شده می‌تواند بر روی آسیمیلاسیون CO_2 در گیاهان اثر بگذارد (Galbal and kristian, 2002). کاربرد خارجی متابول به طور مستقیم با فرآیندهای متابولیکی رشد و نمو گیاه در ارتباط است و همچنین با فرآیندهای مرتبط با مکانیسم‌های دفاعی از قبیل فعل شدن ژن‌های درگیر در بیوسنتر اسید جاسمونیک نیز مرتبط است (Gout *et al.*, 2002).

افزوده شد و به شدت تکان داده شد. سپس در زیر هود و به سرعت، ۵ میلی لیتر اسید سولفوریک ۹۸٪ به هر شیشه اضافه شد. پس از گذشت ۴۵ دقیقه و با تثیت رنگ قهقهه‌ای مایل به زرد میزان جذب نوری نمونه‌ها در طول موج ۴۸۵ نانومتر قرائت شد. در نهایت میزان کربوهیدرات‌های محلول برگی با استفاده از منحنی استاندارد کربوهیدرات در واحد وزن خشک گیاه محاسبه گردید (Renaut *et al.*, 2005).

سنچش پراکسید هیدروژن با استفاده از روش Sagisaka (1976) انجام شد. به این منظور مقدار ۰/۵ گرم از بافت تر برگ با ۵ میلی لیتر اسید تری‌کلرواستیک ۱ درصد در حمام یخ کاملاً سایده و همگن شد. هموژن حاصل به مدت ۱۵ دقیقه در ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ گردید. در مرحله بعد، در حمام یخ ۰/۵ میلی لیتر از محلول فوق به لوله آزمایش منتقل و به آن ۰/۵ میلی لیتر بافر فسفات پتابسیم ۱۰ میلی مولار با pH=۷ و ۱ میلی لیتر یدید پتابسیم ۱ مولار اضافه گردید. در نهایت جذب نمونه‌ها در طول موج ۳۹۰ نانومتر به کمک دستگاه اسپکتروفوتومتر تعیین گردید. سپس بر اساس منحنی استاندارد آب اکسیژنه، غلظت پراکسید هیدروژن در نمونه‌ها بر حسب میکرومول بر گرم وزن تر برگ محاسبه شد. سنچش میزان پراکسیداسیون لیپیدهای غشاء با استفاده از روش Heath and Packer (1968) بر اساس تشکیل کمپلکس مالون دی آلدئید حاصل از پراکسیداسیون لیپیدهای غشاء انجام شد. به این منظور ۰/۲ گرم بافت تر برگ با ۵ میلی لیتر اسید تری‌کلرواستیک اسید ۰/۱ درصد در هاون چینی به خوبی سایده و همگن شد. همگنای حاصل به مدت ۵ دقیقه و در ۱۰۰۰۰ دور سانتریفیوژ گردید. سپس ۴ میلی لیتر از محلول اسید تری‌کلرواستیک ۲۰ درصد که حاوی اسید تیوباریتوريک ۰/۵ درصد بود، اضافه شد. مخلوط حاصله به مدت ۳۰ دقیقه در حمام آب گرم ۹۰ درجه قرار گرفت و بعد از اتمام این مدت به حمام یخ منتقل شد. در مرحله بعد، مجدداً محلول مورد نظر به مدت ۱۰ دقیقه و در ۱۰۰۰۰ دور

در شهریور ۱۳۹۰ در پژوهشکده علوم گیاهی دانشگاه فردوسی مشهد اجرا گردید. آزمایش به صورت فاکتوریل بر پایه طرح کاملاً تصادفی با ۳ تکرار انجام شد. تیمارهای مورد بررسی در آزمایش محلول‌پاشی مтанول در ۵ سطح شامل؛ شاهد (بدون محلول‌پاشی)، ۲۰، ۲۵، ۳۰ و ۳۵ درصد حجمی مтанول که به هر کدام از محلول‌ها دو گرم در لیتر گلیسین اضافه شد. افزودن گلیسین به محلول آبی مтанول سبب جلوگیری از صدمات ناشی از سمیت مтанول می‌شود. عامل خشکی شامل شاهد (۱۰۰ درصد ظرفیت زراعی) و تنش خشکی (۲۵ درصد ظرفیت زراعی) در نظر گرفته شد. هر واحد آزمایشی در این آزمایش از یک گلدان به حجم ۲/۵ لیتر تشکیل شد که از ماسه و خاک مزرعه به نسبت ۳:۱ پر گردید. برای تهیه خاک هر گلدان، خاک تهیه شده ابتدا از الک دو میلی متر عبور داده شد و به میزان ۲ کیلوگرم در هر گلدان ریخته شد. درصد رطوبت خاک از طریق اندازه‌گیری درصد وزنی روزانه رطوبت خاک و اضافه نمودن آب مصرفی توسط هر گلدان، تنظیم شد. محلول‌پاشی ۳ بار طی فصل رشد گیاه صورت گرفت. اولین محلول‌پاشی طی مرحله رویشی در ۲۱ شهریور ماه به فاصله ۴ هفته پس از کاشت و محلول‌پاشی‌های دیگر به ترتیب در اوایل گلدهی و اوایل غلاف دهی انجام شد. نحوه محلول‌پاشی به این صورت انجام گرفت که بر روی تمام قسمت‌های بوته نخود قطرات محلول جاری شد. برای استخراج و سنچش پرولین و پروتئین به ترتیب از روش Bates و همکاران (1973) و Lowry (1951) استفاده شد.

به منظور سنچش کربوهیدرات محلول برگی، ۰/۱ گرم از بافت خشک برگ را به فالکون‌های پلاستیکی در پیچ‌دار منتقل کرده و سپس به آن ۱۵ میلی لیتر الکل اتیلیک ۸٪ که قبلاً آن را گرم نموده‌ایم افزوده و به مدت ۲۰ ثانیه ورتكس شدند. سپس به منظور جدا کردن فاز جامد از مایع، فالکون‌ها به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شدند. ۲ میلی لیتر از عصاره رویی به شیشه درپوش دار منتقل شد و ۱ میلی لیتر محلول فنل ۵٪

بررسی شد. فعالیت آنزیم بر حسب تغییرات واحد در دقیقه به ازای میلی‌گرم پروتئین محاسبه شد.

اندازه‌گیری فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز با روش (Beauchamp and Fridovich, 1971) انجام شد. بدین منظور ابتدا محلول بافر فسفات ۵۰ میلی مولار تهیه شد و سپس ترکیبات زیر EDTA ۰/۱ میلی مولار، نیتروبیوترازوکسیم (NBT) ۷۵ میکرو مولار، متیونین ۱۳ میلی مولار، ریوفلاوین ۴ میکرومولار، به ترتیب اضافه گردید. در نهایت با اضافه شدن ۱۰۰ میکرولیتر عصاره تحت روشنایی لامپ فلورسنت واکنش آغاز می‌شود. پس از گذشت ۱۵ دقیقه جذب نمونه‌ها در طول موج ۵۶۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر خوانده شد. یک واحد فعالیت سوپراکسید دیسموتاز معادل ۵۰ درصد ممانعت از تغییر رنگ NBT در برابر نور بیان می‌شود. فعالیت آنزیمی بر حسب واحد آنزیم در مقدار پروتئین کل (میلی‌گرم) در ۱۰۰ میکرولیتر عصاره بیان گردید. داده‌ها پس از جمع‌آوری توسط نرم‌افزار Mstat-C تجزیه واریانس شدند و میانگین‌ها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۵ درصد مقایسه شدند.

نتایج

نتایج تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که تیمار محلول‌پاشی متابول و تیمار تنفس خشکی تأثیر معنی‌داری بر مقدار پروتئین کل محلول برگی داشت ($P \leq 0.01$)؛ اما اثر متقابل متابول و تنفس بر این صفت معنی‌دار نبود (جدول ۱). در بین تیمارهای محلول‌پاشی متابول بیشترین مقدار پروتئین کل در تیمارهای ۲۵ و ۳۰ درصد حجمی متابول بود که با دیگر غلظت‌های متابول اختلاف معنی‌داری نداشت. کمترین مقدار برای این صفت نیز مربوط به سطح شاهد بود که با سطوح ۲۵ و ۳۰ درصد حجمی تفاوت معنی‌داری داشت (جدول ۲). تجزیه واریانس نتایج مربوط به تغییرات پرولین نشان داد که محلول‌پاشی متابول، تنفس خشکی و اثر متقابل متابول و تنفس بر میزان پرولین معنی‌دار ($P \leq 0.01$) بود (جدول ۱).

سانتریفیوژ شد. در نهایت جذب نوری هر یک از نمونه‌ها در طول موج ۵۳۲ نانومتر خوانده شد و با استفاده از رابطه‌ی زیر غلظت مالون دی‌آلدئید محاسبه شد.

$$A = \varepsilon b c$$

در معادله‌ی فوق A : جذب نمونه مورد نظر، ε : ضریب خاموشی که برابر $1.55 \times 10^{-5} \text{ Mcm}^{-1}$ است و c : غلظت مالون دی‌آلدئید بر حسب $\mu\text{mol/g FW}$ می‌باشد.

به منظور تهیه عصاره آنزیمی برگ با ۱۰ میلی‌لیتر بافر فسفات پتاسیم در هاون چینی ساییده شد. سپس مخلوط حاصل به لوله‌های آزمایش منتقل شد و با استفاده از سانتریفیوژ یخچال دار در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و با سرعت ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۲۴ دقیقه سانتریفیوژ شد. پس از پایان سانتریفیوژ، محلول رویی به عنوان عصاره آنزیمی استفاده شد. اندازه‌گیری فعالیت آنزیم پراکسیداز بر اساس روش Holy (1972) اندازه‌گیری شد. بدین منظور، ابتدا ۲ میلی‌لیتر تامپون استات ۰/۲ مولار با $\text{pH}=5$ ، ۰/۳ میلی‌لیتر آب اکسیژن و ۰/۲ درصد، ۰/۱ میلی‌لیتر بنزیدین ۰/۰۲ مولار محلول در متابول ۵۰ درصد، در حمام یخ مخلوط شدند، سپس ۰/۱ میلی‌لیتر از عصاره آنزیمی برگ به این مخلوط واکنش اضافه شد. منحنی جذب نوری نمونه‌ها با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر هر ۳۰ ثانیه به مدت ۳ دقیقه در طول موج ۵۳۰ نانومتر رسم شد. واحد آنزیم به ازای ۲۵ $\mu\text{mol ml}^{-1} \text{ H}_2\text{O}_2$ درجه سانتی‌گراد تعریف شد و با کمک منحنی استاندارد فعالیت ویژه آنزیم بر حسب تغییرات واحد آنزیم در دقیقه به ازاء هر میلی‌گرم پروتئین محاسبه شد. اندازه‌گیری میزان فعالیت آنزیم کاتالاز با روش Candlee and Scandalios (1984) انجام شد. ابتدا ۲/۵ میلی‌لیتر بافر فسفات پتاسیم ۰/۰۵ مولار و ۰/۳ میلی‌لیتر آب اکسیژن ۰/۲ در حمام یخ با یکدیگر مخلوط شدند و بلا فاصله ۰/۳ میلی‌لیتر عصاره آنزیمی به آن افزوده شد. منحنی تغییرات جذب در طول موج ۲۴۰ نانومتر به مدت ۳-۴ دقیقه

معنی دار نبود (جدول ۱). در بین تیمارهای محلول پاشی، غلظت‌های مختلف مтанول اختلاف معنی داری باهم نداشتند و در یک گروه آماری قرار گرفتند ولی تفاوت آن‌ها با شاهد معنی دار بود (جدول ۲). نتایج تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که تیمار محلول پاشی مtanول (P ≤ 0.05) و تیمار تنفس خشکی (P ≤ 0.01) تأثیر معنی داری بر فعالیت آنزیم کاتالاز داشت. اثرات مقابله تنفس خشکی و محلول پاشی مtanول بر این صفت معنی دار نبود (جدول ۱). در بین تیمارهای محلول پاشی غلظت ۳۵ درصد حجمی مtanول بیشترین میزان فعالیت را داشت که با دیگر سطوح به جز سطح ۲۵ درصد حجمی تفاوت معنی داری نداشت و کمترین میزان فعالیت این آنزیم در سطح ۲۵ درصد حجمی مtanول مشاهده شد که با سطوح شاهد و ۳۵ درصد حجمی اختلاف معنی داری داشت (جدول ۲). نتایج تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که تیمار محلول پاشی مtanول و تیمار تنفس خشکی تأثیر معنی داری بر میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز داشت (P ≤ 0.01). اما اثر مقابله مtanول و تنفس بر این صفت معنی دار نبود (جدول ۱). در بین سطوح مختلف مtanول، بیشترین فعالیت آنزیم متعلق به سطح شاهد بود که با سطوح ۲۰ و ۳۵ درصد حجمی مtanول اختلاف معنی داری نداشت. کمترین میزان این صفت در سطح ۳۰ درصد حجمی مشاهده شد که تفاوت معنی داری با سطح شاهد و ۳۵ درصد حجمی مtanول داشت (جدول ۲). نتایج تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که تیمار محلول پاشی مtanول و تیمار تنفس خشکی تأثیر معنی داری (P ≤ 0.01) بر میزان پراکسید هیدروژن داشت. اثر مقابله مtanول و تنفس در تمامی سطوح نسبت به سطح شاهد کاهش داشت اما معنی دار نبود (جدول ۱). در بین غلظت‌های مtanول مورد استفاده در آزمایش، سطح شاهد (بدون محلول پاشی) بیشترین میزان پراکسید هیدروژن را داشت که با سطوح ۳۵ و ۲۰ درصد حجمی مtanول اختلاف معنی داری نداشت. کمترین میزان این صفت در سطح ۲۵ و ۳۰ درصد حجمی مtanول مشاهده شد که با سطوح شاهد و ۳۵ درصد حجمی تفاوت معنی داری داشت (جدول ۲). نتایج تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که تیمار محلول پاشی مtanول و تیمار تنفس خشکی تأثیر معنی داری (P ≤ 0.01) بر میزان کربوهیدرات‌های محلول برگی داشت؛ اما اثر مقابله مtanول و تنفس بر این صفت

در بین سطوح مختلف مtanول، محلول پاشی ۲۵ و ۳۰ درصد حجمی مtanول بیشترین میزان پرولین را داشتند که با سایر سطوح حجمی مtanول اختلاف معنی داری داشتند. کمترین میزان پرولین به سطح شاهد مربوط بود که با سطوح ۳۵ درصد حجمی مtanول اختلاف معنی داری نداشت (جدول ۲). در برهمکنش مtanول و تنفس خشکی بیشترین میزان پرولین متعلق به سطح ۳۰ درصد حجمی مtanول در تیمار تنفس خشکی بود که با دیگر سطوح اختلاف معنی داری داشت و کمترین میزان این صفت مربوط به سطح شاهد در تیمار بدون تنفس خشکی بود (شکل ۱). نتایج تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که تیمار محلول پاشی مtanول و تیمار تنفس خشکی تأثیر معنی داری (P ≤ 0.01) بر میزان مالون دی آلدهید داشت؛ اما اثر مقابله مtanول و تنفس بر این صفت معنی دار نبود (جدول ۱). در بین سطوح مختلف مtanول، سطح شاهد بیشترین تجمع مالون دی آلدهید را داشت که با کلیه سطوح محلول پاشی مtanول اختلاف معنی داری داشت. کمترین تجمع نیز در سطح ۳۰ درصد حجمی مtanول بود که با سطوح ۲۵ و ۳۵ درصد حجمی اختلاف معنی داری نداشت (جدول ۲). نتایج تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که تیمار محلول پاشی مtanول و تیمار تنفس خشکی تأثیر معنی داری (P ≤ 0.01) بر میزان پراکسید هیدروژن داشت. اثر مقابله مtanول و تنفس در تمامی سطوح نسبت به سطح شاهد کاهش داشت اما معنی دار نبود (جدول ۱). در بین غلظت‌های مtanول مورد استفاده در آزمایش، سطح شاهد (بدون محلول پاشی) بیشترین میزان پراکسید هیدروژن را داشت که با سطوح ۳۵ و ۲۰ درصد حجمی مtanول اختلاف معنی داری نداشت. کمترین میزان این صفت در سطح ۲۵ و ۳۰ درصد حجمی مtanول مشاهده شد که با سطوح شاهد و ۳۵ درصد حجمی تفاوت معنی داری داشت (جدول ۲). نتایج تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که تیمار محلول پاشی مtanول و تیمار تنفس خشکی تأثیر معنی داری (P ≤ 0.01) بر میزان کربوهیدرات‌های محلول برگی داشت؛ اما اثر مقابله مtanول و تنفس بر این صفت

جدول ۱- نتایج تجزیه واریانس ویژگی‌های بیوشیمیایی گیاه نخود در سطوح مختلف محلول پاشی مтанول تحت تنش شرایط خشکی

منابع تغییر	درجه آزادی	میانگین مربعات								
		پروتئین محلول برگی	پرولین	مالون دی آلدید	پراکسید هیدروژن	میزان کربوهیدرات	کاتالاز	پراکسیداز	پراکسید دیسموتاز	
مانanol	4	0.379 **	3.237 **	0.071 **	0.283 **	39.449 **	0.013 *	0.043 **	11.831 **	
تنش خشکی	1	1.432 **	35.035 **	0.717 **	5.559 **	748.701 **	0.117 **	0.087 **	22.136 **	
مانanol \times تنش	4	0.068 ns	1.327 **	0.006 ns	0.006 ns	5.519 ns	0.001 ns	0.005 ns	2.204 ns	
خطای آزمایش	20	0.067	0.030	0.002	0.017	2.965	0.003	0.003	1.063	
ضریب تغییرات (%)	-	12.20	6.45	1.43	7.31	5.12	24.68	15.92	11.75	

ns، ** و *: به ترتیب غیر معنی دار و معنی دار در سطح احتمال ۱ و ۵ درصد

جدول ۲- مقایسه میانگین ویژگی‌های بیوشیمیایی گیاه نخود تحت تأثیر سطوح مختلف محلول پاشی مтанول

مانanol	پروتئین محلول برگی	پرولین	مالون دی آلدید	پراکسید هیدروژن	میزان کربوهیدرات	کاتالاز	پراکسیداز	پراکسید دیسموتاز
شاهد	1.766 b	1.833 c	1.705 a	2.042 a	30.62 b	0.249 a	0.481 a	10.48 a
%۲۰ حجمی	2.084 ab	2.917 b	1.333 b	1.828 ab	35.68 a	0.202 ab	0.365 abc	9.345 ab
%۲۵ حجمی	2.382 a	3.208 a	1.145 bc	1.603 b	35.73 a	0.166 b	0.306 bc	7.790 bc
%۳۰ حجمی	2.342 a	3.487 a	0.921 c	1.532 b	35.35 a	0.206 ab	0.265 c	6.933 c
%۳۵ حجمی	2.028 ab	2.005 c	1.103 bc	1.843 ab	33.47 ab	0.269 a	0.408 ab	9.322 ab

میانگین‌هایی که در هر ستون حداقل دارای یک حرف مشترک می‌باشند مطابق آزمون چندامنه‌ای دانکن ($p \leq 0.05$) اختلاف معنی داری ندارند.

بحث

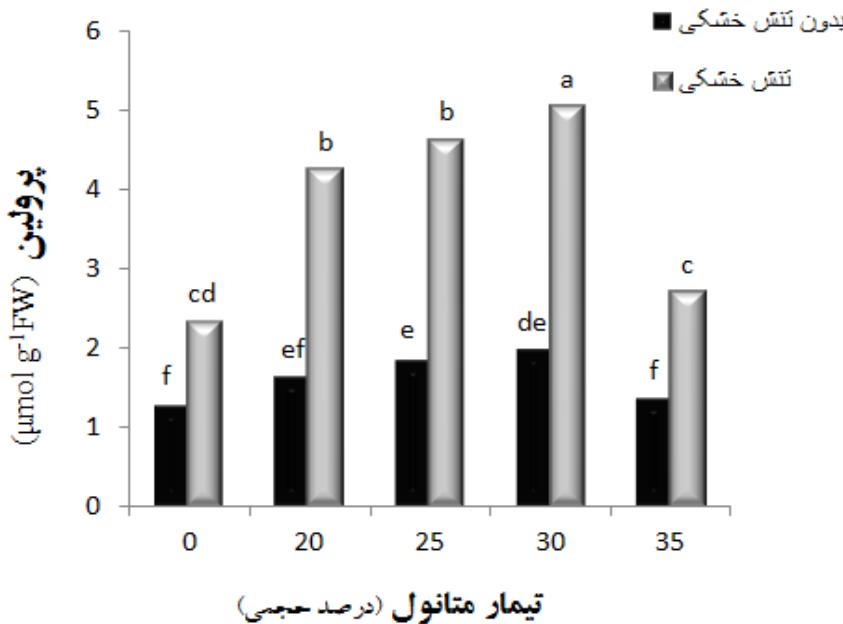
پروتئین کل محلول برگی

گیاه قرار می‌دهد (Ivanova *et al.*, 2001). به نظر می‌رسد محلول‌پاشی مтанول با افزایش فعالیت باکتری‌های متیلوتروفیک منجر به افزایش تولید هورمون اکسین و سیتوکینین در گیاه می‌شود و از طرف دیگر مشخص شده هورمون‌های اکسین و سیتوکینین در افزایش پروتئین‌سازی در گیاهان نقش بسزایی دارند (Ivanova *et al.*, 2001). در آزمایشی بر روی بادام‌زمینی گزارش شد که محلول‌پاشی مтанول منجر به افزایش مقدار پروتئین در گیاه شد (Vyshkayy *et al.*, 2008).

پرولین

افزایش پرولین در شرایط تنش خشکی، به عنوان یک پاسخ دفاعی گیاه به تنش خشکی مطرح است. تجمع زیاد پرولین در سلول‌های تحت تنش سبب محافظت از سلول در شرایط تنش و همچنین جلوگیری از ایجاد سمیت در سلول می‌شود (Tawfik, 2008). پرولین همچنین در حفظ ساختار غشاء، ایجاد سازگاری اسمزی و حفظ ساختار آنزیم‌ها در سلول، ایفاده نقش می‌کند (Ashraf and Iram, 2005) به دلیل خاصیت هیدروفیلی پرولین، این مولکول ممکن است جایگزین مولکول‌های آب در اطراف نوکلئیک اسیدها، پروتئین‌ها و مولکول‌های غشایی گردد و از این طریق اثرات یون‌های تخریب‌کننده برای ترکیبات را کاهش داده و بدین‌وسیله محافظت از این ترکیبات و ساختار غشاء را انجام دهد (Bayoumi *et al.*, 2008). در بررسی که بر روی *Lotus japonicus* صورت گرفت افزایش میزان پرولین در شرایط تنش خشکی و شوری را تأیید نمودند (Diaz *et al.*, 2005). در این تحقیق دلیل افزایش پرولین در شرایط تنش را به علت افزایش فعالیت آنزیم پیرولین ۵-کربوکسیلات سنتتاز (که در مسیر بیوستز پرولین نقش دارد) و کاهش فعالیت آنزیم پرولین دهیدروژناز (که در تجزیه پرولین ایفاده نقش می‌کند) دانسته‌اند. علاوه بر این، تبدیل پرولین به گلوتامات نیز به عنوان دلیل دیگر برای کاهش میزان پرولین در سطوح پایین تنش شوری ذکر شده است (Diaz *et al.*, 2005). نتایج تحقیقات Najaphy و همکاران (2010) نیز

در تنش‌های غیرزنده از قبیل تنش خشکی، شوری، گرمای سرما، بیان یکسری از پروتئین‌ها در گیاه افزایش می‌یابد. این پروتئین‌ها در ایجاد سازگاری با شرایط تنش ایفاده نقش می‌کنند. علاوه بر آن، در شرایط تنش شوری و خشکی در سازگاری اسمزی گیاه نیز نقش دارند (Ashraf and Harris, 2004). بالاتر بودن میزان پروتئین محلول برگی در رقم متحمل به تنش خشکی *P.aculeata* نسبت به رقم حساس به تنش *P.vulgaris* در بررسی Ashraf and Iram (2005)، نیز گزارش شده است. در یک آزمایش، تنش کمبود آب غلظت پرولین و پروتئین‌های محلول را در برگ‌های نخود افزایش داد به‌طوری که غلظت پروتئین‌های محلول در برگ‌ها تا ۴۳ درصد در مقایسه با تیمارهای شاهد افزایش یافت (Najaphy, *et al.*, 2010). تنظیم اسمزی شامل تجمع فعال املاح سلولی از جمله پروتئین‌های محلول و پرولین در درون گیاه در پاسخ به کاهش پتانسیل آب خاک و کاهش اثرات مضر کمبود آب می‌باشد. به عنوان یک نتیجه تجمع املاح، پتانسیل اسمزی سلول را کاهش می‌دهد، که به‌نوبه خود، آب به درون سلول جذب شده و منجر به حفظ تورگر آن می‌شود (Najaphy, *et al.*, 2010). افزایش در غلظت پروتئین محلول تحت تنش خشکی می‌تواند به افزایش درسترنز پروتئین مربوط باشد. پرولین آزاد، قند محلول و پروتئین‌های محلول به عنوان عوامل اسمزی یا محافظت کننده‌های اسمزی نقش مهمی در تنظیم اسمزی کمبود آب دارند. در این مطالعه نیز مقدار پروتئین کل محلول برگی در شرایط تنش افزایش معنی‌داری نسبت به شرایط بدون تنش داشت. باکتری‌های همزیست مانند متیلوتروفیک روی برگ اکثر گیاهان زراعی زندگی می‌کنند که این باکتری‌ها در ازای دریافت متابولیت مانند اکسین می‌شود پیش‌ماده ساخت بعضی از هورمون‌ها مانند اکسین و سیتوکینین را که نقش مهمی در تسريع روند رشد و فرآیندهای فیزیولوژیکی گیاه به عهده دارند را در اختیار



شکل ۱- اثر متقابل متانول و تنش خشکی بر محتوای پرولین

* ستون‌هایی که دارای حروف مشترک می‌باشند مطابق آزمون چنددامنه‌ای دانکن اختلاف معنی‌داری ندارند (در سطح احتمال ۵ درصد).

جمع مالون دی آلدئید در شرایط تنش خشکی نشان دهنده تخریب غشاء‌های سلولی است (Eraslan *et al.*, 2007). تولید گونه‌های اکسیژن فعال طی تنش اکسیداتیو ناشی از تنش خشکی، سبب تخریب ساختار لیپیدی غشاء شده و از این طریق میزان مالون دی آلدئید را افزایش می‌دهد (Eraslan *et al.*, 2007). در این مطالعه نیز تجمع مالون دی آلدئید در شرایط تنش خشکی افزایش معنی‌داری نسبت به شرایط بدون تنش داشت. نتایج حاصل از بررسی محققان نشان داده است که در شرایط تنش خشکی، میزان پراکسیداسیون لیپیدها افزایش یافته و در نتیجه میزان مالون دی آلدئید در سلول‌های تحت تنش افزایش می‌یابد (Gunes *et al.*, 2006). با توجه به کاهش میزان پراکسید هیدروژن و پراکسیداسیون لیپیدها در اثر محلول‌پاشی متانول در این مطالعه می‌توان کاهش تجمع مالون دی آلدئید را منطقی دانست.

پراکسید هیدروژن
تنش‌های محیطی از جمله تنش شوری، خشکی و دمای بالا سبب محدود شدن تثیت دی اکسید کربن می‌شوند، بنابراین می‌توان گفت که با کاهش غلظت دی اکسید کربن کلرопلاستی، تنفس نوری افزایش یافته و در نتیجه

موید افزایش میزان پرولین در ژنتیک‌های نخود تحت شرایط تنش خشکی است. در این تحقیق نیز تیمار تنش خشکی باعث افزایش میزان پرولین نسبت به تیمار بدون تنش خشکی شد. متانول محلول‌پاشی شده بر روی برگ توسط آنزیم متانول اکسیداز و با از دست دادن 2H^+ تبدیل به فرمات (متانوئیک اسید) می‌شود. فرمات در مرحله بعد توسط آنزیم فرمات دهیدروژناز تبدیل به CO_2 و H^+ می‌شود (Nonomura *et al.*, 1992). از طرف دیگر گزارش شده آنزیم پیرولین-5-کربوکسیلات سنتاز (P5CS) در شرایط اسیدی بیشترین فعالیت را دارد (Yordanov *et al.*, 2003). به نظر می‌رسد متانول با کاهش pH در گیاه منجر به افزایش فعالیت آنزیم پیرولین-5-کربوکسیلات سنتاز شده و در نهایت تجمع پرولین در برگ را خواهیم داشت. پرولین علاوه بر شرکت در تنظیم اسمزی، نقش‌های مهمی مانند حفاظت از سیستم‌های غشایی سلول (Terzi *et al.*, 2006)، سمیت زدایی (Puritch and Barker, 1967) و تنظیم اسیدیته سیتوزول را نیز بر عهده دارد (Hare *et al.*, 1998).

مالون دی آلدئید

ثبت CO_2 را در گیاه افزایش دهد (Zebic *et al.*, 2003). مтанول در مقایسه با CO_2 مولکول نسبتاً کوچکتری است که به راحتی توسط گیاهان، جذب شده و مورد استفاده قرار می‌گیرد (Downie *et al.*, 2004). یکی از مهم‌ترین خصوصیات آنزیم روپیسکو این است که نه تنها ریبو‌لوز ۱ و ۵ پیس فسفات را کربوکسیله می‌کند بلکه آن را اکسید نیز می‌کند. اکسیداسیون نیز منجر به انجام تنفس نوری در گیاه می‌شود (Makhdum *et al.*, 2002). مтанول با متابولیزه شدن سریع به دی اکسید کربن (Gout *et al.*, 2000) و با افزایش CO_2 منجر به روند کربوکسیلامیسیون (Faver and Greik, 1996). بنابراین با افزایش فتوستتر در اثر کاربرد مтанول، افزایش کربوهیدرات محلول برگی را خواهیم داشت. در بررسی که بر روی پنه در مناطق خشک پاکستان صورت گرفت، بیشترین میزان آسیمیلامیسیون CO_2 و فتوستتر در غلاظت ۳۰ درصد حجمی مтанول مشاهده شد (Makhdum *et al.*, 2002).

کاتالاز

کاتالاز به عنوان یک آنزیم آنتی‌اکسیدانی عمل کرده و در حذف و جاروب کردن پراکسید هیدروژن تولید شده در پراکسیزوم‌ها و کاهش اثرات تخریبی گونه‌های اکسیژن Simova Stoilova *et al.*, (2008). در مطالعه‌ای که بر عهده دارد (Helal and samir, 2008) در گیاه لوبیا تحت تنش خشکی نیز گزارش شده است در گیاه لوبیا تحت تنش خشکی نیز افزایش فعالیت آنزیم کاتالاز در شرایط تحت تنش خشکی ایجاد شده در گیاهان، قندها در گیاه لوبیا تحت تنش خشکی نیز گزارش شده است (Ahmed *et al.*, 2002). در این مطالعه نیز فعالیت آنزیم کاتالاز در شرایط تحت تنش خشکی افزایش معنی‌داری نسبت به شرایط بدون تنش داشت. یکی از نقش‌های مهم محلول‌پاشی مтанول جلوگیری از کاهش اثر تنش‌های القا شده به گیاهان زراعی در اثر انجام تنفس نوری در آن‌هاست (Downie *et al.*, 2004). با توجه به اینکه٪۲۵

تولید پراکسید هیدروژن نیز افزایش می‌یابد (Yoadanov *et al.*, 2003). نتایج بررسی محققان نشان داده است که پراکسید هیدروژن به عنوان یک سیگنال جهت بسته شدن روزنه‌ها، سازگاری برگ نسبت به میزان نور زیاد و همچنین القاء پروتئین‌های شوک گرمایی عمل می‌نماید (Mahajan and Tuteja, 2005). علاوه بر این، تجمع پراکسید هیدروژن سبب القاء تجمع هورمون‌های تنش از Shao *et al.*, (2006) نیز افزایش میزان (Triticum aestivum) پراکسید هیدروژن در گیاهان گندم (Nayyar and Gupta, 2008) و ذرت (Zea mays) را در شرایط تنش خشکی گزارش نمودند. در این مطالعه نیز میزان پراکسید هیدروژن در شرایط تنش خشکی افزایش معنی‌داری نسبت به شرایط بدون تنش داشت. برای جلوگیری از کاهش چرخه انتقال الکترون کلروپلاستی، گیاهان عالی مسیر تنفس نوری را به NADP⁺ راه انداخته و از این طریق سبب تولید مجدد می‌شوند. در قسمتی از مسیر تنفس نوری پراکسید هیدروژن در پراکسیزوم‌ها تولید می‌شود که می‌تواند ناشی از پراکسیداسیون اسیدهای چرب در پراکسیزوم باشد (Shao *et al.*, 2008). محلول‌پاشی مтанول سبب افزایش تثبیت دی اکسید کربن می‌شود، بنابراین تولید مجدد NADP⁺ توسط سیکل کالوین افزایش یافته و به دنبال آن چرخه انتقال الکترون فتوستتری نیز افزایش می‌یابد که این امر منجر به کاهش تولید رادیکال‌های سوپراکسید و اکسیژن یکتایی در کلروپلاست‌ها می‌گردد.

کربوهیدرات محلول برگی

از میان مواد اسموتیک آلی موجود در گیاهان، قندها مسئول بیش از ۵۰٪ پتانسیل اسمزی ایجاد شده در گیاه در شرایط تنش شوری و خشکی می‌باشند (Mahajan and Tuteja, 2005). افزایش میزان کربوهیدرات‌ها در شرایط تنش می‌تواند به عنوان یک سیگنال متابولیکی به تنش خشکی و شوری عمل نماید و در بروز پاسخ‌های دفاعی نقش داشته باشد (Niknam *et al.*, 2004). محلول‌پاشی مtanول باعث افزایش غلاظت CO_2 شده که می‌تواند میزان

در گیاه می‌شود (Faver and Greik, 1996). کاهش تنفس نوری در اثر کاربرد متابول در سویا و کلروپلاست‌های اسفناج نیز گزارش شد (Gout *et al.*, 2000). بنابراین کاهش فعالیت آنزیم‌های پراکسیداز و کاتالاز را می‌توان به کاهش تنفس‌های القا شده در طی فرآیند تنفس نوری از قبیل کاهش میزان پراکسید هیدروژن و سوپراکسید هیدروژن در برگ‌ها نسبت داد.

سوپراکسید دیسموتاز

در تحقیقی روی گیاهان یولاف مشاهده کردند که در شرایط تنفس خشکی کاهش شدیدی در فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز در مرحله گلدهی رخ داد. این کاهش فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز از یک گونه به گونه دیگر متغیر بود (Helal and samir, 2008). این محققان کاهش در فعالیت سوپراکسید دیسموتاز را تحت تنفس خشکی نشان دهنده مهار توانایی پالایش کنندگی در سلول‌های برگ بیان کردند و نیز اظهار داشتن هرگونه کاهش در فعالیت SOD را می‌توان به کاهش ستز یا افزایش تخریب آنزیم نسبت داد (Gunes *et al.*, 2006). همچنین در یک تحقیق دیگر روی گیاهان ذرت مشاهده شد که در بعضی مراحل رشد و نمو گیاهان ذرت، تنفس خشکی باعث کاهش فعالیت سوپراکسید دیسموتاز شد، درحالی‌که در همین مراحل فعالیت پراکسیداز در اثر تنفس خشکی افزایش یافت (Koca *et al.*, 2007). در این مطالعه نیز فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز در شرایط تنفس خشکی کاهش معنی‌داری نسبت به شرایط بدون تنفس داشت. سوپراکسید دیسموتاز اولین مرحله دفاعی علیه ROS‌ها را تشکیل می‌دهد و یکی از مهم‌ترین پالایش کننده‌های سوپراکسید است. در نتیجه فعالیت این آنزیم سوپراکسید به پراکسید هیدروژن و اکسیژن تبدیل می‌شود. سپس پراکسید هیدروژن تولید شده به‌وسیله پراکسیدازها پالایش می‌گردد (Eraslan *et al.*, 2007). یک حالت از تشکیل ROS بسته شدن روزنے به عنوان یک پاسخ به خشکی و در نتیجه کاهش غلظت CO_2 در مزوپلیمر برگ و در نتیجه تجمع NADPH است، در این حالت اکسیژن

از کربن گیاه صرف تنفس نوری می‌شود با استفاده از محلول‌پاشی متابول که منجر به افزایش غلظت CO_2 درون‌سلولی می‌شود می‌توان مقدار تنفس نوری را به کمترین اندازه رساند (Ramberg *et al.*, 2002). از این رو با کاهش تنفس نوری پراکسید هیدروژن تولید شده در (Simova Stoilova *et al.*, 2008) از طرف دیگر نقش اصلی کاتالاز جاروب کردن پراکسید هیدروژن تولید شده از تنفس نوری می‌باشد (Simova Stoilova *et al.*, 2008). بنابراین به‌نظر می‌رسد متابول با کاهش میزان پراکسید هیدروژن در کاهش فعالیت آنزیم کاتالاز نقش دارد.

پراکسیداز

پراکسیداز اغلب به عنوان آنزیم آنتی‌اکسیدان در نظر گرفته شده، که از سلول در برابر نفوذ مخرب H_2O_2 و گونه‌های اکسیژن فعال محافظت می‌کند. افزایش فعالیت پراکسیداز تحت تنفس آب نشان دهنده شکل‌گیری بخش زیادی H_2O_2 در طول تنفس آبی است (Helal and samir, 2008). پراکسید هیدروژن و سوپراکسید هیدروژن اولین ترکیب‌های تولید شده در شرایط تنفس خشکی هستند، لذا پراکسیداز و سوپراکسید دیسموتاز احتمالاً اولین آنزیم‌های مقابله با آن‌ها می‌باشند (Gunes *et al.*, 2006). به‌نظر می‌رسد پراکسیدازها عموماً به عنوان آنزیم‌های مسمومیت‌زدای گونه‌های اکسیژن فعال عمل می‌کنند، زیرا پراکسید هیدروژن (H_2O_2) ماده‌ای است که برای دامنه گستره‌ای از واکنش‌های وابسته به پراکسیداز به عنوان ماده پذیرنده عمل می‌کند (Dat *et al.*, 2000). افزایش فعالیت آنزیم پراکسیداز در شرایط تنفس خشکی در گیاه *Ctenanthe Setosa* و در شرایط تنفس شوری در گیاه ذرت نیز گزارش شده است (Levent tona *et al.*, 2008).

آنژیم رویسکو با اکسیده کردن ریبولوز ۱ و ۵ بیس فسفات منجر به انجام تنفس نوری در گیاه می‌شود (Makhdum *et al.*, 2002). متابول با متابولیزه شدن سریع به دی اکسید کردن (Gout *et al.*, 2000) و با افزایش CO_2 منجر به روند کربوکسیلاتیون بیشتر و اکسیژن‌ناسیون کمتر

زنگیره انتقال الکترون می‌شود، بدین منظور از تجمع آن در کلروپلاست سلول‌های برگی و تشکیل سوپراکسید جلوگیری می‌شود. از طرف دیگر کاهش میزان پراکسید هیدروژن در سطوح ۲۵ و ۳۰ درصد حجمی متابول نشان دهنده فعالیت کمتر آنزیم سوپراکسید دیسموتاز در این سطوح است.

به عنوان یک پذیرنده جایگزین الکترون‌ها عمل می‌کند که منجر به تشکیل رادیکال‌های سوپراکسید می‌شود (Yordanov *et al.*, 2003). به نظر می‌رسد متابول با تبدیل CO_2 سبب افزایش غلظت CO_2 درون سلول‌های برگی شده و با انجام عمل فتوستز و ماده سازی بیشتر منجر به مصرف NADPH تولید شده در

References

- Ahmed, S., Nawata, E., Hosokawa, M., Domae, Y. and Sakuratani, T. (2002). Alterations in photosynthesis and some antioxidant enzymatic activity of mungbean subjected to waterlogging. *Journal of Plant Science* 163: 117-123.
- Ashraf, M and Iram, A. (2005). Drought stress induced changes in some organic substances in nodules and other plant parts of two potential legumes differing in salt tolerance. *Journal of Flora* 200: 535-546.
- Ashraf, M. and Harris, P.J.C. (2004). Potential biochemical indicators of salinity tolerance in plants, *Journal of Plant Science* 166: 3-16.
- Bates, L.S., Waldern, R.P. and Teare, I.D. (1973). Rapid determination of free proline for water stress studies. *Plant Soil Environment* 39: 205-207.
- Bayoumi, T.Y., Eid, M. and Metwali, E.M. (2008). Application of physiological and biochemical indices as a screening technique for drought tolerance in wheat genotypes. *African Journal of Biotechnology* 7: 2341-2352.
- Beauchamp, C. and Fridovich, I. (1971). Superoxide dismutase: improved assays and applicable to acryl amide gels. *Annual Review Biochemistry* 44: 276-287.
- Chandlee, J.M. and Scandalios, J.G. (1984). Analysis of variants affecting the catalase development program in Maize scutellum. *Journal of Apply Genetic* 69: 71-77.
- Clover, G., Smith, H., and Jaggard, K. (1998). The crop under stress. *British Sugar Beet Review* 66(3): 17-19.
- Dat, J., Vandebaele, S., Vranová, E., Van Montagu, M., Inzé, D and Van Breusegem, F. (2000). Dual action of active oxygen species during plant stress responses. *Cellular and Molecular Life Science* 57: 779-795.
- Diaz, P., Monza, J. and Marquez, A. (2005). Drought and saline stress, *Lotus japonicas*. Haworth Press, Inc., San Diego.
- Downie, A., Miyazaki, S., Bohnert, H., John, P., Coleman, J., Parry, M and Haslam, R. (2004). Expression profiling of the response of *Arabidopsis thaliana* to methanol stimulation. *Photochemistry* 65: 2305-2316.
- Eraslan, F., Inal, A., Savasturk, O. and Gunes, A. (2007). Changes in antioxidative system and membrane damage of lettuce in response to salinity and boron toxicity. *Journal of Crop and Horticultural Science* 114: 5-10.
- Faver, K.L. and Gerik, T.J. (1996). Foliar-applied methanol effects on cotton (*Gossypium hirsutum*.L) gas exchange and growth. *Field Crops Research* 47: 227-234.
- Galball, E and Kristine, W. (2002). The production of methanol by flowering plants and the global cycle of methanol. *Journal of Atmospheric Chemistry* 43: 195-229.
- Gout, E., Aubert, S., Bligny, R., Rebeille, F., Nonomura, A.R., Benson, A. and Douce, R. (2000). Plant Metabolism of methanol in plant cells. Carbon-13 nuclear magnetic resonance studies. *Journal of Plant Physiology* 123: 287-296.
- Gunes, A., Cicek, N., Inal, A., Alpaslan, M., Eraslan, F., Guneri E. and Guzelordu, T. (2006). Genotypic response of chickpea (*Cicer arietinum* L.) cultivars to drought stress implemented at pre-and post anthesis stages and its relations with nutrient uptake and efficiency. *Journal of Plant Soil Environment* 52: 868-876.
- Hare, P. D., Cress W. A. and Van Standen J. (1998). Dissecting the roles of osmolyte accumulation during stress. *Plant Cell Environment* 21: 535-553.
- Haston, A.D., and Roje, S. (2001). One carbon metabolism in higher plants. *Annual Review of Plant Biology* 52: 119-138.
- Heath, R.L. and Packer, L. 1968. Photoperoxidation in isolated chloroplasts: Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Journal of Biochemistry and Biophysics* 125: 189-198.
- Helal, R.M. and Samir, M. A. (2008). Comparative response of drought tolerant and drought sensitive maize genotypes to water stress. *Australian Journal crops science* 1: 31-36.

- Holy, M. C. (1972). Indole acetic acid oxidase: a dual catalytic enzyme. *Journal of Plant Physiology.* 50: 15-18.
- Hsiao, T.C. (2000). Leaf and root growth in relation to water status. *Journal of Horticultural Science* 35: 1051-1058.
- Ivanova, E. G., Dornina, N. V., Shepelyakovskaya, A. O., Laman, A. G., Brovko, F. A. and Trotsenko Y. A. (2001). Facultative and obligate aerobic methylobacteria synthesize cytokinins. *Journal of Microbiology* 69: 646-651.
- Ivanova, E. G., Dornina, N. V and Trotsenko, Y. A. (2001). Aerobic methylobacteria are capable of synthesizing auxins. *Journal of Microbiology* 70: 392-397.
- Koca, H., Bor, M., Ozdemir, F. and Turkcan, I. (2007). The effect of salt stress on lipid peroxidation, antioxidative enzymes and proline content of sesame cultivars. *Environmental and Experimental Botany* 60: 344-351.
- Levent tona, A., Kaya, C., Dikilitas, M. and Higgs, D. (2008). The effects of gibberelic acid and salinity on some antioxidant enzyme activities, plant growth parameters and nutritional status in maize plants. *Environmental and Experimental Botany* 62: 1-9.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randapp, R. J. (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. *Journal of Research Chemistry* 191: 265-275.
- Mahajan, S. and Tuteja, N. (2005). Cold, salinity and drought stresses: An overview, *Journal of Biochemistry and Biophysics* 444: 139–158.
- Makhdum, I. M., Nawaz, A. Shabab, M., Ahmad, F., and Illahi, F. (2002). Physiological response of cotton to methanol foliar application. *Journal of Research Pakistan Zakariya University* 13: 37-43.
- Mudgett, M. E. and Clarke, S. (1993). Characterization of plant L-isoaspartyl methyltransferases that may be involved in seed survival. Purification, characterization and sequence analysis of the wheat germ enzyme. *Journal of Biochemistry Research* 32: 1100-1111.
- Najaphy, A., Niari khamssi, N., Mostafaie, A. and Mirzaee, H. (2010). Effect of progressive water deficit stress on praline accumulation and protein profiles of leaves in chickpea. *African Journal of Biotechnology* 9: 7033-7036.
- Nayyar, H. and Gupta, D. (2006). Differential sensitivity of C₃ and C₄ plants to water deficit stress: Association with oxidative stress and antioxidants. *Environmental Experience Botany* 58: 106-113.
- Niknam, V., Bagherzadeh, M., Ebrahimzadeh, H. and Sokhansanj, A. (2004). Effect of NaCl on biomass and contents of sugars, proline and proteins in seedlings and leaf explants of *Nicotiana tabacum* grown in vitro. *Journal of Biological Plantarum* 48: 613-615.
- Nonomura, A. M. (1997). Method and composition for enhancing carbon fixation in plants. *National Academy Science* 99: 974-984.
- Nonomura, A. M., and Benson, A. A. (1992). The path of carbon in photosynthesis: Improved crop yields with methanol. *National Academy Science* 89: 9794-9798.
- Ober, E. (2001). The search for drought tolerance in sugar beet. *British Sugar Beet Review*. 69: 40-43.
- Puritch, G. S. and A. V. Barker. (1967). Structure and function of tomato leaf chloroplasts during ammonium toxicity. *Journal of Plant Physiology* 42: 1229-1238.
- Ramadant, T. and Omran, Y. (2005). The effects of foliar application of methanol on productivity and fruit quality of grapevine cv. flame seedlees. *Vitis Journal* 44, 11-16.
- Ramberg, H. A., Bradley, J. S., Olson, J. N. Nishio, J. Markwell, A and Osterman J. C. (2002). The role of methanol in promoting plant growth. *Review Plant Biochemistry and Biotechnology*. 1:113-126.
- Renaut, J., Hoffmann, I. and Hausman, J. F. (2005). Biochemical and physiological mechanisms related to cold acclimation and enhanced freezing tolerance in poplar planted. *Journal of Physiological Plantarum* 125: 82-94.
- Sagisaka, S. (1976). The occurrence of peroxide in a perennial plant Populas gelrica. *Journal of Plant Physiology* 57: 308–309.
- Sairam, R. K., Deshmukh, P. S and Shukla, D. S. (1997). Tolerance of drought and temperature stress in relation to increased antioxidant enzyme activity in wheat. *Journal of Agronomy and Crop Science* 178: 171-176.
- Shao, H. B., Chu, L. Y., Lu, Z. H and Kang, C. M. (2008). Primery antioxidant free radical scavenging and redox signalling pathways in higher plant cells. *International Journal Biology Science* 4: 8-14.
- Simova-Stoilova, L., Demirevska, K., Petrova, T., Tsenov, N and Feller, U. (2008). Antioxidative protection in wheat varieties under severe recoverable drought at seedling stage. *Plant Soil Environment* 54: 529-536.
- Tawfik, K. M. (2008). Effect of water stress in addition to potassium application on mungbean. *Australian Journal Basic Apply Science* 2: 42-52.

- Vyshkayy, M., Noormohammadi, Gh., Majidi, A., and Rabii, B. (2008). Effect of methanol on the growth function peanuts. *Journal of Agricultural Sciences* 1: 102-87. (In Persian).
- Yordanov, I., Velikova, V. and Tsonev, T. (2003). Plant responses to drought and stress tolerance. *Bulgarestan Journal of Plant Physiology* 2: 187-206.
- Zbiec, I., Karczmarczyk, S and Koszanski, Z. 2003. Influence of methanol on some cultivated plants. *Electronic Journal of Polish Agricultural Universities* 6: 1-7.

Effects of Foliar Application of Methanol on Biochemical Characteristics and Antioxidant Enzyme Activity of Chickpea (*Cicer arietinum L.*) Under Drought Stress

Saeed Reza Hossinzadeh¹, Azam Salimi², Ali Ganjeali³ and Raheleh Ahmadpour^{4*}

1- Biology Department, Faculty of Science, Khatam Al-Anbia University of Technology, Behbahan, Iran

2- Biology Department, Faculty of Science, Karazmi University, Tehran, Iran

3- Biology Department, Faculty of Science, Ferdowsi University, Mashhad, Iran

4- Biology Department, Faculty of Science, Khatam Al-Anbia University of Technology, Behbahan, Iran

Abstract

In order to evaluate the effects of foliar application of methanol on some physiological characteristics of chickpea under drought stress, an experiment was conducted as a factorial based on completely randomized design with three replications in 2011 at the Research Center of Plant Sciences in Ferdowsi University of Mashhad. The first factor was different levels of methanol including, 0 (control), 20, 25, 30, 35 volumetric percentage (v/v), which were used as foliar applications at three times during growth season of chickpea, with 10 days intervals. Second factor was drought stress condition in two levels 25 and 100 percent of field capacity. Results showed that there was significant difference ($P \leq 0.01$) between methanol levels concentrations regarding to leaf protein content, proline content, total soluble sugar, H_2O_2 content, catalase, peroxidase and SOD enzyme activity. Spraying with 30% volume level significantly increased leaf protein, proline and total soluble sugar content compared to control. Effects of drought and methanol were not significant on antioxidant enzyme activity, leaf protein content, total soluble sugar and H_2O_2 content but on the proline content was significant ($P \leq 0.05$).

Key word: Foliar application methanol, Drought stress, Antioxidant activity