زیست‌شناسی گیاهی، سال سوم، شماره نهم، پاییز ۱۳۹۰، صفحه ۳۹-۵۲
تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۸۹/۱۰/۰۸
تاریخ بررسی مجدد: ۱۳۹۰/۰۲/۲۴
تاریخ بررسی مجدد: ۱۳۹۰/۰۵/۲۹
تاریخ پذیرش نهایی: ۱۳۹۰/۰۷/۲۷

تأثیر سالیسیلیک اسید بر رنگیزه‌های فتوسنتزی، محتوای قند و آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی در گیاه کلزا تحت تنش سرب

منیره رنجبر [۱*]، حسین لاری یزدی [۲] و شیدا برومند جزی [۳]
[۱] گروه زیست‌شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد فلاورجان، فلاورجان، ایران
[۲] گروه زیست‌شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد بروجرد، بروجرد، ایران
[۳] باشگاه پژوهشگران جوان، دانشگاه آزاد اسلامی واحد فلاورجان، فلاورجان، ایران

چکیده

به منظور بررسی تأثیر غلظت‌های مختلف نیترات سرب (۰/۲۵، ۰/۵، ۰/۷۵، ۱، ۱/۵ و ۲ میلی‌مولار) و سالیسیلیک اسید با غلظت‌های مختلف ۵ و ۱۰ میکرومولار بر میزان رنگیزه‌های کلروفیل a، b و a+b، تغییر قندهای محلول و نامحلول و آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی در ریشه و اندام هوایی بر روی گیاهان ۲۰ روزه کلزا رقم اکاپی (Okapi)، پژوهش حاضر در محیط کشت هیدروپونیک با سه تکرار انجام گرفت. آنالیزهای آماری به وسیله نرم‌افزار SPSS و مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون دانکن انجام شد. نتایج نشان داد که با افزایش غلظت سرب در محیط هوگلند، گیاهان نتوانستند دو غلظت بالای سرب (۱/۵ و ۲ میلی‌مولار) را تحمل کنند و از بین رفتند، به علاوه تنش سرب میزان کلروفیل a، b و a+b، همچنین میزان قندهای محلول و نامحلول را در ریشه و اندام هوایی به طور معنی‌داری کاهش داد، در حالی که فعالیت آنزیم‌های کاتالاز و پراکسیداز را به طور معنی‌داری افزایش داد ($P<0.01$). کاهش در میزان کلروفیل a در همهٔ تیمارها نسبت به کلروفیل b بیشتر بود. به کارگیری سالیسیلیک اسید در محیط حاوی سرب، میزان کلروفیل a را به طور معنی‌داری افزایش داد ($P<0.05$)، ولی تأثیر معنی‌داری بر میزان کلروفیل b و a+b نداشت. در حالی که فعالیت آنزیم‌های کاتالاز و پراکسیداز با استفاده از سالیسیلیک‌اسید در محیط حاوی سرب کاهش یافت، ولی این تأثیر بر میانگین فعالیت آنزیم کاتالاز ریشه معنی‌دار نبود ($P<0.05$). افزایش قندهای محلول و نامحلول و کاهش فعالیت آنزیم‌های اکسیدازی توسط سالیسیلیک‌اسید با وجود سرب در محیط، نشان دهنده نقش این ترکیب در افزایش مقاومت گیاه در برابر تنش سرب است. بنابراین، سالیسیلیک اسید درکاهش آسیب‌های اکسایشی نقش مؤثری نشان داد.

واژه‌های کلیدی: پراکسیداز، سالیسیلیک اسید، سرب، قند محلول، قند نامحلول، کاتالاز، کلروفیل، کلزا

*نویسنده مسؤول: نشانی پست الکترونیک: ranjbar@iaufala.ac.ir، شماره تماس: ۰۳۱۲۳۱۲۰۱۳۵

مقدمه

کلزا با نام علمی *Brassica napus* L.، گیاهی یک‌ساله و علفی از تیره شب‌بو (Brassicaceae) و از جنس کلم (Brassica) است که در زبان انگلیسی به Rape seed و Canola شهرت دارد (قهرمان، ۱۳۷۲). در حال حاضر کلزا به عنوان مهمترین گیاه دانه روغنی و پروتئینی یک‌ساله در مناطق معتدل سرد و سرد مرطوب (شرایطی که گیاهان روغنی دیگر قادر به رشد بهینه نیستند) محسوب می‌شود. همچنین، در مناطق نیمه گرم نیز این گیاه می‌تواند پروتئین و روغن در خور توجهی در واحد سطح تولید نماید (شهیدی و سپهر، ۱۳۸۱).

به علت افزایش فعالیت‌های صنعتی از اواخر قرن ۱۹ و اوایل قرن ۲۰، آلودگی‌های ناشی از فلزات سنگین به طور وسیعی در دنیا افزایش داشته است. در بین فلزات سنگین سرب، کادمیوم و جیوه از مهمترین آلوده‌کننده‌ها هستند که در اثر فعالیت‌های مدرن انسانی تولید می‌شوند (Yang *et al*., 1996). سرب یکی از فلزات سمّی برای انسان و همچنین جزو فلزات غیر ضروری برای گیاهان است که عملکرد بیولوژیک شناخته شده‌ای ندارد؛ ولی به علت انحلال‌پذیری این عنصر در آب، به راحتی توسط سیستم ریشه جذب گیاه می‌گردد (Kim *et al*., 2002) و از این طریق رشد و متابولیسم گیاهان با افزایش این فلزات در محیط تحت تأثیر قرار می‌گیرد (Sharma and Dubey, 2004). یکی از آثار سمّیت سرب به علت تشابه ساختار یونی کلسیم و سرب بوده و به همین علت یون سرب بسیاری از جنبه‌های رفتاری Ca^{+2} را تقلید کرده و از فعالیت بسیاری از آنزیم‌ها جلوگیری می‌کند. در گیاهان آثار سمیّت با سرب معمولاً در غلظت‌های بالاتر از ۳۰ میکروگرم بر گرم در برگ ظاهر شده و به کاهش سنتز کلروفیل و کاهش رشد رویشی منجر می‌شود (Ruley *et al*., 2004). تحقیقات نشان می‌دهد که غلظت برخی از یون‌ها (AS, Cd, Pb) در خاک حتی به ۱۰۰۰ برابر بیشتر از حد طبیعی می‌رسد (Kabata-Pendias, 2001). چنین شرایطی موجب مسمومیّت گیاه، کاهش رشد و میزان محصول، زردی برگ‌های جوان، کاهش جذب برخی عناصر ضروری مانند آهن و کاهش میزان فتوسنتز می‌شود (Pallavi and Rama, 2005). تیمار با سرب سبب تغییر در فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و آسیب به ساختار ترکیبات آلی می‌شود (Hu *et al*., 2007). تحت شرایط تنش، آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی شامل کاتالازها وتعداد زیادی از پراکسیدازها از جمله گایاکول پراکسیداز و آسکوربات پراکسیداز فعال می‌شوند (Prasad, 1997).

سالیسیلیک اسید (SA) متعلق به گروهی از ترکیبات فنلی است که به طور وسیعی در گیاهان وجود دارد و امروزه به عنوان ماده شبه هورمونی محسوب می‌گردد که نقش مهمی در رشد و نمو گیاهان ایفا می‌کند (Popova *et al*., 2003). Zawoznik و همکاران (۲۰۰۷) بیان کردند که کاربرد سالیسیلیک اسید تحت تنش کادمیوم باعث افزایش محتوای کلروفیل و بیوسنتز آن در گیاه *Arabidopsis thaliana* می‌گردد. سالیسیلیک اسید تقریباً بر اکثر واکنش‌های متابولیسمی گیاه تأثیر گذاشته و موجب تغییراتی در آنها می‌شود. این تغییرات اغلب به صورت سازش‌هایی است که

تحمل و سازگاری گیاهان را در مقابل عوامل محیطی افزایش می‌دهد (Metwally *et al*., 2003).

در پژوهش حاضر، اثرات تعدیل کننده سالیسیلیک اسید در شرایط تحمیل تنش سرب در محیط بررسی گردید. بررسی میزان کلروفیل به عنوان رنگیزه مؤثر در سنتز مواد قندی، همچنین تغییر میزان قندهای محلول و نامحلول و آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی موجود در شرایط ذکر شده از اهداف این تحقیق به شمار می‌رود.

مواد و روش‌ها

بذرهای گیاه کلزا رقم اکاپی (Okapi) از مؤسسه جهاد کشاورزی استان لرستان تهیه و کشت داده شدند. ابتدا بذرها با محلول هیپوکلریت سدیم ۲۰ درصد ضدعفونی سطحی شدند و سپس بر روی سبدهایی به ابعاد ۴×۲ میلی‌متر تا رسیدن به مرحله دو برگی رشد کردند. سپس به ظروف تیرهٔ ۶۵۰ میلی‌لیتری حاوی محلول هوگلند (۱/۲) انتقال یافتند و پس از گذشت ۲۴ ساعت تحت تیمار نیترات سرب با غلظت‌های ۰/۲۵، ۰/۵، ۰/۷۵، ۱، ۱/۵ و ۲ میلی‌مولار و سرب با غلظت‌های مشابه به همراه سالیسیلیک اسید ۵ و ۱۰ میکرومولار در سه تکرار درون ژرمیناتور با شرایط نوری ۶۰۰۰ لوکس (۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی) و دمای ۲۰ درجه سانتیگراد قرار گرفتند. پس از گذشت ۲۰ روز، گیاهان برای سنجش تغییرات کلروفیل و همچنین میزان تغییرات قندهای محلول و نامحلول (نشاسته) بررسی شدند. برای سنجش قندها، ابتدا بخش‌های هوایی و زیرزمینی گیاه جدا شده و در آون ۷۰ درجه سانتیگراد به مدت ۴۸ ساعت قرار گرفتند و سپس تغییرات میزان قندهای محلول و نامحلول با استفاده از روش Kochert (۱۹۷۸) انجام گرفت، رنگیزه‌های فتوسنتزی نیز به روش Arnon (۱۹۵۷) بررسی شدند. تغییر آنزیم‌های کاتالاز به روش Chance و Maehly (۱۹۹۵) و پراکسیداز به روش Koroi (۱۹۸۹) بررسی گردید.

سنجش رنگیزه‌های فتوسنتزی

۰/۲ گرم از برگ گیاه در هاون چینی همراه با ۱۰ میلی‌لیتر استون ۸۰٪ ساییده شد و عصاره حاصل با استفاده از دستگاه سانتریفیوژ به مدت ۲۰ دقیقه با دور ۴۸۰۰g سانتریفیوژ گردید و عمل جداسازی انجام گرفت. سپس حجم نهایی عصاره با ۱۰ میلی‌لیتر از استون ۸۰ درصد به ۲۰ میلی‌لیتر رسانده شد. در این مرحله برای محاسبه میزان کلروفیل‌های a و b، جذب محلول در طول موج‌های ۶۴۵ و ۶۳۳ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتری (SPECTRONIC® 20 GENESYS مدل 4001.4) تعیین و با توجه به وزن تر هر نمونه بر حسب میلی‌گرم، میزان کلروفیل ها ارزیابی شد.

سنجش قندهای محلول

برای حل شدن قندهای محلول ماده خشک گیاهی (ریشه و برگ)، ۱۰ میلی‌لیتر از اتانول ۷۰ درصد به ۰/۱ گرم از ماده خشک گیاهی اضافه و به مدت یک هفته در یخچال نگهداری شد. پس از گذشت یک هفته، برای ساقه و برگ ۰/۵ میلی‌لیتر و برای ریشه ۱ میلی‌لیتر از محلول رویی نمونه برداشته و حجم آن با آب مقطر به ۲ میلی‌لیتر رسانده شد. سپس بر روی آن ۱ میلی‌لیتر فنل ۵ درصد اضافه کرده خوب هم زده و پس از آن ۵ میلی‌لیتر سولفوریک اسید غلیظ با فشار اضافه شد.

محلول زرد رنگی به دست آمد که به مرور زمان تغییر رنگ داده و به قهوه‌ای روشن تمایل پیدا کرد. پس از ۳۰ دقیقه در دمای آزمایشگاه، با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۴۸۵ نانومتر، میزان جذب تعیین شده و با استفاده از منحنی استاندارد گلوکز و معادله زیر، میزان تغییرات قندها بر حسب میلی‌گرم بر گرم وزن خشک ارزیابی گردید.

$$C = (OD+3.985)/36.62$$

سنجش قندهای نامحلول

محلول اتانول محتوای نمونه‌های گیاهی را که برای قندهای محلول استفاده شد، صاف نموده و از رسوب باقیمانده برای اندازه‌گیری نشاسته موجود در اندام گیاهی استفاده گردید. ابتدا رسوب را خشک کرده و پس از وزن کردن، بر روی آن ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر اضافه نموده و به مدت ۱۵ دقیقه در بن ماری آب جوش قرار داده شد. حجم محلول صاف شده با آب مقطر به ۲۵ میلی‌لیتر رسانده شد. در نهایت ۲ میلی‌لیتر از این محلول برداشته و قندهای نامحلول به روش فنل- سولفوریک اسید تعیین شد.

سنجش فعالیت آنزیم پراکسیداز

الف) تهیه محلول عصاره‌گیری

۲۶/۸ میلی‌لیتر کلریدریک اسید ۰/۲ نرمال، ۰/۱ گرم سیستئین کلرید، ۱۷/۲ گرم ساکاروز، ۰/۱ گرم آسکوربیک اسید و ۱/۲ گرم تریس (Tris) مخلوط و حجم آن با آب مقطر به ۱۰۰ میلی‌لیتر رسانده شد (اسیدیته= ۷/۵).

ب) استخراج عصاره آنزیمی

ساییدن یک گرم از بافت تر گیاهی (اندام هوایی و ریشه) با ۵ میلی‌لیتر محلول عصاره‌گیری، سانتریفیوژ محلول به مدت ۳۰ دقیقه با ۱۰۰۰۰g ، نگهداری محلول رویی در دمای ۴ درجه سانتیگراد.

پ) سنجش فعالیت آنزیم

مخلوط کردن ۲ میلی‌لیتر تامپون استات ۰/۲ مولار با ۰/۲ میلی‌لیتر آب اکسیژنه ۳ درصد و ۰/۱ میلی‌لیتر بنزیرین ۰/۰۲ مولار محلول در متانول ۵۰ درصد، اضافه کردن ۰/۱ میلی‌لیتر عصاره آنزیمی به مخلوط فوق و خواندن جذب نوری محلول در طول موج ۵۳۰ نانومتر، سپس فعالیت آنزیم بر حسب واحد جذب در دقیقه به ازای هر میلی‌گرم پروتئین در گرم وزن تر محاسبه گردید.

سنجش فعالیت آنزیم کاتالاز

مخلوط کردن ۲/۵ میلی‌لیتر تامپون فسفات با اسیدیته ۷ و ۰/۳ میلی‌لیتر آب اکسیژنه ۳ درصد، سپس اضافه کردن ۰/۲ میلی‌لیتر از محلول عصاره‌گیری به مخلوط فوق و خواندن جذب نوری محلول در طول موج ۵۳۰ نانومتر، سپس فعالیت آنزیم بر حسب واحد جذب در دقیقه به ازای میلی‌گرم در گرم وزن تر محاسبه گردید.

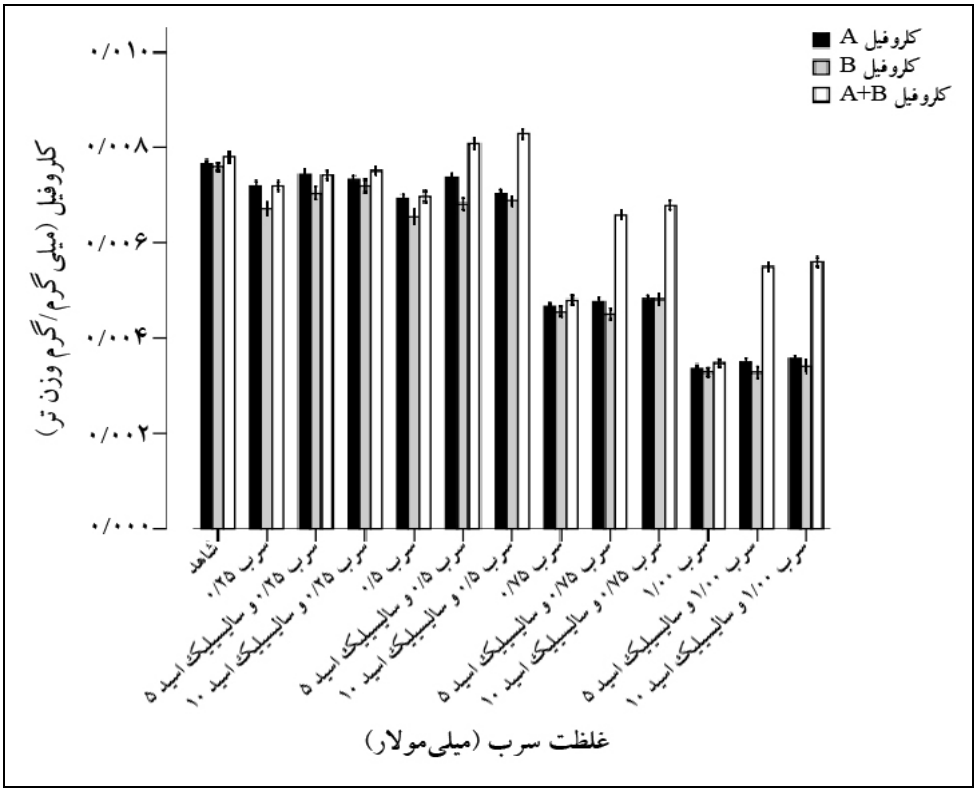
نتایج

تجزیه واریانس داده‌های مربوط به مقدار کلروفیل a رقم اکاپی پس از ۲۰ روز تیمار نشان داد که اثرات سرب، سالیسیلیک اسید و اثرات متقابل آنها از نظر

آماری معنی‌دار است. در این گیاهان هم زمان با افزایش غلظت سرب، میانگین کلروفیل a کاهش یافت. بر اساس آزمون دانکن میزان کلروفیل a در هر یک از تیمارها با میزان کلروفیل a در گیاهان شاهد تفاوت معنی‌داری داشت، به طوری که گیاهان با تیمار ۱ میلی‌مولار سرب دارای ۰/۰۰۳۳ میلی‌گرم در هر گرم بافت تازه گیاه کمترین میزان کلروفیل a را دارا بودند، در حالی که گیاهان شاهد دارای ۰/۰۷۶۶ و گیاهان تحت تیمار ۰/۲۵ میلی‌مولار سرب دارای ۰/۰۷۱۹ میلی‌گرم در هر گرم بافت تازه گیاهی کلروفیل a بودند. با به کارگیری سالیسیلیک اسید با دو غلظت ۵ و ۱۰ میکرومولار، افزایش معنی‌داری ($P<0.05$) در میانگین کلروفیل a نسبت به تیمارهای سرب دیده شد؛ این در حالی است که نتایج نشان دهنده اثرات یکسان دو غلظت سالیسیلیک اسید به کار رفته در محیط‌های کشت است. با استفاده از غلظت‌های سرب بالاتر از ۱ میلی‌مولار در محیط کشت، گیاهان نتوانستند این غلظت‌ها (۱/۵و ۲ میلی‌مولار) را تحمل کنند و از بین رفتند. ولی بررسی میزان کلروفیل a در محیط حاوی ۱ میلی‌مولار و کمتر از آن نشان داد که سالیسیلیک اسید توانسته اثرات تعدیلی در محیط‌های تنش‌زا داشته باشد. میزان کلروفیل a در محیط‌های حاوی ۱ میلی مولار سرب، با به کارگیری ۵ میکرومولار سالیسیلیک اسید از ۰/۰۳۳۶ به ۰/۰۳۴۹ میلی‌گرم در هر گرم بافت تر گیاهی و با به کارگیری ۱۰ میکرومولار سالیسیلیک اسید به ۰/۰۳۵۷ میلی‌گرم در هر گرم بافت تر گیاهی افزایش یافت (شکل ۱).

آنالیز واریانس داده‌ها در همین رقم مشخص کرد که اثرات سرب در غلظت‌های مختلف بر روی میزان کلروفیل b از نظر آماری معنی‌دار بوده ولی به کارگیری سالیسیلیک اسید در هیچ یک از غلظت‌ها تأثیری بر تعدیل آثار تنش نشان نداد. با افزایش غلظت سرب در محیط، میزان کلروفیل b، از ۰/۰۷۶ میلی‌گرم در هر گرم بافت تر گیاهی در گیاهان شاهد به ۰/۰۳۳۵ میلی‌گرم در هر گرم بافت تر گیاهی در محیط حاوی ۱ میلی‌مولار نیترات سرب در محیط کاهش یافت. این روند کاهش به تدریج با افزایش غلظت سرب صورت گرفت (شکل ۱).

غلظت‌های مختلف نیترات سرب در محیط بر میزان کلروفیل a+b اثر معنی‌داری داشته و با افزایش غلظت سرب محیط، میزان کلروفیل a+b در گیاهان مورد آزمایش کاهش یافت، به طوری که میزان آن از ۰/۰۷۸۰ در گیاهان شاهد به ۰/۰۵۵۵ میلی‌گرم در هر گرم بافت تر گیاهی در محیط ۱ میلی‌مولار سرب کاهش یافت. به کارگیری سالیسیلیک اسید در دو غلظت ذکر شده تأثیری بر میزان کلروفیل a+b نداشته است (شکل ۱).



شکل ۱- تأثیر سالیسیلیک اسید بر میانگین کلروفیل‌های a، b و a+b تحت تنش سرب در برگ گیاه کلزا رقم اکاپی. مقادیر میانگین سه تکرار ± SE است.

بررسی تجزیه واریانس داده‌ها در اندام‌های هوایی و زیرزمینی نشان داد که اثرات سرب بر مقدار قندهای محلول معنی‌دار بوده و با افزایش غلظت سرب محیط، به تدریج مقدار قند محلول در هر دو بخش هوایی و زیرزمینی کاهش یافته است. به کارگیری سالیسیلیک اسید همراه با تیمارهای سرب باعث افزایش قندهای محلول نسبت به تیمارهای نیترات سرب شد، ولی دو غلظت ۵ و ۱۰ میکرومولار سالیسیلیک اسید در بخش‌های زیرزمینی تأثیر یکسانی را نشان دادند. در بخشهای هوایی دو غلظت سالیسیلیک اسید اثرات یکسانی بر میانگین قندهای محلول داشته است. کمترین میزان قندهای محلول دربخش‌های هوایی گیاه ۰/۱۰۷۰ میلی‌گرم در هر گرم بافت خشک گیاهی به گیاهانی با ۱ میلی‌مولار تیمار سرب مربوط بود؛ در حالی که گیاهان تیمار شده با ۰/۲۵ میلی‌مولار سرب، دارای ۰/۱۳۷۵ و گیاهان شاهد دارای ۰/۱۴۶۸ میلی‌گرم قند محلول در هر گرم بافت خشک گیاهی بودند. به‌کارگیری سالیسیلیک اسید با غلظت ۵ میکرومولار در محیط حاوی ۰/۲۵ میلی‌مولار سرب باعث افزایش میزان قندهای محلول اندام هوایی بیش از شاهد گردید (شکل ۲).

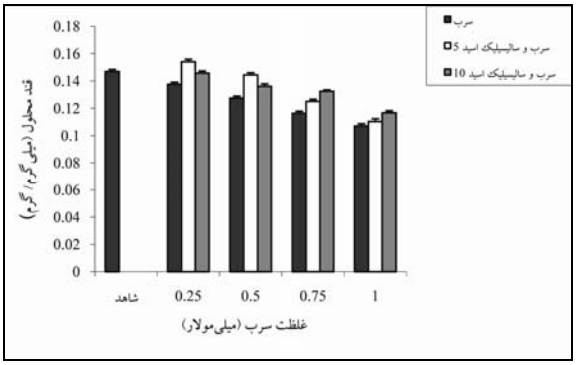
تجزیه واریانس داده‌های مربوط به میزان قندهای نامحلول اندام هوایی تفاوت معنی‌داری بین غلظت‌های مختلف سرب محیط را نشان می‌دهد. تأثیر غلظت‌های

سالیسیلیک اسید بر میزان قندهای نامحلول در سطح ۵٪ معنی‌دار بود. میزان قندهای نامحلول در اندام هوایی گیاهان تیمار شده با ۱ میلی‌مولار سرب، ۰/۱۳۷۰ میلی‌گرم در هر گرم بافت خشک گیاهی بود که با به‌کارگیری ۵ میکرومولار سالیسیلیک اسید به ۰/۱۴۶۳ میلی‌گرم و در محیط حاوی ۱۰ میکرومولار سالیسیلیک اسید به ۰/۱۵۱۸ میلی‌گرم در هر گرم بافت خشک گیاهی افزایش یافت. در غلظت ۰/۲۵ میلی‌مولار سرب و سالیسیلیک اسید ۱۰ میکرومولار حتی میزان قندهای نامحلول از مقدار شاهد نیز بالاتر رفت (شکل ۳).

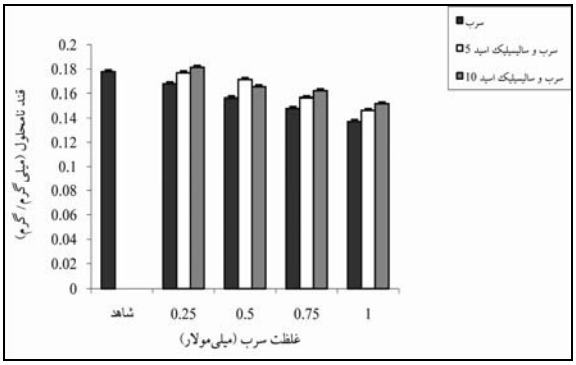
در ریشه‌ها افزایش غلظت سرب باعث کاهش میزان قندهای محلول گردید. میزان قند محلول در ریشه گیاهان شاهد ۰/۱۳۷۷ میلی‌گرم در هر گرم بافت خشک گیاهی بود که این میزان در غلظت ۱ میلی‌مولار سرب در محیط به ۰/۱۰۶۴ میلی‌گرم کاهش یافت. استفاده از سالیسیلیک اسید در محیط با دو غلظت باعث افزایش میزان قند محلول نسبت به تیمارهای سرب گردید، به طوری که در غلظت ۰/۲۵ میلی‌مولار سرب، سالیسیلیک اسید توانست میزان قندهای محلول را نسبت به گیاهان شاهد نیز افزایش دهد.

در غلظت ۱ میلی‌مولار سرب به کارگیری ۵ میکرومولار سالیسیلیک اسید قند محلول ریشه را به ۰/۱۱۴۰ میلی‌گرم و ۱۰ میکرومولار سالیسیلیک اسید به ۰/۱۲۰۳ میلی‌گرم در هر گرم بافت خشک گیاهی افزایش داد که از نظر آماری تفاوت معنی‌داری است (شکل ۴).

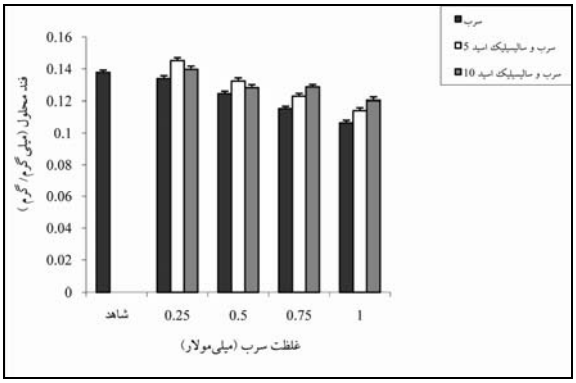
محتوای قندهای نامحلول ریشه نیز با افزایش غلظت سرب در محیط کشت کاهش یافت. مقدار قند نامحلول ریشه در گیاهان شاهد ۰/۱۴۳۳ میلی‌گرم بود که با افزایش غلظت سرب محیط تا ۱ میلی‌مولار، قند نامحلول به ۰/۱۰۳۳ میلی‌گرم در هر گرم وزن خشک گیاهی کاهش یافت. در تیمارهای همزمان سرب و سالیسیلیک اسید، افزایش قند نامحلول نسبت به تیمارهای سرب مشاهده شد به طوری که قند نامحلول گیاهان موجود در محیط ۱ میلی‌مولار سرب با ۵ میکرومولار سالیسیلیک اسید به ۰/۱۱۸۰ و با ۱۰ میکرومولار سالیسیلیک اسید به ۰/۱۱۲۵ میلی‌گرم در هر گرم بافت خشک گیاهی افزایش یافت. در غلظت ۰/۲۵ و ۰/۵ میلی‌مولار سرب محیط، استفاده از سالیسیلیک اسید باعث افزایش قندهای نامحلول تا سطح گیاهان شاهد و در تیمار ۰/۲۵ میلی‌مولار سرب و ۵ میکرومولار سالیسیلیک اسید بیشتر از گیاهان شاهد گردید (شکل ۵).



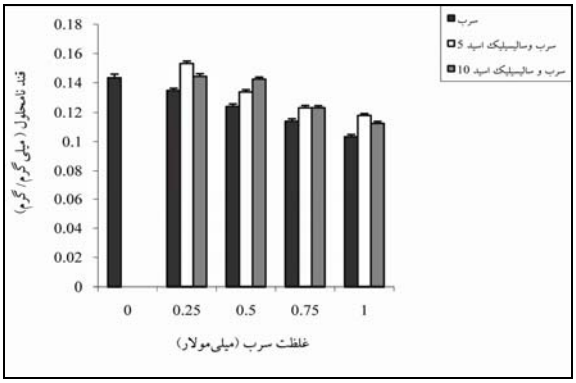
شکل ۲- تأثیر سالیسیلیک اسید بر میانگین قندهای محلول تحت تنش سرب در برگ‌های گیاه کلزا رقم اکاپی. مقادیر میانگین سه تکرار ± SE است.



شکل ۳- تأثیر سالیسیلیک اسید بر میانگین قند نامحلول تحت تنش سرب در برگ‌های گیاه کلزا رقم اکاپی. مقادیر میانگین سه تکرار ± SE است.



شکل ۴- تأثیر سالیسیلیک اسید بر میانگین قندهای محلول تحت تنش سرب در ریشه گیاه کلزا رقم اکاپی. مقادیر میانگین سه تکرار ± SE است.



شکل ۵- تأثیر سالیسیلیک اسید بر میانگین قند نامحلول تحت تنش سرب در ریشه گیاه کلزا رقم اکاپی. مقادیر میانگین سه تکرار ± SE است.

هم زمان با افزایش غلظت نیترات سرب، افزایش معنی‌داری ($P<0.01$) در میزان فعالیت آنزیم کاتالاز ریشه و برگ گیاهان ۲۰ روزهٔ اکاپی مشاهده شد. در ریشه گیاهان ۲۰ روزه تحت تیمار سرب، فعالیت آنزیم کاتالاز در غلظت‌های ۰/۲۵، ۰/۵، ۰/۷۵ و ۱ میلی‌مولار سرب از ۰/۰۱۵۰ $OD.gr^{-1}.F.W.min^{-1}$ در شاهد به ترتیب به ۰/۰۲۶۱، ۰/۰۳۲۲ و ۰/۰۴۹۷ و در نهایت در ۱ میلی‌مولارسرب به مقدار ۰/۰۶۳۳ $OD.gr^{-1}.F.W.min^{-1}$ افزایش یافت. تحت تیمار سرب و سالیسیلیک اسید، میانگین فعالیت آنزیم کاتالاز ریشه گیاهان کاهش یافت، اما تغییرات حاصل از نظر آماری معنی‌دار نبوده است (شکل ۶).

در برگ گیاهان ۲۰ روزه، فعالیت آنزیم کاتالاز تحت تیمارهای ۰/۲۵، ۰/۵، ۰/۷۵ و ۱ میلی‌مولار سرب به ترتیب از شاهد با مقدار ۰/۰۲۴۴ $OD.gr^{-1}.F.W.min^{-1}$ به ۰/۰۳۶۵، ۰/۰۴۵۲، ۰/۰۶۴۱ و در نهایت ۰/۰۷۵۰ $OD.gr^{-1}.F.w.min^{-1}$ در غلظت ۱ میلی‌مولار سرب افزایش یافت. با افزودن سالیسیلیک اسید به محیط حاوی سرب، میانگین فعالیت آنزیم کاتالاز در برگ گیاهان ۲۰ روزهٔ اکاپی به طور

معنی‌داری نسبت به تیمارهای سرب کاهش یافت (P<0.05). در همهٔ غلظت‌ها بین دو غلظت سالیسیلیک اسید مورد استفاده (۵ و ۱۰ میکرومولار) تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد (P<0.05). افزایش فعالیت آنزیم کاتالاز تحت تیمارهای سرب در برگ بیشتر از ریشه بود (شکل ۷).

افزایش غلظت نیترات سرب، سبب افزایش معنی‌دار (P<0.01) آنزیم پراکسیداز در ریشه و برگ گیاهان ۲۰ روزهٔ اکاپی گردید. در گیاهان ۲۰ روزهٔ اکاپی فعالیت آنزیم پراکسیداز ریشه تحت تیمارهای ۰/۲۵، ۰/۵، ۰/۷۵ و ۱ میلی‌مولار سرب به ترتیب از شاهد ۰/۴۸۸ $OD.gr^{-1}.F.W.min^{-1}$ به مقدار ۰/۵۴۱۶، ۰/۵۹۳۳، ۰/۶۴۱۱ و در نهایت به مقدار ۰/۷۰۰۰ $OD.gr^{-1}.F.W.min^{-1}$ در غلظت ۱ میلی‌مولار سرب افزایش یافت و تحت تیمار نیترات سرب به همراه سالیسیلیک اسید، فعالیت آنزیم پراکسیداز ریشه نسبت به تیمارهای سرب کاهش یافت (P<0.01) (شکل ۸).

در برگ این گیاهان میانگین فعالیت آنزیم پراکسیداز تحت تیمارهای ۰/۲۵، ۰/۵، ۰/۷۵ و ۱ میلی‌مولار سرب از ۰/۲۰۸۴ در شاهد به ترتیب به ۰/۲۸۵۰، ۰/۳۵۰۰، ۰/۴۱۸۵ و در نهایت به ۰/۵۱۳۲ $OD.gr^{-1}.F.W.min^{-1}$ در غلظت ۱ میلی‌مولار سرب افزایش یافت. با افزودن دو غلظت ۵ و ۱۰ میکرومولار سالیسیلیک اسید به تیمارهای سرب، میانگین فعالیت آنزیم پراکسیداز برگ به صورت معنی‌داری نسبت به تیمارهای سرب کاهش یافت (P<0.01). افزایش فعالیت آنزیم پراکسیداز تحت تیمارهای مختلف سرب در ریشه بیشتر از برگ این گیاهان بوده است (شکل ۹).

بحث

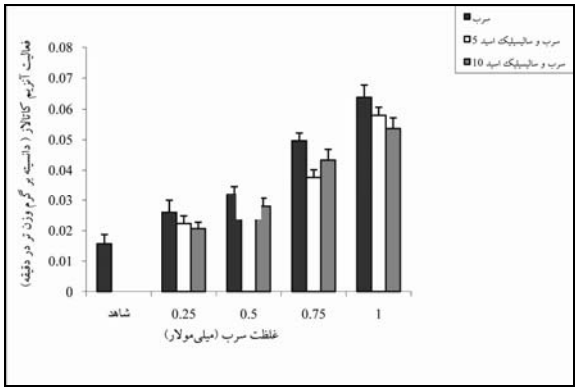
تغییرات کلروفیل

نتایج آنالیز واریانس داده‌ها نشان داد که با افزایش غلظت سرب در محیط، میانگین کلروفیل a، b و a+b به طور معنی‌داری کاهش می‌یابد (P<0.01).

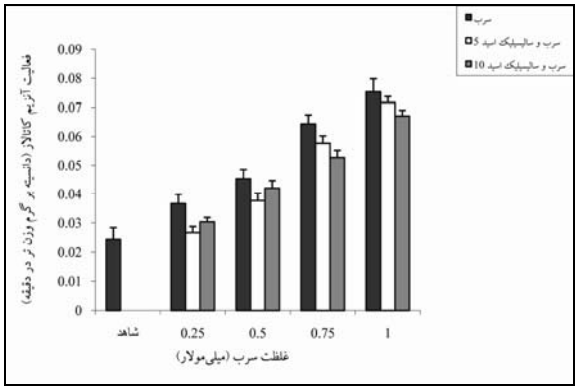
Azmat و همکاران (۲۰۰۶) بیان کردند که در گیاهان عالی، سرب به علت جلوگیری از عمل فتوسیستم II و یا با جلوگیری بیشتر در سطح فعالیت پلاستوکوئینون سبب کاهش فتوسنتز و رشد گیاه می‌گردد. سرب همچنین با غیر فعال کردن آنزیم‌های غشایی از جمله فعالیت ATPase، سبب آسیب و گسستگی غشا پلاسمایی می‌گردد.

Pallavi و Rama (۲۰۰۵) و Samardakiew و Wozny (۲۰۰۰) بیان کردند که آلودگی سرب، فرآیندهای فتوسنتزی را به شدت تحت تأثیر قرار داده و موجب کاهش فتوسنتز می‌گردد. کاهش فتوسنتز می‌تواند به این علت‌ها باشد: ۱- تخریب فراساختار کلروپلاست، ۲- جلوگیری از بیوسنتز کلروفیل، ۳- مسدود کردن مسیر انتقال الکترون، ۴- بازدارندگی آنزیم‌های چرخه کالوین. نتایج مشابهی از اثرات بازدارندگی سایر فلزات بر کاهش مقدار کلروفیل در گیاهان دیگر گزارش شده است. Xiong و همکاران (۲۰۰۶) اثر سمّی مس را بر گیاه *Brassica pekinesis* بررسی کردند. از طرفی گزارش‌هایی نیز مبنی بر افزایش میزان کلروفیل در اثر وجود بعضی از عناصر وجود دارد. به عنوان مثال نتایج Resh (۲۰۰۱) نشان داد که افزایش گوگرد سبب افزایش میزان کلروفیل می‌گردد. Locy و همکاران (۱۹۹۶) بیان کردند که میزان کلروفیل a و b و کلروفیل کل در برگ ذرت و

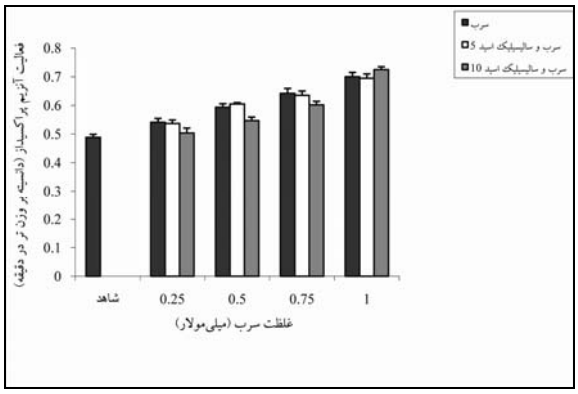
توتـون بـا افـزایش غلظـت شـوری افـزایش معنـی‌داری می‌یابد، زیرا شـوری باعـث افـزایش تعـداد آنـزیم‌هـای درگیر در سنتز کلروفیل مـی‌شـود. کـاربرد سالیسـیلیک اسـید همـراه بـا سـرب، سـبب افـزایش معنـی‌دار میـزان کلروفیل a در گیاهـان ۲۰ روزه کلـزا رقـم اکـاپی شـد، ولی بر میزان کلروفیل b و a+b اثر معنـی‌داری نداشـت. Zawoznik و همکاران (۲۰۰۷) بیان کردند که کـاربرد سالیسیلیک اسـید تحـت تـنش کـادمیوم باعـث افـزایش محتوای کلروفیل و بیوسنتز آن در گیـاه *Arabidopsis thalina* می‌گردد. Popova و همکاران (۲۰۰۳) عنـوان کردنـد کـه تیمـار بـا سالیسـیلیک اسـید اثـرات سـمّی کـادمیوم بـر فعالیـت فتوسـنتزی گیـاه ذرت را کـاهش مـی‌دهـد. سـرعت تثبیـت CO_2 تحـت تیمـار کـادمیوم کاهش یافته ولی تیمار سالیسیلیک اسید باعـث بهبـود و افزایش آن شده و بدین ترتیب سرعت فتوسنتز افـزایش یافته است.



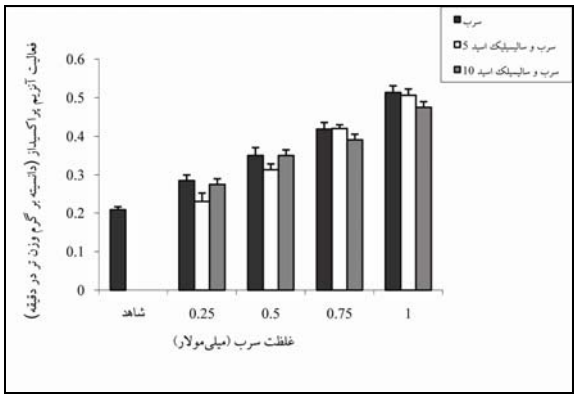
شکل ۶- تأثیر سالیسیلیک اسید بـر میـانگین فعالیـت آنـزیم کاتـالاز تحت تنش سرب در ریشه گیاه کلزا رقم اکاپی. مقادیر میـانگین سـه تکرار ± SE است.



شکل ۷- تأثیر سالیسیلیک اسید بر میانگین فعالیت آنزیم کاتالاز تحت تنش سرب در برگ گیاه کلزا رقم اکاپی. مقادیر میانگین سه تکـرار ± SE است.



شکل ۸- تأثیر سالیسیلیک اسید بر میانگین فعالیت آنـزیم پراکسـیداز تحت تنش سرب در ریشه گیاه کلزا رقم اکاپی. مقادیر میـانگین سـه تکرار ± SE است.



شکل ۹- تأثیر سالیسیلیک اسید بر میـانگین فعالیـت آنـزیم پراکسـیداز تحت تنش سرب در برگ گیاه کلزا رقم اکـاپی. مقـادیر میـانگین سـه تکرار ± SE است.

تغییرات قندهای محلول و نامحلول

با افزایش غلظت سرب در محیط هوگلند، میزان قندهای محلول در ریشه و اندام هوایی گیاهان ۲۰ روزه اکاپی کاهش معنی‌داری یافت (P<0.01) که با یافته‌های Oliver و Nadiv (۲۰۰۳) و Sharma و Dubey (۲۰۰۴) مطابقت دارد. آنها بیان کردند که سرب از جذب عناصری مانند Mg، Fe و Mn جلوگیری می‌کند. این عناصر در ساختار کلروفیل و کمپکس آزاد کننده اکسیژن در فتوسیستم II نقش دارند. جلوگیری از جذب این عناصر از طریق رقابت سرب با این عناصر صورت می‌گیرد. از طرفی سرب به ساختار LHCII متصل شده و ساختار این کمپکس را از حالت طبیعی خارج می‌کند. به این ترتیب میزان فتوسنتز و قندهای حاصل از فعالیت فتوسنتزی نیز کاهش می‌یابد. کاهش مقدار نشاسته نیز بر اثر افزایش غلظت نیترات سرب که به صورت معنی‌داری در ریشه و بخش هوایی گیاهان ۲۰ روزه اکاپی مشاهده شد، دلیلی بر این ادعاست که نشاسته تجزیه شده و قندهای محلول را ایجاد می‌کند (Alaoui *et al.*, 2003).

در تیمار همزمان سرب و سالیسیلیک اسید میانگین قندهای محلول و نامحلول در برگ و ریشه گیاهان ۲۰ روزه اکاپی به طور معنی‌داری افزایش یافت (P<0.01). سالیسیلیک اسید تقریباً بر اکثر واکنش‌های متابولیسمی گیاه تأثیر می‌گذارد و موجب تغییراتی در آنها می‌شود. این تغییرات اغلب به صورت سازش‌هایی است که میزان تحمل و سازگاری گیاهان را در مقابل عوامل محیطی افزایش می‌دهد (Metwally *et al.*, 2003). Popova و همکاران (۱۹۹۷) بیان کردند که سالیسیلیک اسید باعث تأخیر در کاهش مقدار رنگیزه‌های فتوسنتزی در شرایط تنش خشکی شده است، بنابراین به علت تعدیل در کاهش مقدار رنگیزه‌های فتوسنتزی و احتمالاً با حفظ ساختار و فعالیت روبیسکو باعث افزایش مقدار قندها می‌شود. همچنین به نظر می‌رسد که تیمار سالیسیلیک اسید، سیستم آنزیمی هیدرولیز کننده پلی‌ساکاریدها را مهار کرده یا به عبارت دیگر، سرعت تبدیل قندهای نامحلول به قندهای محلول را کاهش می‌دهد (Khodary, 2004).

تغییرات آنزیم‌های کاتالاز و پراکسیداز

با توجه به نتایج حاصل از تحقیق حاضر، هم زمان با افزایش غلظت نیترات سرب، افزایش معنی‌داری در فعالیت آنزیم‌های پراکسیداز و کاتالاز برگ و ریشه مشاهده شد (P<0.01). این نتایج با یافته‌های Dixit و همکاران (۲۰۰۱) مطابقت دارد. Shalini و Duey (۲۰۰۳) بیان کرد که کاتالازها و اکسیدازها از جمله آنزیم‌هایی به شمار می‌روند که نقش بسیار مهمی در پاسخ به تنش‌های غیر زیستی مانند سرب دارند و تحت تنش فعال می‌شوند. افزایش فعالیت آنزیم‌های کاتالاز و پراکسیداز در گندم توسط Kumar و Prasanna (۲۰۰۴) و توسط Sairam و Srivastava (۲۰۰۲) بر روی گندم گزارش شده است. با توجه به نتایج حاصل از تحقیق حاضر، تحت تیمار نیترات سرب به همراه سالیسیلیک اسید میانگین فعالیت آنزیم‌های کاتالاز و پراکسیداز برگ و ریشه نسبت به تیمارهای سرب کاهش یافت. Popova و همکاران (۲۰۰۸) بیان کردند که تیمار با سالیسیلیک اسید اثرات سمّی کادمیوم بر فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی را بر گیاه ذرت کاهش می‌دهد که با یافته‌های ما مطابقت دارد.

جمع‌بندی

نتایج این تحقیق نشان داد که هر چند سمّیت سرب اثراتی را بر عوامل فیزیولوژیک گیاه کلزا داشته است ولی استفاده از سالیسیلیک اسید در این تحقیق از راه‌های مختلف سبب افزایش سازگاری گیاه به شرایط تنش شده است.

منابع

شهیدی، ا.، سپهر.، ک. (۱۳۸۱) شته‌های کلزا. انتشارات فنی معاونت ترویج وزارت جهاد کشاورزی، کرمان.

قهرمان، ا. (۱۳۷۲) کروموفیت‌های ایران (سیستماتیک گیاهی). جلد ۲، مرکز نشر دانشگاهی، تهران.

Alaoui, B., Genet, P., Vinitdunand, F., Toussaint, M. L., Epron, D. and Badot, P. M. (2003) Effect of copper on growth in cucumber plants (*cucumis sativus*) and its relationships with carbohydrate accumulation and change in ion contents. Plant Science 166: 1213-1218.

Arnon, D. I. (1957) Copper enzymes in isolated chloroplasts, polyphenol oxidaes in *Beta vulgaris*. Plant Physiology 24: 1-15.

Azmat, R., Haider, S. and Askari, S. (2006) Phyotoxicity of Pb: effect of Pb on germination, growth, morphology and histomorphology of *Phaseolus mungo* and *Lens culinaris*. Pakistan Journal of Biological Sciences 9 (5): 979-984.

Chance, B. and Maehly, A. C. (1955) Assay of catalase and peroxidase. In: Methods in enzymology. (eds. Colowick, S. P. and Kaplan, N. O.) 764-775. Academic Press, New York.

Dixit, V., Pandey, V. and Shyam, R. (2001) Differentional antioxidative responses to heavy metal in roots and leaves of pea (*Pisum sativam* L. CV. Azad). Journal of Experimental Botany 52(358): 1101-1109.

Hu, J. Z., Shi, G. X., Xu, Q. S., Wang, X., Yuan, Q. H. and Du, K. H. (2007) Effect of Pb on the active oxygen scavenging enzyme activities and ultra structure in *Potamogeton crispus* leaves. Russian Journal of Plant Physiology 54: 414-419.

Kabata-Pendias, A. (2001) Trace elements in soil and plants, 3rd Ed, CRC Press, England.

Khodary, S. E. A. (2004) Effect of salicylic acid on the growth, photosynthesis and carbohydrate metabolism in salt stressed Maize plant. International Journal of Biology 6: 5-8.

Kim, Y. Y., Yang, Y., and Lee, Y. (2002) Pb and Cd uptake in rice roots. Plant Physiology 116: 368-372.

Kochert, G (1978) Carbohydrate determination by the phenol sulfuric acid method , in Helebust. In: Handbook physiological methods. (ed. Craig, J. S.) 96-97. Cambridge University Press, Cambridge.

Koroi, S. A. A. (1989) Gelek trophers tissue and spectral photometris under change zomeinfiussdr temperature and structure peroxidase isoenzyme. Physiology Vegetation 20: 15-22.

Kumar, A. and Prasanna, M. (2004) Effect of salinity on biochemical components of the mangrove. Aquatic Botany 8(2): 77-78.

Locy, R., Chang, D., Nielsen, C. C. B. L. and Singh, N. R. (1996) Photosynthesis in salt-adapted hero tropic tobacco, cells and regenerated plants. Plant Physiology 11: 321-328.

Metwally, A., Finkemeier, I., Georgi, M. and Dietz, K. J. (2003) Salicylic acid alleviated the cadmium toxicity in barley seedling. Physiology and Biochemistry of Plant 132: 272-281.

Oliver, D. and Nadiv, R. (2003) Uptake of Cu, Pb, Cd, and DDT by vegetables grown in urbon

Environments, Environmental Protection Heritag Council (EPHC): 151-161.

Pallavi, Sh. and Rama, Sh. D. (2005) Lead toxicity in plant. Brazilian Journal of Plant Physiology 17: 1-6.

Popova, L., Pancheva, T. and Uzunova, A. (1997) Salicylic acid: properties, biosynthesis and physiology role. Plant Physiology 23: 85-93.

Popova, L., Ananieva, V., Hristova, V., Christov, K., Georgieva, K., Alexieva, V. and Stoinova, Zh. (2003) Salicylic acid and methyl jasmonate induced protection on photosynthesis to parquet oxidative stress. Bulgarian Journal of Plant Physiology. Special Issue 133-152.

Popova, L., Krante, A., Yordanova, R., Janda, T. and Szalai, G. (2008) Treatment with salicylic acid decreases the effect of cadmium on photosynthesis in maize plants. Journal of Plant Physiology 165: 920-931.

Prasad, M. N. V. (1997) Trace metals. In: Plant ecophysiology (ed. Prasad, M. N. V.) 207-249. Wiley, New York.

Resh, H. M. (2001) Hydroponic food production. Woodbridge press publishing. Company, Santa Barbara.

Ruley, A. T., Nilesh, C. S. and Shivendra, V. S. (2004) Antioxidant defense in a lead accumulating plants, Sesbania dormancies. Plant Physiology and Biochemistry 41: 899-906.

Samardakiew, S. and Wozny, A. (2000) The distribution of lead in dunckweed root tip. Plant Soil 226: 107-111.

Sairam, R. K. and Srivastava, G. C. (2002) Change in antioxidant activity in subcellular fraction of tolerant and susceptible wheat genotypes in response to long term salt stress. Biologia Plantarum 162: 897-904.

Shalini, V. and Duey, R. S. (2003) Lead toxicity induced lipid peroxidation and alters the activities of antioxidant enzymes in growing rice plant. Plant Science 164: 1645-1655.

Sharma, P. and Dubey, R. S. (2004) Ascorbate peroxides from rice seedling . Plant Science 167: 541-550.

Xiong, Z. T., Liu, C. and Gng, B. (2006) Phytotoxic effects of copper on nitrogen metabolism and growth in *Brassica pekinenesis.* Ecotoxic and Environmental Safety 64: 273-280.

Zawoznik, M. S., Gropp, M. D., Tomaro, M. L. and Benavides, M. P. (2007) Endogenous salicylic acid potentiates cadmium- induced oxidative stress in *Arabidopsis thaliana*. Plant Science 173: 190-19.

Yang, X., Baligor, V. C., Mantest, D. C. and Clark, R. B. (1996) Plant tolerance to Nickel toxicity: Influx, transport and accumulation of Nickel in four species. Journal of Plant Nutrition 19: 73-85.

The effect of Salicylic acid on photosynthetic pigments, contents of sugar and antioxidant enzymes under lead stress in *Brassica napus* L.

Monireh Ranjbar [1]*, Hossein Lari Yazdi [2] and Sheida Boroumand Jazi [3]

[1] Department of Biology, Islamic Azad University, Falavarjan Branch, Falavarjan, Iran
[2] Department of Biology, Islamic Azad University, Boroujerd Branch, Boroujerd, Iran
[3] Young Researchers Club, Islamic Azad University, Falavarjan Branch, Falavarjan, Iran

Abstract

This research was done to study the effects of lead and salicylic acid on content of photosynthetic pigments (chlorophylls a, b and a+b), and changes of soluble and insoluble sugars (starch) in roots and shoots of *Brassica napus* L.. One-week old seedlings of *Brassica napus* L. were grown in nutrient solution consisting $Pb(NO_3)_2$ (0.25, 0.5, 0.75, 1, 1.5 and 2 mmol) and salicylic acid (5 and 10 µmol) for 20 days. The fulfillments were in triplicate and data were statistically analyzed by using full randomize plots, SPSS and Duncan test. Based on the results by increasing the concentrations of Pb $(NO_3)_2$ in hydroponic cultures; the plants could not tolerate high concentrations of lead (1.5 and 2 mmol). Other lead treated plants showed significant decrease in the amount of chlorophyll a, b and a+b and content of soluble and insoluble sugars in roots and shoot compared to control plants, in the meantime, the activities of catalase and peroxidase enzymes were significantly increased. Decreasing of the amount of chlorophyll a was higher than chlorophyll b in all treatments. There were considerable increases in chlorophyll a, soluble and insoluble sugars in both roots and shoot under lead and salicylic acid treatments. But application of salicylic acid did not show significant effect on the amount of chlorophyll b and a+b, whereas using of salicylic acid under lead treatments decreased activities of catalase and peroxidase enzymes, but salicylic acid did not have significant effect on average of catalase activities in root. On the other hand, an increase of soluble and insoluble sugars and oxidative enzymes could show the role of salicylic acid in increasing tolerance of plants under lead stress. Therefore, salicylic acid had a role in mitigation of damaged caused by oxidative stress.

Key words: Peroxidase, Salicylic acid, Lead, Soluble sugar, Insoluble sugar, Catalase, Chlorophyll, *Brassica napus* L.

* Corresponding Author: ranjbar@iaufala.ac.ir