فصلنامهٔ علمی-پژوهشی تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران
جلد ۲۵، شمارهٔ ٤، صفحهٔ ٤٦٩-٤٥٦ (۱۳۸۸)

اثر تنش خشکی و آسکوربات خارجی بر روی رنگیزه‌های فتوسنتزی، فلاونوئیدها، ترکیبهای فنلی و میزان پراکسیداسیون لیپیدی در گیاه انیسون (*Pimpinella anisum* L.)

ژیکا اسدی کاوان[۱]، مه‌لقا قربانلی[۲*] و آرین ساطعی[۳]

۱- کارشناس ارشد، عضو باشگاه پژوهشگران جوان، گروه زیست‌شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، گرگان
۲*- نویسنده مسئول، استاد، گروه زیست‌شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، گرگان، پست الکترونیک: ghorbanli@yahoo.com
۳- استادیار، گروه زیست‌شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، گرگان

تاریخ دریافت: تیر ۱۳۸۸ تاریخ اصلاح نهایی: مرداد ۱۳۸۸ تاریخ پذیرش: شهریور ۱۳۸۸

چکیده

استرس خشکی باعث تحریک ساخته شدن گونه‌های اکسیژن فعال در کلروپلاستهای گیاهی می‌شود و گونه‌های اکسیژن فعال نیز سبب پراکسیداسیون لیپیدهای غشایی و تخریب غشای سلولی می‌شود. انیسون (*Pimpinella anisum* L.) یکی از گیاهان دارویی بسیار معطر است که ارزش صادراتی فراوانی دارد. در این پژوهش، آسکوربات با هدف اهمیت کنترل استرس اکسیداتیو در تحمل به کمبود آب، بکار گرفته شد و تغییرات محتوای رنگیزه‌ای برگها، ترکیبهای فنلی کل و محتوای مالون دی‌آلدئید بر روی گیاه بررسی شد. طی یک مطالعه گلدانی، تنش خشکی براساس نسبتهای مختلفی از ظرفیت زراعی در سه سطح شاهد، متوسط و شدید (به‌ترتیب ۱۰۰، ٦۰ و ۲۵ درصد ظرفیت زراعی) و آسکوربات با یک غلظت ۱/٤ mM به صورت مه‌پاشی اعمال گردید. با پیشرفت تنش، محتوای کلروفیل و نسبت کلروفیل a به کلروفیل b کم شد، در حالی که مقدار فلاونوئید و آنتوسیانین افزایش یافت. همچنین در اثر دهیدراتاسیون، افزایش کاروتن و گزانتوفیل تنها در تنش متوسط گزارش شد. آسکوربات، میزان کلروفیلها و کاروتنوئیدها را زیاد نمود اما میزان فلاونوئید و آنتوسیانین را کاهش داد و تأثیر چشمگیری در افزایش ترکیبهای فنلی کل اندامها در تمام سطوح داشت. همچنین مقدار مالون دی‌آلدئید در شرایط تنش متوسط نسبتاً ثابت ماند ولی در شرایط تنش شدید به‌طور معنی‌دار افزایش یافت که حضور آسکوربات منجر به کاهش مؤثر این متابولیت شد. بنابر نتایج بدست آمده در این پژوهش، آسکوربات خارجی توانست با مکانیسمهای مختلفی توانایی گیاه انیسون را در پاسخ به تنش خشکی افزایش داده و اثر محافظتی در برابر اکسیداسیون لیپیدها (که ناشی از خشکی می‌باشد) داشته باشد.

واژه‌های کلیدی: تنش خشکی، تنش اکسیداتیو، آسکوربات خارجی، فلاونوئیدها، پراکسیداسیون لیپیدی، انیسون (*Pimpinella anisum* L.).

مقدمه

جنس *Pimpinella* به دلیل اهمیت طبی و دارویی گیاه *Pimpinella anisum* (anise, aniseed) معروف و شناخته شده است (Delazar *et al*., 2006) و به‌عنوان یک ادویه برای اولین بار توسط مصریان باستان و بعد توسط یونانی‌ها، رومی‌ها و اعراب کشت شد. این گیاه یک گیاه شیرین، گرم‌کننده و محرک است که باعث بهبود دستگاه گوارش شده، برای کبد و دستگاه گردش خون مفید است و دارای خاصیت ضد سرفه و اثر استروژنیک می‌باشد (Bown, 1995؛ Atesh & Erdogrul, 2003).

ترانس آنتول ($C_{10}H_{12}O$) تا ۹۵٪ اسانس روغنی دانه (میوه) این گیاه را تشکیل می‌دهد (Arslan *et al*., 2004). اسانس روغنی آن به لحاظ تجاری در عطرها، ساخت تنباکو و تولید دارو استفاده می‌شود و به صورت موضعی برای درمان گال و ناراحتیهای برونشی استفاده می‌شود (Bown, 1995؛ Atesh & Erdogrul, 2003). همچنین اسانس دانه انیسون خاصیت کنه‌کُشی جهت کنترل کنه‌های خانگی به نامهای *Dermatophagoides farinae* و *D. pteronyssinus* را داشته (Lee, 2004)، اثر مورفین را در موشها کاهش داده (Sahraei *et al*., 2002)، در ترمیم زخمهای معده (Al Mofleh *et al*., 2007)، خاصیت ضد اسپاسمودیکی (Tirapelli *et al*., 2006)، ضد صرعی (Pourgholami *et al*., 1999) و ضد قارچی (Kosalec *et al*., 2005) نقش دارد. عصاره اتانولی دانه انیس شامل ترانس آنتول، متیل چاویکول، استراگول، یوگنول، انیس آلدئید، کومارین‌ها (اومبلیفرون و اسکوپولتین)، مشتقات اسید کافئیک، فلاونوئیدها، اسیدهای چرب، پروتئین‌ها، مواد معدنی، پلی انها و پلی استیلن‌ها به‌عنوان ترکیبهای اساسی این گیاه بوده که خواص دارویی آن مربوط به وجود این ترکیبها می‌باشد (Kosalec *et al*., 2005).

کمبود آب شبیه سایر شرایط فوق‌العاده محیطی، تنش اکسیداتیو ایجاد می‌کند (Turkan *et al*., 2005) و از طریق بسته شدن روزنه و در نتیجه کمبود CO_2، باعث مهار فتوسنتز شده و منجر به تشکیل گونه‌های اکسیژن فعال (ROS) در کلروپلاست می‌شود که باعث آسیب به غشاء در اثر پراکسیداسیون لیپیدی می‌گردد (Mascher *et al*., 2005). گیاهان به خصوص آنهایی که در محیط‌های با تنش زیاد رشد می‌کنند، مجهز به سیستمهای دفاعی آنتی‌اکسیدان آنزیمی و غیر آنزیمی هستند تا بتوانند گونه‌های اکسیژن فعال تولید شده را کنترل کنند اما با این حال با تشکیل گونه‌های اکسیژن فعال، ممکن است آسیب اکسیداتیو اتفاق بیفتد و دفاع آنتی‌اکسیدانی ناتوان باشد (Hernandez *et al*., 2004). بنابراین در طی دهیدراتاسیون لازم است یکسری هماهنگی در مکانیسمهای حفاظت کننده در مقابل آسیب اکسیداتیو صورت گیرد تا ساختار ماکرومولکولها و غشاءها پایدار بماند (Hoekstra *et al*., 2001). آسکوربات اولین آنتی‌اکسیدان مهمی است که به‌طور مستقیم با پراکسید هیدروژن، رادیکالهای هیدروکسیل، سوپر اکسید و اکسیژن یکتایی واکنش می‌دهد و نقش مهمی در حفاظت کلروپلاست سلولهای گیاهی در برابر آسیب اکسیداتیو دارد (Horemans *et al*., 2000). به‌عنوان یک احیاء کننده در باز تولید α-توکوفرول، چرخه گزانتوفیل و حفاظت از آنزیمهای با گروه پروستتیک عناصر واسطه دخالت می‌کند (Smirnoff & Wheeler, 2000). ساختارهای سلولی را در مقابل حمله اکسیدانها به هنگام متابولیسم سریع در گیاهان حفظ می‌نماید و آسکوربات به‌عنوان آنتی‌اکسیدان سلولی، عامل پاسخ به تنش و کوفاکتور آنزیم موضوع بسیاری از مقالات طی سالهای اخیر بوده است (Debolt *et al*., 2007). به‌طوری که فعالیت آسکوربات پراکسیداز، مونو دهیدرو آسکوربات ردوکتاز، دهیدرو آسکوربات ردوکتاز و گلوتاتیون ردوکتاز، در ارتباط با شدت تنش خشکی در همه کلونیهای مطالعه شده در گیاه *Prunus* افزایش یافت (Sofo *et al*., 2005). به‌طور کلی، سازگاری به خشکی به این بستگی دارد که مقادیر گونه‌های اکسیژن فعال توسط سیستم آنتی‌اکسیدانی، نسبتاً پایین نگه داشته شود (Mascher *et al*., 2005).

در این مطالعه با هدف بکارگیری آسکوربات خارجی، اثرهای خشکی مورد بررسی قرار گرفت تا مکانیسمهایی که مسئول حفاظت از گیاه در مقابل تنش اکسیداتیو هستند، مشخص شوند و ارتباط بین خشکی و تنش اکسایشی بر روی پایداری غشاها بررسی شود. برای این منظور میزان مالون دی‌آلدئید، بررسی شد. تغییرات رنگیزه‌های برگی ازجمله محتوای کلروفیل، نسبت کلروفیل a به کلروفیل b، فلاونوئید، آنتوسیانین، کاروتن و گزانتوفیل تحت شرایط خشکی مورد آزمایش قرار گرفت. همچنین اثرهای دهیدراتاسیون روی ترکیبهای فنلی نیز بررسی شد و توجه ویژه‌ای به نقش آسکوربات خارجی در محافظت آنتی‌اکسیدانی تحت شرایط کم آبی شد.

مواد و روشها

مرحله کاشت گلدانی و اعمال تیمارها

روش کاشت به صورت گلدانی و با خاک کاملاً زهکشی شده و نرم (چون دانه‌های ۱/۵ تا ۲ میلی‌متری انیسون با ذرات خاک ارتباط قوی داشته باشند تا درصد جوانه‌زنی آنها کاهش نیابد) در اوایل آبان‌ماه در دمای ۲۳-۲۱ درجه سانتی‌گراد، در شهرستان گرگان انجام شد. سنجشها کاملاً به صورت تصادفی با سه تکرار در شاهد و تیمارها (با دو عامل خشکی و آسکوربات و تعامل آنها) دنبال شد، به‌طوری که با شروع هفته ششم، به مدت ۱۸ روز عامل خشکی در دو سطح ۶۰ درصد و ۲۵ درصد ظرفیت زراعی و عامل آسکوربات در یک سطح مؤثر (بعد از پیش آزمایشهای متوالی) با غلظت ۱/۴ میلی مولار به صورت مه‌پاشی اعمال شد. پس از طی این مدت، اثر تنش خشکی متوسط و شدید بر میزان رنگیزه‌های برگ ازجمله کلروفیلها، کاروتن، گزانتوفیل، فلاونوئیدها و آنتوسیانین‌ها و همچنین بر محتوای ترکیبهای فنلی کل اندام هوایی و ریشه گیاه انیسون بررسی شد، همچنین تغییرات میزان مالون دی‌آلدئید جهت سنجش پراکسیداسیون لیپیدی در این گیاه مورد آزمایش قرار گرفت.

اندازه‌گیری رنگیزه‌های گیاهی

الف- سنجش کلروفیل a، b و محتوای کلروفیل کل

مقدار یک گرم از برگهای انیسون از هر تیمار با سه تکرار توزین شد و با ۱۰ میلی‌لیتر استون ۸۰٪ به خوبی ساییده و با کاغذ صافی و قیف صاف شد. بعد حجم نهایی عصاره را به ۲۰ میلی‌لیتر رسانده و در طول موجهای ۶۴۵، ۶۵۲ و ۶۶۳ نانومتر با استفاده از شاهد (استون ۸۰٪)، جذب (OD) محلول (V) توسط دستگاه اسپکتروفتومتر خوانده شد. میزان کلروفیل بر حسب میلی‌گرم (W) بافت تر از طریق زیر محاسبه شد (Jensen, 1978).

$$\text{کلروفیل a} = \left(12.7OD_{663} - 2.69OD_{645}\right)\frac{V}{1000W}$$

$$\text{کلروفیل b} = \left(22.9OD_{645} - 4.68OD_{652}\right)\frac{V}{1000W}$$

$$\text{کلروفیل کل} = \left(20.2OD_{645} + 8.02OD_{663}\right)\frac{V}{1000W}$$

ب- سنجش کاروتنوئیدها

۲۰ میلی‌لیتر عصاره استونی از مرحله قبل درون دکانتور ریخته و هم حجم آن پترولیوم اتر اضافه شد. پس از جدا شدن لایه‌ها، فاز استونی که در پایین قرار داشت دور ریخته شد. حجم فاز بالایی را که پترولیوم اتری بود، یادداشت نموده و دوباره درون دکانتور ریخته، بعد هم حجم آن متانول اضافه شد. پس از اضافه کردن محلول Nacl ۳٪ (۱۰ میلی‌لیتر)، فاز

پترولیوم اتر (در بالا) از فاز متانولی (در پایین) جدا شد. در دو استوانه مدرج دو فاز بالا و پایین توسط دکانتور از هم جدا شده و حجمشان یادداشت شد (Jensen, 1978).

فاز پترولیوم اتر- هم حجم پترولیوم اتر، پتاس متانولی اضافه کرده، با کمی دوران دو فاز از هم جدا شدند. فاز بالایی در اینجا (الف) و فاز پایین (ب) می‌باشد. به عبارتی: الف، پترولیوم اتری که حاوی کاروتن است و ب، پتاس متانولی که کلروفیل a را دربر دارد، می‌باشد.

فاز متانولی- هم حجم متانول درون دکانتور دی اتیل اتر اضافه کرده، بعد ۱۰ میلی‌لیتر محلول Nacl ۳٪ اضافه شد که موجب تشکیل دو فاز شد، فاز رویی تنها شامل دی اتیل اتر بود که حجمش را یادداشت نموده و هم حجم آن پتاس متانولی (برای حل کردن رنگیزه کلروفیل) اضافه شد، مجدداً دو فاز تشکیل گردید. فاز بالایی"ج" (دی اتیل اتر حاوی گزانتوفیل) و فاز پایینی "د" (پتاس متانولی که کلروفیل b را در بر دارد) می‌باشد، که حجم ج مورد نظر بود. جذب نوری فازهای الف و ج را با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر با طول موج ٤٤٥ خوانده، میزان کاروتن و گزانتوفیل با توجه به فرمول زیر محاسبه شد.

$$C = \frac{V \times A \times F \times 10}{2500}$$

V: حجم عصاره

A: میزان جذب

F: یک در نظر گرفته شد

C: میزان رنگیزه بر حسب میلی‌گرم بر گرم بافت تر بدست می‌آید.

ج- سنجش میزان فلاوونوئیدها و آنتوسیانین‌ها

یک گرم بافت تر برگ در ۱۰ میلی‌لیتر متانول اسیدی (شامل الکل متیلیک ۹۹/۵ درصد و هیدروکلریک اسید خالص به نسبت ۹۹ به ۱) همگن و سانتریفوژ شد. جذب عصاره رویی در ۳۰۰ و ۵۳۰ نانومتر به‌ترتیب برای فلاوونوئیدها و آنتوسیانین‌ها با دستگاه اسپکتروفتومتر تعیین شد و نتایج به صورت جذب در گرم وزن تر مورد مقایسه قرار گرفت (Nogues & Baker, 2000).

سنجش ترکیبهای فنلی

۰/۲ گرم از برگها و ریشه‌های تر توزین و به‌طور جداگانه جهت سنجش ترکیبهای فنلی مورد ارزیابی قرار گرفتند. نمونه‌ها در ۱۰ میلی‌لیتر اتانول ۸۰ درصد قرار داده شدند و به مدت ۱۵ دقیقه در بن ماری جوشانده شد. پس از سانتریفوژ کردن نمونه‌ها در دور ۳۰۰g به مدت ۱۵ دقیقه، محلول فوقانی را جدا نموده و با الکل ۸۰ درصد به حجم ۱۰ میلی‌لیتر رسانده شد. سپس ۵ میلی‌لیتر از این محلول را برداشته و ۵ میلی‌لیتر فولن رقیق شده (۱:۳) و ۱۰ میلی‌لیتر کربنات سدیم اشباع به آن اضافه شد (با افزودن کربنات سدیم، محلول آبی رنگ شد). نمونه‌ها به مدت ۱۵ دقیقه در سانتریفوژ با دور ٤۰۰g قرار داده شد. محلول رویی از نمونه‌های سانتریفوژ شده جدا و جذب در طول موج ٦٤۰ نانومتر در مقابل شاهد دستگاه خوانده شد. برای یافتن غلظت ترکیبهای فنلی از منحنی استاندارد و با استفاده از کاتکول با غلظتهای مختلف، مقدار این ترکیبها بر حسب میلی‌گرم در گرم وزن تر نمونه محاسبه شد (Matta & Giai, 1969).

سنجش میزان پراکسیداسیون لیپیدها

میزان پراکسیداسیون لیپید در بافتها از طریق تعیین محتوای مالون دی‌آلدئید (MDA) در واکنش با تیوباربیتوریک اسید سنجیده می‌شود. به این منظور ۰/۲ گرم بافت تازه در ۵ میلی‌لیتر تری کلرواستیک اسید (TCA) ۰/۱ درصد ساییده شد. عصاره حاصل به مدت ۲۰ دقیقه در ٤۰۰g سانتریفیوژ شد. به یک میلی‌لیتر از محلول رویی حاصل از سانتریفیوژ، ٤ میلی‌لیتر محلول TCA ۲۰ درصد که حاوی ۰/۵ درصد تیوباربیتوریک اسید (TBA) بود، اضافه شد. مخلوط حاصل به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد حمام آب گرم حرارت داده شد. سپس بلافاصله در یخ سرد شد و دوباره به مدت ۳۰ دقیقه با دور ٤۰۰g سانتریفوژ شد. شدت جذب این محلول با استفاده از اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۳۲ نانومتر خوانده شد. ماده مورد نظر برای جذب در این طول موج کمپلکس قرمز (MDA-TBA) است، جذب بقیه رنگیزه‌های غیر اختصاصی در ٦۰۰ نانومتر تعیین و از این مقدار کسر شد. برای محاسبه غلظت (MDA) از ضریب خاموشی معادل ۱۵۵ mM-1cm-1 استفاده شد که بر حسب n mol g-1FW بدست آمد (Heath & Packer, 1968).

بررسیهای آماری

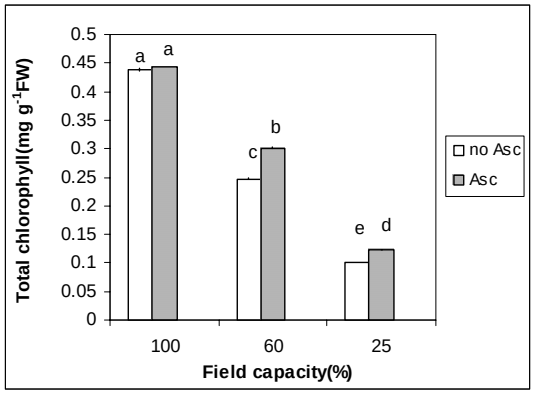
در این پژوهش، آزمایشها براساس طرح فاکتوریل در قالب بلوکهای کاملاً تصادفی و سنجشها در سه تکرار انجام شد. داده‌های حاصل از اندازه‌گیریها به وسیله نرم‌افزار آماری SPSS 15.0 مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت و مقایسه میانگین داده‌ها در سطح خطای ۵ درصد (P<۰/۰۵) با آزمون چندگانه‌ای Tukey و رسم نمودارها در نرم‌افزار Excel صورت گرفت.

نتایج

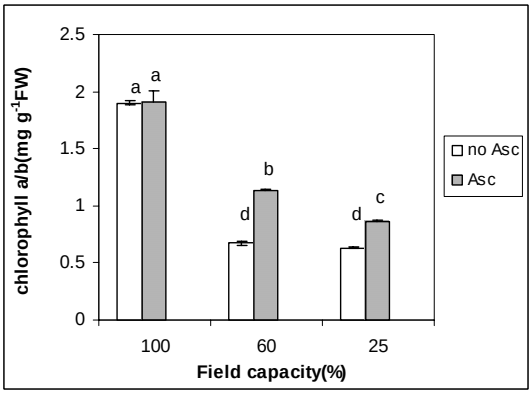
آنالیز واریانس نتایج نشان داد که اختلاف معنی‌داری بین تیمارها وجود داشت، مطابق با شکلهای (۱۰-۱) و مقایسه میانگین داده‌ها در نبود آسکوربات، سپس مقایسه میانگینها در حضور و عدم حضور آسکوربات بین سطوح مختلف تنش شامل شاهد، خشکی متوسط و شدید انجام شد و در هر یک از سطوح مشابه در سطح احتمال (P<0.05) بررسی شد.

محتوای رنگیزه‌ای برگها

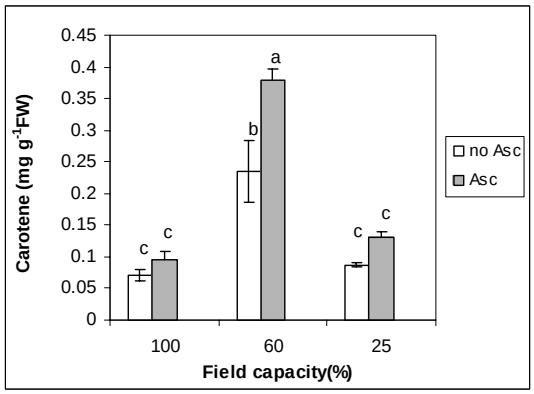
با توجه به شکلهای ۱ و ۲، مقایسه میانگینها در سطوح مختلف تنش با پیشرفت تنش خشکی، محتوای کلروفیلی برگ، یک روند کاهشی معنی‌دار داشت که با مه‌پاشی آسکوربات، در تنش متوسط و شدید افزایش معنی‌داری یافت. نسبت کلروفیل a به کلروفیل b نیز در هر دو تنش خشکی نسبت به گروه شاهد به گونه‌ای معنی‌دار کم شد و تیمار با آسکوربات در هر سه گروه به این نسبت افزود که در دو شرایط متوسط و شدید تنش، این تفاوت معنی‌دار بود.



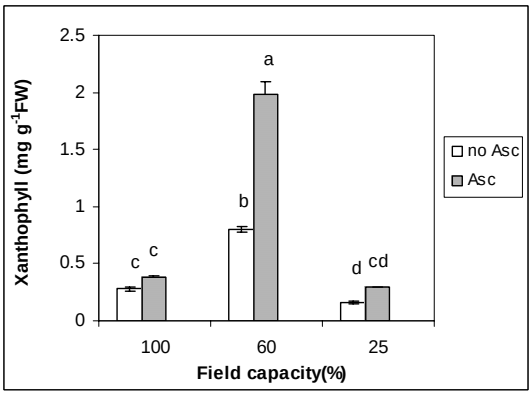
شکل ۱- تأثیر سطوح مختلف تنش خشکی در حضور آسکوربات (ASc) و عدم حضور آن (no ASc) بر محتوای کلروفیلی برگ گیاه انیسون



شکل ۲- تأثیر سطوح مختلف تنش خشکی در حضور آسکوربات (ASc) و عدم حضور آن (no ASc) بر نسبت کلروفیل a به کلروفیل b در برگ گیاه انیسون



شکل ۳- تأثیر سطوح مختلف تنش خشکی در حضور آسکوربات (ASc) و عدم حضور آن (no ASc) بر محتوای رنگیزه کاروتن در برگ گیاه انیسون



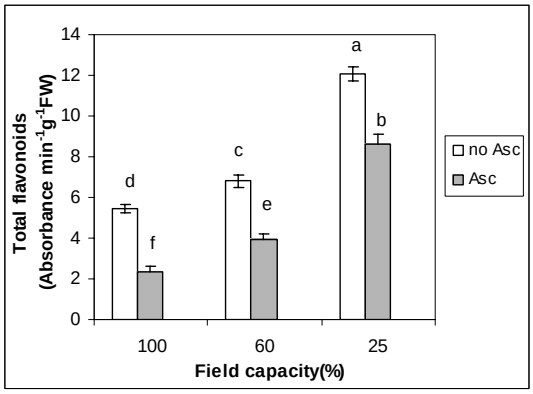
شکل ٤- تأثیر سطوح مختلف تنش خشکی در حضور آسکوربات (ASc) و عدم حضور آن (no ASc) بر محتوای رنگیزه گزانتوفیل در برگ گیاه انیسون

در سنجش جداگانه محتوای رنگیزه‌ای کاروتن و گزانتوفیل، بیشترین میزان در خشکی متوسط مشاهده شد. میزان این دو رنگیزه با وجود آسکوربات روند افزایشی داشت که تنها در خشکی متوسط معنی‌دار بود (شکلهای ۳ و ٤).

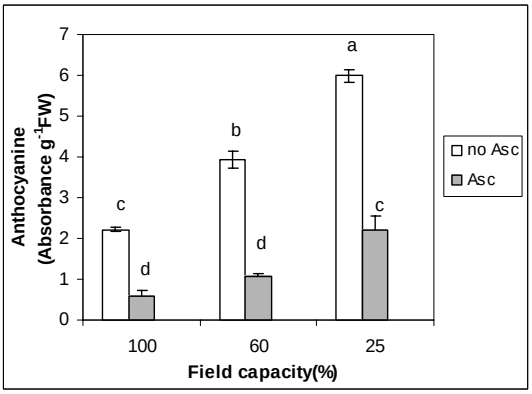
در مورد فلاونوئید کل و آنتوسیانین‌های برگ نیز همانند رنگیزه‌های فوق تحت شرایط تنش تغییراتی بوجود آمد. به صورتی که با کاهش پتانسیل آبی، افزایش معنی‌دار یافته و بیشترین میزان آنها بین سطوح مختلف، در خشکی شدید بدست آمد و با وجود آسکوربات از محتوای این رنگیزه‌ها، در هر سه گروه کاسته شد (شکلهای ۵ و ٦).

ترکیبهای فنلی کل

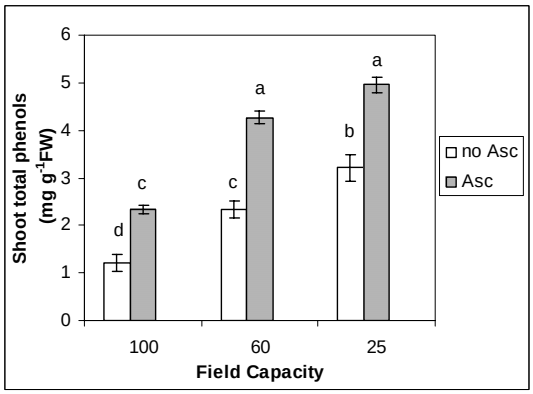
براساس سنجشهایی که در اندام هوایی صورت گرفت، همگام با افزایش تنش، میزان ترکیبهای فنلی کل افزایش معنی‌داری پیدا کرد که حضور آسکوربات به این روند افزایشی افزود (شکل ۷).



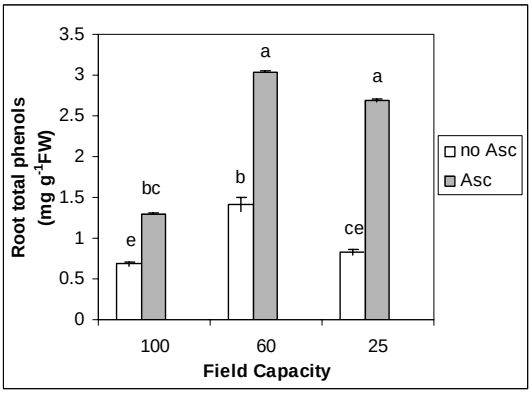
شکل ٥- تأثیر سطوح مختلف تنش خشکی در حضور آسکوربات (ASc) و عدم حضور آن (no ASc) بر میزان فلاوونویید کل در برگ گیاه انیسون



شکل ٦- تأثیر سطوح مختلف تنش خشکی در حضور آسکوربات (ASc) و عدم حضور آن (no ASc) بر میزان آنتوسیانین‌ها در برگ گیاه انیسون



شکل ٧- تأثیر سطوح مختلف تنش خشکی در حضور آسکوربات (ASc) و عدم حضور آن (no ASc) بر ترکیبهای فنلی اندام هوایی گیاه انیسون



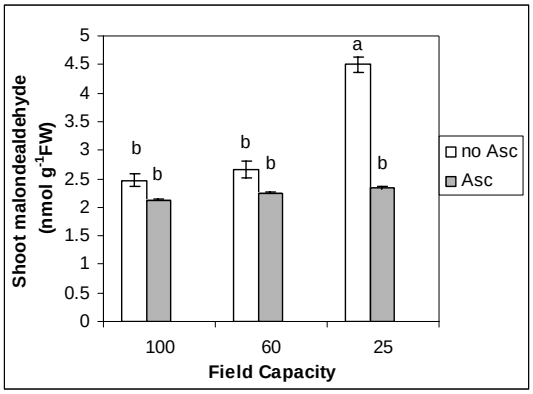
شکل ٨- تأثیر سطوح مختلف تنش خشکی در حضور آسکوربات (ASc) و عدم حضور آن (no ASc) بر ترکیبهای فنلی ریشه گیاه انیسون

محتوای ترکیبهای فنلی کل ریشه در شرایط متوسط تنش، ابتدا افزایش و بعد تحت شرایط شدید کاهش آشکاری در آن مشاهده شد که آسکوربات در هر سه گروه به‌خصوص در خشکی شدید، به‌طور قابل توجهی افزایش نشان داد (شکل ٨).

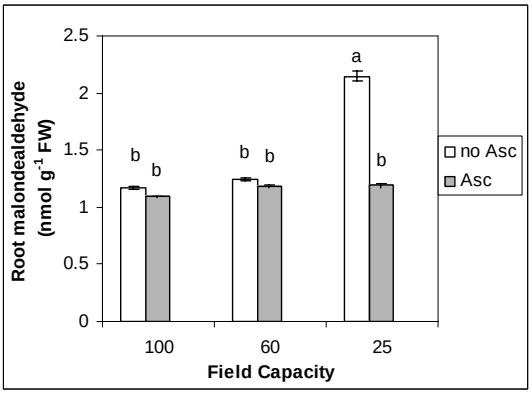
بنابراین بیشترین میزان این ترکیبها در اندام هوایی به خشکی شدید و در ریشه‌ها به خشکی متوسط اختصاص یافت که آسکوربات به این میزان افزود.

محتوای مالون دی‌آلدئید

در اندام هوایی و ریشه‌ها، بالاترین میزان ترکیبهای مالون دی‌آلدئیدی مربوط به گروه تحت شرایط شدید بود و در خشکی متوسط از لحاظ آماری فرقی با گروه کنترل نداشت و به‌طور جزئی افزایش یافته بود. از طرفی با حضور آسکوربات محتوای مالون دی‌آلدئید کاهش یافت که در شرایط شدید این تفاوت، معنی‌دار گزارش شد (شکلهای ٩ و ١٠).



شکل ۹- تأثیر سطوح مختلف تنش خشکی در حضور آسکوربات (ASc) و عدم حضور آن (no ASc) بر میزان مالون دی‌آلدئید اندام هوایی گیاه انیسون



شکل ۱۰- تأثیر سطوح مختلف تنش خشکی در حضور آسکوربات (ASc) و عدم حضور آن (no ASc) بر میزان مالون دی‌آلدئید ریشه گیاه انیسون

بحث

نتایج پژوهش حاضر نشان داد که رنگیزه‌های گیاهی تحت تأثیر خشکی قرار گرفتند. میزان کلروفیل کل و نسبت کلروفیل a به کلروفیل b به موازات کاهش پتانسیل آبی کاهش یافت (شکلهای ۲-۱) که قبلاً در گونه‌های متعددی مثل نخود، خرزهره (*Nerium aleander*) و *Triticum durum* گزارش شده بود (Loggini *et al.*, 1999). این مسئله ممکن است به دلیل افزایش فعالیت کلروفیلاز به هنگام تنش خشکی باشد و کلروفیل a حساستر از b است و بیشتر تخریب می‌شود (Boyer *et al.*, 1987). از طرفی، انواع اکسیژنهای مختلف که طی تنش خشکی تولید می‌شود، باعث کاهش رنگیزه‌های فتوسنتزی می‌گردد (Sairam *et al.*, 1998). چنانچه در مطالعه حاضر تیمار با آسکوربات تحت تنش در افزایش محتوای کلروفیل مؤثر بوده است (شکلهای ۲-۱). بنابراین کاهش محتوای کلروفیل در شرایط خشکی به علت افزایش تولید رادیکالهای اکسیژن است که باعث پراکسیداسیون این رنگیزه‌ها و سرانجام تجزیه شیمیایی ژنها می‌شود (Wise & Nuyler, 1987). در این رابطه یافته‌های Loggini و همکاران (۱۹۹۹) بر این اساس است که پیامد محدودیت فتوسنتزی ناشی از خشکی، قرارگیری گیاهان در معرض انرژی اضافی است، چون مراکز بیش از حد احیاء می‌شوند و تولید ROS در کلروپلاستها افزایش می‌یابد. بنابراین به بیان Damatta و Cochicho Ramalho (۲۰۰٦) با کاهش در میزان کلروفیل می‌توان به کاهش جذب انرژی در برگ دست یافت. با توجه به این مطالب، افزایش محتوای کلروفیل انیسون قرار گرفته در معرض خشکی در پاسخ به آسکوربات خارجی را می‌توان به القاء پاسخهای آنتی‌اکسیدانی مرتبط دانست که گیاه را در برابر آسیب حفظ می‌کند.

براساس آزمایش، با کاهش کلروفیلها، کاروتنوئیدها افزایش یافته بود (شکلهای ٤-۳). این مطلب در توافق با نتایج Lawlor و Cornic (۲۰۰۲) است که بیان می‌دارند که کاروتنوئیدها به‌عنوان رنگیزه کمکی مؤثرند و نقشهای مهم دیگری چون محافظت از غشاهای تیلاکوئیدی و جلوگیری از فتواکسیداسیون کلروفیلها را نیز بر عهده دارند. Jeyaramraja و همکاران (۲۰۰۵) مشاهده کردند

که کمبود ملایم آب باعث افزایش کاروتنوئیدها می‌شود، در حالی که کمبود شدید آب موجب کم شدن کاروتنوئیدها علاوه بر کاهش کلروفیل شد که این تجربه در مورد انیسون نیز گزارش شد (شکلهای ۱، ۳ و ٤). در گیاه *Arbutus* (Munne-Bosch & Penuelas, 2004) نیز تحت تنش شدید، کلروفیل ٦٣٪ و کاروتن ٧٥٪ کاهش یافته بود که به عقیده آنها تخریب کاروتن در خشکی شدید را می‌توان به اکسیژن یکتایی تولید شده در تیلاکوئید ربط داد. علاوه بر آن، به گزارش Sairam و همکاران (١٩٩٨)، کاروتنوئیدها با استفاده از چرخه گزانتوفیل و با واکنشهای اپوکسیداسیون و دپوکسیداسیون، مصرف اکسیژن را کاهش داده و از کلروفیل در مقابل فتواکسیداسیون محافظت می‌کنند. مه‌پاشی آسکوربات، کاروتنوئیدها را نیز افزایش داد (شکلهای ٤-٣). در این رابطه آنزیم VDE (ویولا گزانتین دپوکسیداز) کاتالیز کننده ویولا گزانتین به زاگزانتین (در چرخه گزانتوفیل) برای فعالیت خود نیاز به آسکوربات دارد (Muller-moule *et al.*, 2002). ارتباط بین چرخه گزانتوفیل، آسکوربات و وضعیت ردوکس به خوبی شناخته شده است (Loggini *et al.*, 1999) و مصرف الکترونهای اضافی به وسیله چرخه گزانتوفیل از غشای تیلاکوئیدی در برابر خطر تخریب به وسیله انواع اکسیژن فعال محافظت می‌نماید و به هنگام تنش کمبود آب به بقاء سیستم فتوسنتزی کمک می‌کند (Jagtap & Bhargava, 1995).

در سیب‌زمینی (Watkinson *et al.*, 2006) و *Cistus clusii* (Hernandez *et al.*, 2004) همانند گیاه انیسون با افزایش تنش خشکی، میزان تولید فلاونوئیدها افزایش یافت (شکل ٥). انباشتگی آنتوسیانین طی دهیدراتاسیون در برگ گیاه *Craterostigma* توسط Hoekstra و همکاران (٢٠٠١)، در گیاه *Myrothamnus flabella folius* توسط Mundree و همکاران (٢٠٠٣) و مشابه نتایجی که ما در برگ انیسون گرفتیم، گزارش شده است (شکل ٦). نتایج نشان‌دهنده افزایش مسیر اصلی تولید فلاونوئید است که منجر به تولید آنتوسیانین می‌شود (Watkinson *et al.*, 2006). آنتوسیانین‌ها دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانی هستند (Hoekstra *et al.*, 2001؛ Watkinson *et al.*, 2006) و آنتی‌اکسیدانهای فلاونوئیدی اثر محافظتی طی استرس خشکی دارند. بسیاری از فلاونوئیدها جزء فعالی از گیاهان دارویی بوده و خواص دارویی دارند. آنها به‌عنوان ترکیبهای فعال فیزیولوژیکی، عوامل محافظت کننده در مقابل استرس و به‌عنوان جذب کننده‌ها نقش مهمی در مقاومت گیاهان دارند (Tattini *et al.*, 2004). طبق نتایج بدست آمده، وجود آسکوربات ترکیبهای فلاونوئید و آنتوسیانین را کاهش داد (شکلهای ٦-٥). ممکن است تصور شود که احتمالاً آسکوربات سنتز mRNA ویژه‌ای را در مسیر افزایش کارایی فتوسنتز و افزایش کلروفیلها القاء می‌کند یا پیش‌سازهای آنزیمی را در جهت بهبود سیستم آنتی‌اکسیدانی کلروپلاستها در برگها فعال می‌کند که تا آن موقع غیر فعال بودند. در واقع به بیان Horemans و همکاران (٢٠٠٠) آسکوربات نقش مهمی در محافظت کلروپلاست سلولهای گیاهی در برابر آسیب اکسیداتیو دارد. گزارش شده است که در گندم، آسکوربات باعث کاهش اثرهای استرس خشکی روی رنگیزه‌های فتوسنتزی شده است (Hamad & Hamada, 2001).

بنابراین با پیشرفت تنش، ترکیبهای فنلی کل در اندام هوایی و ریشه افزایش یافت (شکلهای ٨-٧). قبلاً نیز طبق آزمایشهای Morello و همکاران (٢٠٠٥) با افزایش آبیاری

درخت زیتون، فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیالیاز (PAL) و میزان فنل کل میوه زیتون کاهش یافته بود که همین محققان فعالیت PAL را شدیداً تحت تأثیر شرایط محیطی می‌دانند که نقش مهمی در کنترل فنولیک‌های کل دارد. یکی از عملکردهای مهم و به خوبی شناخته شده فنلها، شرکت آنها در مکانیسمهای دفاعی است (Solar *et al.*, 2006). با توجه به شکلهای ۷ و ۸، آسکوربات ترکیبهای فنل کل در ریشه‌ها و اندام هوایی را افزایش داد. در رابطه با این مشاهده Hernandez و همکاران (۲۰۰٤) اعتقاد دارند که این مسئله ممکن است مربوط به تداخل فرضی بین هر دو گروه (آسکوربات و ترکیبهای فنلی کل) باشد، چون رادیکالهای فنوکسیل، مثل محصولات اکسیداسیون فنولیک‌ها، می‌توانند بواسطه آسکوربات به فرم احیاء شده‌شان باز گردند. چنانچه در *Cistus clusii* (Hernandez *et al.*, 2004) نیز بر اثر خشکی با افزایش سطح آسکوربات، ترکیبهای فنل کل افزایش یافته بود که براساس آن پیشنهاد کردند که ارتباط فیزیکی بین هر دو آنتی‌اکسیدان در سطح غشاء امکان‌پذیر است.

همان طور که قبلاً اشاره شد آسکوربات فلاونوئیدها را کاهش داده بود، در حالی که ترکیبهای فنلی کل متأثر از آسکوربات افزایش یافتند که به نظر Hernandez و همکاران (۲۰۰٤) و Coly و همکاران (۱۹۸۵)، مسیر فنیل پروپانوئید مسئول سنتز طیف متفاوتی از متابولیتهای فنولیک می‌باشد که اغلب آنها در اثر استرس تولید می‌شوند و دارای پیش‌سازها و مواد حد واسط مشترکی می‌باشند. در گونه *Crataegus laevigata* غلظت تعدادی از فنولیک‌ها در پاسخ به تنش خشکی افزایش و تعدادی دیگر کاهش یافت (Kirakosyan *et al.*, 2004). فعالیت آنزیم PAL در مراحل نمو گیاه، تمایز سلولی و بافتی و شرایط استرس متفاوت است (Morello *et al.*, 2005). از سوی دیگر، با اعمال آسکوربات ظرفیت آنتی‌اکسیدانی افزایش یافت. d' Arcy-Lameta و همکاران (۲۰۰٦) عقیده دارند که استراتژی اصلی افزایش کارایی سیستم آنتی‌اکسیدانی می‌تواند تنظیم تمایل آنزیمها به سوبستراها باشد. همچنین زمانی که انتقال الکترون فتوسنتزی محدود می‌شود، تغییرات متابولیکی ممکن است منجر به افزایش فلاوانول‌ها در اثر خشکی شود که به علت فعال شدن راههای متابولیکی با واسطه PAL یا آنزیمهای دیگر است. این مسئله ممکن است منجر به تجمع فلاوانول‌ها و مشتقات آنها شود (Hernandez *et al.*, 2004).

گفته شد که در شرایط خشکی، رادیکالهای سوپراکسید باعث پراکسیداسیون لیپیدی می‌شود (Sairam *et al.*, 1998). ROS ها می‌توانند باعث پراکسیداسیون و داستریفیکاسیون لیپیدهای غشاء شده که طی آن ارگانیسمها می‌توانند درجات متوسطی از خشکی را تحمل کنند (Hoekstra *et al.*, 2001). بر پایه داده‌های بدست آمده افزایش ناچیز MDA در خشکی متوسط (شکلهای ۱۰-۹)، نشان‌دهنده یک حفاظت بهتر از غشاهای سلولی در مقابل آسیب اکسیداتیو می‌باشد. در لوبیای *Phaseolus acutifolius* تحت شرایط خشکی نیز MDA افزایش نسبتاً کمی داشت (Turkan *et al.*, 2005). افزایش متوسط MDA و LOOH نشان‌دهنده وقوع استرس اکسیداتیو متوسط است (Bogeat-Triboulot *et al.*, 2007).

در مقابل تحت شرایط تنش شدید، میزان MDA افزایش معنی‌داری را نشان داد (شکلهای ۱۰-۹)، مثل لوبیای *Phaseolus vulgaris* قرار گرفته در معرض خشکی، که نشان‌دهنده کاهش فعالیت آنزیمهای آنتی‌اکسیدانی می‌باشد (Turkan *et al.*, 2005). در توافق

با نتایج ما Mundree و همکاران (۲۰۰۳) گزارش کردند که تحت شرایط تنش متوسط، رادیکالها به‌طور مؤثر توسط سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی هضم می‌شوند و در دوره‌هایی از استرس شدیدتر، سیستم هضم کننده با افزایش سرعت تولید رادیکالها اشباع شده و در نتیجه به سلول آسیب می‌رسد. به بیان Turkan و همکاران (۲۰۰۵) افزایش در پراکسیداسیون لیپید، ناشی از کاهش غلظت CO2 است که از بسته شدن روزنه‌ها حاصل می‌شود. عدم موفقیت سیستم دفاعی آنتی‌اکسیدانی ممکن است باعث آسیب اکسایشی به اجزاء سلولی و لیپیدهای غشایی شود (Pinheiro *et al.*, 2004). با مه‌پاشی آسکوربات از میزان MDA در تنش شدیدتر به‌طور قابل توجهی کاسته شد (شکلهای ۱۰-۹) که در راستای پژوهش حاضر، Rosales و همکاران (۲۰۰٦) نیز به این نکته اشاره دارند که آسکوربات می‌تواند از پراکسیداسیون لیپیدی با حذف ROS ها جلوگیری کرده و MDA را کاهش دهد. از سوی دیگر، آسکوربات در احیاء α-توکوفرول نقش دارد (Smirnoff & Wheeler, 2000) که به نظر Reddy و همکارانش (۲۰۰٤)، α-توکوفرول به همراه آسکوربات و کاروتنوئیدها (که آنتی‌اکسیدانهای متصل به غشاء هستند) در جلوگیری از پراکسیداسیون لیپیدی و در پایداری غشاها مؤثر می‌باشند. در توافق با این مطلب و براساس مشاهدات می‌توان کاروتنوییدها را در اندام هوایی و فنل‌ها را در ریشه در کاهش MDA در شرایط متوسط تنش دخیل دانست. در نتیجه، کنترل استرس اکسیداتیو در گیاه انیسون سبب موفقیت در تحمل به خشکی متوسط می‌باشد که با اعمال آسکوربات در این پژوهش توانستیم به نوع استراتژی مقاومت در این بحران کم آبی پی ببریم.

به‌عنوان نتیجه‌گیری نهایی می‌توان گفت:

۱- خشکی باعث ایجاد تنش اکسایشی در گیاه رشد یافته انیسون شد که با مه‌پاشی آسکوربات و از بین رفتن ROS ها، می‌تواند نقش مهمی در مقامت در برابر خشکی بازی کند.

۲- بیشترین میزان افزایش کاروتنوئیدها در خشکی متوسط و فلاونوئیدها در خشکی شدید گزارش شد.

۳- افزایش میزان کاروتنوئیدها در پاسخ به بکارگیری آسکوربات خارجی در گیاهان تحت تنش خشکی یک فرایند حفاظتی در کلروفیلها و غشاهای فسفولیپیدی در برابر تنش اکسایش ناشی از کمبود آب می‌باشد. از این‌رو براساس مشاهدات، کاهش MDA در تنش متوسط به موازات افزایش کاروتنوییدها (اندام هوایی) و افزایش فنل‌ها (ریشه) گزارش شده است.

٤- در غلظتهای بالای ROS (در خشکی شدیدتر)، زمانی که غشاء دچار تخریب می‌شود و میزان MDA افزایش می‌یابد، آسکوربات خارجی با نقش حفاظتی خود می‌تواند باعث کاهش پتانسیل اکسایشی و پایداری بیشتر غشاها گردد.

۵- فلاونوئیدها و ترکیبهای فنلی کل که در پاسخ به خشکی افزایش یافته بودند، با حضور آسکوربات رفتارهای متفاوتی را نسبت به هم نشان دادند. بنابراین میزان بالای این ترکیبها در اثر خشکی ممکن است بیانگر این باشد که انیسون برای مقابله با اثرهای آسیب‌رسان خشکی، وابسته به مقادیر زیادی از فنولیک‌ها است.

٦- به عبارتی، دفاع آنتی‌اکسیدانی کارآمد، گام اساسی در تحمل به خشکی محسوب می‌شود.

منابع مورد استفاده

- Al Mofleh, I., Alhaider, A., Mossa, J.S., Al-Soohaibani, M. and Rafatullah, S., 2007. Aqueous suspension of anise (*Pimpinella anisum*) protects rats against chemically induced gastric ulcers. World Journal of Gastroenterology, 13(7): 1112-1118.
- Arslan, N., Gurbuz, B. and Sarihan, E.O., 2004. Variation in essential oil content and composition in Turkish anise (*Pimpinella anisum* L.). Turkish Journal of Agriculture, 28: 173-177.
- Atesh, D.A. and Erdogrul, O.T., 2003. Antimicrobial activities of various medicinal and commercial plant extracts. Turkish Journal of Biology, 27: 157-162.
- Bogeat-Triboulot, M.B., Brosche, M., Renaut, J., Jouve, L., Le Thiec, D., Fayyaz, P., Vinocur, B., Witters, E., Laukens, K., Teichmann, T., Altman, A., Hausman, J.F., Polle, A., Kangasjarvi, J. and Dreyer, E., 2007. Gradual soil water depletion results in reversible changes of gene expression, protein profiles, ecophysiology, and growth performance in *Populus euphratica*, a poplar growing in arid regions. Plant Physiology, 143: 876-892.
- Bown, D., 1995. The royal horticultural society encyclopedia of herbs and their uses. Dorling Kindersley Ltd. London, 424p.
- Boyer, J.S., Ort, D.R. and Ortiz-lopez, A., 1987. Photophosphorylation at low water protential. Current Topics in Plant Biochemistry and Physiology, 6: 69-73.
- Coley P.D., Bryant J.P. and Chapin F.S., 1985. Resource availability and plant antiherbivore defence. Science, 230: 895-899.
- DaMatta, F.M. and Cochicho Ramalho, J.D., 2006. Impacts of drought and temperature stress on coffee physiology and production: A Review. Brazilian Journal of Plant Physiology, 18(1): 55-81.
- d'Arcy-Lameta, A., Ferrari-Iliou, R., Contour-Ansel, D., Pham-Thi, A.T. and Zuily-Fodil, Y., 2006. Isolation and characterization of four ascorbate peroxidase cDNAs responsive to water deficit in Cowpea leaves. Annals of Botany, 97: 133-140.
- Debolt, S., Melino, V. and Ford, C.M., 2007. Ascorbate as a Biosynthetic Precursor in Plants. Annals of Botany, 99: 3-8.
- Delazar, A., Biglari, F., Esnaashari, S., Nazemiyeh, H., Talebpour, A.H., Nahar, L. and Sarker, S.D., 2006. GC–MS analysis of the essential oils and the isolation of phenylpropanoid derivatives from the aerial parts of *Pimpinella aurea*. Phytochemistry, 67: 2176-2187.
- Hamad, A. and Hamada, A., 2001. Grain soaking presowing in ascorbic acid or thiamin versus the adverse effects of combined salinity and drought on wheat seedlings. Proceedings of the 12th International Congress on Photosynthesis. Brisbane Convention & Exhibition Centre, Queensland, Australia, August 18-23: PS2001.
- Heath, R.L. and Packer, L., 1968. Photoperoxidation inisolated chloroplast. I. kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. Archive of Biochemistry and Biophysics, 125: 189-198.
- Hernandez, I., Alegre, L. and Munne-Bosch, S., 2004. Drought-induced changes in flavonoids and other low molecular weight antioxidants in *Cistus clusii* grown under Mediterranean field conditions. Tree Physiology, 24: 1303-1311.
- Hoekstra, F.A, Golovina, E.A. and Buitink, J., 2001. Mechanisms of plant desiccation tolerance. Trends in Plant Science, 6(9): 431-438.
- Horemans, N., Foyer, C.H., potters, G. and Asard, H., 2000. Ascorbate function and associated transport system in plants. Plant Physiology and Biochemistry, 38: 531-540.
- Jagtap, V. and Bhargava, S., 1995. Variation in the antioxidant metabolism of drought tolerant and drought susceptible varieties of *Sorghum bicolor* L. exposed to high light, low water and high temperature stress. Journal of Plant Physiology, 145: 195-197.
- Jensen, A., 1978. Chlorophylls and carotenoids . In Handbook of Phycological Methods: Physiological and Biochemical Methods (Hellebust, J. A. and Craigie, J. S., editors), Cambridge University Press, Cambridge, pp.59-70.
- Jeyaramraja, P.R., Meenakshi, S.N., Kumar, R.S., Joshi, S.D. and Ramasubramanian, B., 2005. Water deficit induced oxidative damage in tea (*Camelia sinensis*) plants. Journal of Plant Physiology, 162: 413-419.
- Kirakosyan, A., Kaufman, P., Warber, S., Zick, S., Aaronson, K., Bolling, S. and Chang, S.C., 2004. Applied environmental stresses to enhance the levels of polyphenolics in leaves of hawthorn plants. Physiologia Plantarum, 121: 182-186.
- Kosalec, I., Pepeljnjak, S. and Kustrak, D., 2005. Antifungal activity of fluid extract and essential oil from anise fruits (*Pimpinella anisum* L., Apiaceae). Acta Pharmaceutica. 55(4): 377-385.
- Lawlor, D.W. and Cornic, G., 2002. Photosynthetic carbon assimilation and associated metabolism in relation to water deficits in higher plants. Plant, Cell and Environment, 25: 275-294.
- Lee, H.S., 2004. P-anisaldehyde: A caricidal component of *Pimpinella anisum* seed oil against the house dust mites Dermatophagoides farinae and Dermatophagoides pteronyssinus. Planta Medica, 70(3): 279-281.
- Loggini, B., Scartazza, A., Brugnoli, E. and Navari-Izzo, F., 1999. Antioxidative defense system pigment composition and photosynthetic efficiency

radiation. Journal of Science, Food and Agriculture, 86: 1545-1551.
- Sahraei, H., Ghoshooni, H., Salimi, H., Astani, S.H., Shafaghi, A.M., Falahi, B. and Kamalnegad, M., 2002. The effect of fruit essential oil of the *Pimpinella anisum* on acquisition and expression of morphine induced conditioned place preference in mice. Journal of Ethnopharmacology, 80(1): 43-47.
- Sairam, R.K., Deshmukh, P.S. and, Saxena, D.C., 1998. Role of antioxidant systems in wheat. Genotype tolerance to water stress. Biologia Plantarum, 41(3): 387-394.
- Smirnoff, N. and Wheeler, G.L., 2000. Ascorbic acid in plants: biosynthesis and function. Critical Review of Plant Sciences, 19: 267-290.
- Sofo, A., Tuzio, A.C., Dichio, B. and Xiloyannis, C., 2005. Influence of water deficit and rewatering on the components of the ascorbate-glutathione cycle in four interspecific *Prunus* hybrids. Plant Science, 169: 403-412.
- Solar, A., Colaric, M., Usenik, V. and Stampar, F., 2006. Seasonal variations of selected flavonoids, phenolic acids and quinines in annual shoots of common walnut (*Juglans regia* L.). Plant Science, 170: 453-461.
- Tattini M., Galardi C., Pinelli P., Massai R., Remorini D. and Agati, G., 2004. Differential accumulation of flavonoids and hydroxycinnamates in leaves of *Ligustrum vulgare* under excess light and drought stress. New Phytologist, 163: 547-561.
- Tirapelli, C.R., De Andrade, C.R., Cassano, A.O., De Souza, F.A., Ambrosio, S.R., Da Costa, F.B. and De Oliveira, A.M., 2006. Antispasmodic and relaxant effects of the hydroalcoholic extract of *Pimpinella anisum* L. (Apiaceae) on rat anococcygeus smooth muscle. Journal of Ethnopharmacology (JEP), 4378: 1-7
- Turkan, I., Bor, M., Ozdemir, F. and Koca, H., 2005. Differential responses of lipid peroxidation and antioxidants in the leaves of drought tolerant *P. acutifolius* Gray and drought-sensitive *P. vulgaris* L. subjected to polyethylene glycol mediated water stress. Plant Science, 168: 223-231.
- Watkinson, J.I., Hendricks, L., Sioson, A.A., Vasquez-Robinet, C., Verlyn, S., Heath, L.S., Schuler, M., Bohnert, H.J., Bonierbale, M. and Grene, R., 2006. Accessions of *Solanum toberosum* spp. andigena show differences in photosynthetic recovery after drought stress as reflected in gene expression profiles. Plant Science, 1-14.
- Wise, R.R. and Naylor, A.W., 1987. Chilling-enhanced photo-oxidation. The oxidative destruction of lipids during chilling injury to photosynthesis and ultrastructure. Plant Physiology, 83: 278-282.
in two wheat cultivars subjected to drought. Plant Physiology, 119: 1019-1099.
- Mascher, R., Nagy, E., Lippmann, B., Hornlein, S., Fischer, S., Scheiding, W., Neagoe, A. and Bergmann, H., 2005. Improvement of tolerance to paraquat and drought in barley (*Hordeum vulgare* L.) by exogenous 2-aminoethanol: effects on superoxide dismutase activity and chloroplast ultra-structure. Plant Science, 168: 691-698.
- Matta, A.J. and Giai, I., 1969. Accumulation of phenol in tomato plant is affected by different forms of Fusarium oxysporum. Planta Medica, 50: 512-513.
- Morello, J.R., Romero, M.P., Ramo, T. and Motilva, M.J., 2005. Evaluation of L-phenylalanine ammonia-lyase activity and phenolic profile in olive drupe (*Olea europaea* L.) from fruit setting period to harvesting time. Plant Science, 168: 65-72.
- Muller-Moule, P., Conklin, P.L. and Niyogi, K.K., 2002. Ascorbate deficiency can limit Violaxanthin De-Epoxidase activity in vivo. Plant Physiology, 128: 970-977.
- Mundree, S.G., Baker, B., Mowla, S., Peters, S., Marais, S., Vander Willigen, C., Govender, K., Maredza, A., Muyanga, S., Farrant, J.M. and Thomson, J.A., 2003. Physiological and molecular insights into drought tolerance. African Journal of Biotechnology, 1(2): 28-38.
- Munne-Bosch, S. and Penuelas, J., 2004. Drought induced oxidative stress in strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) growing in Mediterranean field conditions. Plant Science, 166: 1105-1110.
- Nogues, S. and Baker, N.R., 2000. Effects of drought on photosynthesis in Mediterranean plants growth under enhanced UV-B radiation. Journal of Experimental Botany, 51: 1309-1317.
- Pinheiro, H.A., Da Matta, F.M., Chaves, A.R.M., Fontes, E.P.B. and Loureiro, M.E., 2004. Drought tolerance in relation to protection against oxidative stress in clones of *Coffea canephora* subjected to long-term drought. Plant Science, 167: 1307-1314.
- Pourgholami, M.H., Majzoob, S., Javadi, M., Kamalinejad, M., Fanaee, G.H.R. and Sayyah, M., 1999. The fruit essential oil of *Pimpinella anisum* exerts anticonvulsant effects in mice. Journal of Ethnopharmacology, 66(2): 211-215.
- Reddy, A.R., Chaitanya, K.V. and Vivekanadan, M., 2004. Drought-induced responses of photosynthesis and antioxidant metabolism in higher plants. Journal of Plant Physiology, 161(11): 1189-1202.
- Rosales, M.A., Ruiz, J.M., Hernandez, J., Soriano, T., Castilla, N. and Romero, L., 2006. Antioxidant content and ascorbate metabolism in cherry tomato exocarp in relation to temperature and solar

The effect of drought stress and exogenous ascorbate on photosynthetic pigments, flavonoids, phenol compounds and lipid peroxidation in *Pimpinella anisum* L.

Zh. Asadi Kavan[1], M. Ghorbanli[2*] and A. Sateei[3]

1- M.Sc. in plant physiology, Member of Young Researchers Club, Islamic Azad University, Gorgan, Iran
2*- Corresponding author, Department of Plant Biology, Islamic Azad University, Gorgan, Iran, E-mail: ghorbanli@yahoo.com
3- Department of Plant Biology, Islamic Azad University, Gorgan, Iran

Received: June 2009 Revised: August 2009 Accepted: September 2009

Abstract

Drought stress provokes ROS production in plant cell chloroplasts and subsequently causes lipid membrane peroxidation and damage. *Pimpinella anisum* L. is one of the aromatic herbal plants which has great export value. The aim of this study was applying exogenous ascorbate in order to control oxidative stress during drought tolerance. Changes of pigment content of leaves, total phenol compounds, malonedialdehyde (MDA) content were measured. In a pot study, drought stress introduced to treatments with 3 replicates based on 3 levels of field capacity (100, 60 and 25%) and ascorbate (1.4 mM) sprayed on them. Chlorophyll content and chlorophyll a/b ratio decreased with increasing in stress levels, while flavonoids and anthocyanins increased. Carotene and xanthophyll increased only in moderate stress level due to drought. Exogenous ascorbate increased chlorophylls and carotenoid content but decreased flavonoid and anthocyanin contents and had great effect on increasing phenol compound in all stress levels. MDA content remained relatively constant, but increased significantly in severe stress levels. Applying exogenous ascorbate led to decreasing metabolite. According to the results exogenous ascorbate could increase the ability of *Pimpinella anisum* in response to drought stress with different mechanisms and had protective effect against lipid peroxidation due to drought stress.

Key words: drought stress, oxidative stress, exogenous ascorbate, flavonoids, lipid peroxidation, *Pimpinella anisum* L.