اثر ژیبرلین و اسکوربیک اسید بر کاهش سمیت نیکل در گیاه سویا*

Amelioration of nickel toxicity in soybean plants by gibberellin and ascorbic acid

سکینه سعیدی‌سار، رمضانعلی خاوری‌نژاد، حمید فهیمی، مه‌لقا قربانلی و احمد مجد**

دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه تربیت معلم تهران و دانشگاه آزاد اسلامی، واحدگرگان

دریافت: ۱۳۸۴/۳/۱۸ پذیرش: ۱۳۸۴/۷/۲۵

چکیده

در این پژوهش، آثار برهم‌کنش نیکل، ژیبرلین و اسکوربیک اسید در سویا (*Glycine max* L. cv. Union × Elf) مورد بررسی قرار گرفت. دانه‌رست‌های هفت روزه که در محیط هیدروپونیک رشد یافته بودند، در معرض غلظت‌های مختلف نیکل کلرید (۰و ۰/۵ میلی‌مولار) و ژیبرلین (۰و ۰/۰۵ میلی‌مولار) و اسکوربیک اسید (۰و ۱ میلی مولار) قرار گرفتند. علایم سمیت نیکل مانند تشکیل لکه‌های قرمز- قهوه‌ای در سطح پهنک برگ در گیاهان تحت تیمار نیکل مشاهده شد. افزودن ژیبرلین و یا اسکوربیک اسید به محیط کشت، آثار سمی نیکل را کاهش داد. قابل توجه این‌که، هنگام کاربرد هم‌زمان ژیبرلین و اسکوربیک اسید، علایم سمیت Ni بروز نکرد. نیکل موجب کاهش وزن خشک ریشه و اندام‌های هوایی و همچنین کاهش کلروفیل در برگ‌ها شد. افزایش سطح مالون دی‌آلدهید (MDA) و تغییر فعالیت

* بخشی از رساله دکتری به راهنمایی آقایان دکتر رمضانعلی خاوری‌نژاد و دکتر حمید فهیمی که به دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات ارایه شده است.

** مسئول مکاتبه

Archive of SID

www.SID.ir

نزیم‌های آنتی‌اکسیدان مانند کاتالاز (CAT) و گایاکول پراکسیداز (GPX) در ریشه‌ها و برگ‌ها نشان دهنده بروز تنش اکسایشی در سویا بود، در حالی که گیاهان تحت تیمار نیکل که در معرض ژیبرلین یا اسکوربیک اسید و بویژه ژیبرلین و اسکوربیک اسید قرار گرفته بودند، رشد بهتری داشتند. برهم‌کنش ژیبرلین و اسکوربیک اسید از کاهش کلروفیل و پراکسیداسیون لیپیدها جلوگیری نمود و فعالیت آنزیم های کاتالاز و پراکسیداز را افزایش داد. این نتایج نشان می‌دهد که برهم‌کنش ژیبرلین و اسکوربیک اسید، آثار سمی نیکل را در دانه‌رست‌های سویا کاهش می‌دهد.

واژه های کلیدی: نیکل، ژیبرلین، اسکوربیک اسید، آسیب اکسایشی، سویا

مقدمه

فلزات سنگین از مهم‌ترین آلاینده‌های محیط زیست می‌باشند و یک خطر جدی برای موجودات زنده محسوب می‌شوند (Mor *et al.* 2002). برخی از فلزات سنگین مانند کادمیوم، سرب، جیوه، مس، روی و نیکل بویژه در غلظت‌های زیاد، بر رشد و نمو و عملکرد گیاه اثر می‌گذارند (Madhava Rao & Sresty 2000). آثار سمی فلزات سنگین بر گیاهان ناشی از تولید انواع مختلف اکسیژن فعال (ROS) مانند سوپراکسید($O_2^{\cdot-}$) ، پر اکسید هیدروژن (H_2O_2) و رادیکال هیدروکسیل ($OH^{\cdot}$) می‌باشد (Artetxe *et al.* 2002, Ferreira *et al.* 2002) که این اشکال مختلف اکسیژن فعال معمولاً با ایجاد آسیب‌های غشایی (Madhava Rao & Sresty 2000, Foyer *et al.* 1997) فرایند های مختلف سلولی را دچار اختلال می‌نمایند (Pereira *et al.* 2002).

امروزه با وجود آن‌که نیکل به مجموعه عناصر کم مصرف مورد نیاز گیاهان افزوده شده است (Benaroya *et al.* 2004, Witte-Claus *et al.* 2002, Palacios *et al.* 1998) و نقش آن در رشد و بویژه فعالیت آنزیم اوره‌آز به اثبات رسیده است (Witte-Claus *et al.* 2002, Gerendas *et al.* 1999)، ولی نیکل به عنوان یک فلز سنگین، بویژه در غلظت‌های بالا، موجب بروز تنش اکسیداتیو می‌شود (Wo-Niak & Basiak 2002). از اولین آثار سمی نیکل در گیاه، پراکسیده شدن لیپیدهای غشایی است که این امر با تغییر ساختار غشای سلول‌ها موجب بازدارندگی رشد گیاه نیز می‌شود (Panda *et al.* 2003). یکی از علایم پراکسیده‌شدن لیپیدهای غشایی تشکیل مالون دی‌آلدهید (MDA) می‌باشد که یکی از فراورده‌های حاصل از تجزیه اسیدهای چرب اشباع نشده محسوب می‌شود (Molassiotis *et al.* 2005a, Mittler 2002)، اما سلول‌های گیاهی برای حفاظت در مقابل آسیب‌های اکسیداتیو، مجهز به یک سیستم جاروب‌کننده رادیکال‌های آزاد می‌باشند.

Archive of SID

www.SID.ir

این سیستم شامل آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان مانند کاتالاز (CAT) و گایاکول پراکسیداز (GPX) و نیز سیستم آنتی‌اکسیدان غیر آنزیمی می‌باشد (Cho & Park 2000). از مهم‌ترین آنتی‌اکسیدان‌های گیاهی می‌توان به اسکوربیک اسید (AsA) اشاره نمود که همراه با ترکیب‌های دیگری مانند توکوفرول، کاروتنوییدها و فنل‌ها سیستم آنتی‌اکسیدان غیر آنزیمی را در گیاهان تشکیل می‌دهند (Shigeoka *et al.* 2002, Smirnoff *et al.* 2001, Smirnoff 2000). اسکوربیک اسید از آنتی‌اکسیدان‌های بسیار قوی می‌باشد که با احیای رادیکال‌های آزاد موجب بازدارندگی آن‌ها می‌شود. بر اساس گزارش‌های موجود، نوعی سیستم آنتی اکسیدان که سبب تولید مجدد اسکوربیک اسید می‌شود (Fecht-Christoffers *et al.* 2003)، در حفاظت گیاهان در مقابل تنش‌های اکسیداتیو ناشی از فلزات سنگین نقش دارد (Fecht-Christoffers *et al.* 2003, Gupta *et al.* 1999, Chaoui *et al.* 1997). از طرف دیگر، هورمون‌های گیاهی از مهم‌ترین عوامل مؤثر برفرایندهای نموی گیاه مانند گلدهی، رویان‌زایی و خفتگی می‌باشند (Mor *et al.* 2002, Davies 1987) و در سازگاری گیاه با شرایط مختلف محیطی نیز نقش اساسی ایفا می‌کنند. در میان هورمون‌های گیاهی، ژیبرلین‌ها بویژه GA_3 از مهم‌ترین تنظیم‌کننده‌های رشد طولی اندام‌های هوایی در بسیاری از گیاهان می‌باشند (Fecht-Christoffers *et al.* 2003). امروزه فرضیه‌ای درباره ارتباط بین سطح ژیبرلین‌ها و مقابله با تنش در گیاهان وجود دارد (Vettakkorumakankav 1999). به طور کلی با وجود آن‌که پژوهش‌های متعددی در زمینه آثار سمی فلزات سنگین بر رشد و متابولیسم گیاهان مختلف انجام شده است، ولی اطلاعات اندکی درباره راه‌های کاهش آسیب‌های ناشی از سمیت فلزات سنگین در گیاهان وجود دارد.

بنابراین در تحقیق حاضر، علاوه بر بررسی آثار سمی نیکل بر دانه‌رست‌های سویا به بررسی نقش حفاظتی اسکوربیک اسید و ژیبرلین و نیز برهم‌کنش آن دو در برابر تنش اکسیداتیو ناشی از نیکل پرداخته شده است.

روش بررسی

۱- مواد گیاهی و شرایط کشت

بذرهای سالم سویا (*Glycine max* L. cv. Union × Elf) با محلول سدیم هیپوکلریت ۲۰ درصد به مدت پنج دقیقه سترون و سپس با آب مقطر سترون فراوان شستشو داده شد. جوانه‌زنی بذرها در محیط کشت ماسه‌ای سترون به مدت پنج روز صورت گرفت. در این مدت آبیاری به وسیله محلول *هوگلند* (Hoagland & Arnon 1937) رقیق (۱:۲ V/V) سترون انجام شد. سپس دانه‌رست‌های جوان به محیط کشت هیدروپونیک دارای محلول کامل هوگلند انتقال یافتند. پس از سازش به شرایط جدید، انتقال دانه‌رست‌های هفت روزه به محلول‌های غذایی

Archive of SID

www.SID.ir

جدید با غلظت‌های مختلف نیکل (Ni)، ژیبرلین (GA_3) و اسکوربیک اسید (AsA) انجام پذیرفت. نیکل به صورت $NiCl_2$, $6H_2O$ در غلظت‌های ۰ و ۰/۵ میلی‌مولار و اسکوربیک اسید (AsA) در غلظت‌های ۰ و ۱ میلی‌مولار و ژیبرلین (GA_3) در غلظت‌های ۰ و ۰/۰۵ میلی‌مولار اضافه گردید. هوادهی منظم، تنظیم pH در ۶/۵ و تعویض روزانه محیط‌های کشت نیز در طول مدت تیمار صورت می‌گرفت و گیاهان در شرایط تنظیم شده با طول روز ۱۶ ساعت، شدت نور ۱۷۵ میکرومول فوتون در مترمربع در ثانیه و تناوب دمایی ۲۶/۲۲ درجه سانتی‌گراد (شب/ روز) و رطوبت نسبی ۵ ±۶۵ درصد به مدت پنج روز رشد یافتند و سپس برداشت گیاهان انجام شد. ریشه‌ها و اندام‌های هوایی از یکدیگر جدا و با آب مقطر بدون یون شسته شدند. نمونه‌های مورد استفاده برای تعیین رشد گیاهی در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد خشک شدند و مواد تازه گیاهی به منظور اندازه‌گیری فعالیت آنزیمی پس از قرارگرفتن در نیتروژن مایع در ۷۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

۲- اندازه‌گیری کلروفیل و مالون‌دی‌آلدهید

سنجش مقدار کلروفیل با استفاده از عصاره استونی به روش *آرنون* (Arnon 1949) انجام شد و میزان پراکسیداسیون لیپیدها با تعیین مقدار مالون دی‌آلدهید (MDA) به وسیله تست TBA و با استفاده از ضریب تصحیح $mM^{-1}\ cm^{-1}$ ۱۵۵ صورت گرفت (Chaparzadeh *et al.* 2004).

۳- استخراج آنزیمی

بافت‌های تر گیاهی در هاون و با بافر پتاسیم فسفات (pH ۷، ۱۰۰ mM) دارای Na_2EDTA ۰/۱ mM، ۰/۲ mM اسکوربیک اسید و یک درصد پلی‌وینیل‌پلی‌پیرولیدون در دمای چهار درجه سانتی‌گراد همگن گردیده و در ۱۲۰۰۰ g به مدت ۶۰ دقیقه سانتریفوژ شدند (Kang *et al.*2003). سنجش‌های آنزیمی در مایع رویی با استفاده از اسپکتروفتومتر و در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد انجام پذیرفت. مقدار پروتئین هر نمونه با روش *برادفورد* (Bradford 1976) مورد ارزیابی قرارگرفت.

۴- سنجش‌های آنزیمی

بررسی میزان فعالیت کاتالاز با بررسی کاهش مقدار هیدروژن پراکسید در۲۴۰nm انجام شد. مخلوط فرایند شامل بافر پتاسیم فسفات (pH ۷/۵، ۱۰۰ mM) و ۲۵ mM پراکسید هیدروژن بود. فرایند با افزودن مقدار مناسب عصاره آنزیمی در حجم نهایی سه میلی‌لیتر آغاز می‌شد (Pereira *et al.* 2003). فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز (GPX)، به عنوان نمونه‌ای از انواع پراکسیدازها مورد ارزیابی قرار گرفت. محیط واکنش آنزیم شامل بافر پتاسیم فسفات (pH ۷، ۵۰ mM) ، Na_2EDTA۰/۱mM، ۵ mM هیدروژن پراکسید و ۳۰ mM گایاکول بود. واکنش با افزودن مقدار مناسب عصاره آنزیمی در حجم نهایی سه میلی‌لیتر مخلوط آغاز می‌شد.

Archive of SID

www.SID.ir

افزایش جذب به واسطه تشکیل تتراگایاکول در طول موج ۴۷۰ nm به مدت سه دقیقه ثبت شد (Fielding & Hall 1978). فعالیت آنزیم‌های مورد بررسی به صورت تغییرات جذب در دقیقه به ازای هر میلی‌گرم پروتئین بیان گردید.

۵- تجزیه و تحلیل آماری

تجزیه و تحلیل آماری تمام داده‌های حاصل از آزمایش‌های مختلف با استفاده از نرم‌افزارهای SPSS و MSTATC انجام پذیرفت. میانگین شاخص‌های اندازه‌گیری شده با استفاده از آزمون دانکن گروه‌بندی شدند.

نتیجه

در گیاهانی که فقط تحت تیمار نیکل بودند، علایم سمیت نیکل از جمله کلروز و تشکیل لکه‌های قرمز- قهوه‌ای در سطح برگ‌ها مشاهده شد. افزودن ژیبرلین یا اسکوربیک اسید به محیط کشت گیاهان تحت تیمار نیکل، موجب کاهش بروز این علایم شد. اما به طور جالب توجهی در تیمار هم زمان ژیبرلین و اسکوربیک اسید، در دانه‌رست‌های تحت تیمار نیکل به هیچ وجه علایم سمیت بروز نکرد. کاهش شدید وزن خشک ریشه و اندام هوایی نشان دهنده آثار بازدارندگی نیکل بر رشد گیاه بود (شکل ۱). در تیمار ۰/۵ میلی‌مولار نیکل، وزن خشک ریشه و اندام هوایی به ترتیب ۶۶% و ۶۲% نسبت به شاهد کاهش یافت. در حضور ژیبرلین یا اسکوربیک اسید، گیاهان تحت تیمار نیکل رشد بهتری نشان دادند. در کاربرد هم زمان ژیبرلین و اسکوربیک اسید، وزن خشک ریشه و اندام هوایی در دانه رست‌های در معرض نیکل فقط ۹% و ۱۲% نسبت به شاهد کاهش یافت (شکل ۱).

گیاهانی که فقط تحت تیمار نیکل قرار گرفته بودند، حدود ۶۵% کاهش کلروفیل را نیز نسبت به شاهد نشان دادند (شکل ۲). در تیمارهایی از نیکل که فقط دارای ژیبرلین یا اسکوربیک اسید بودند، میزان کلروفیل نسبت به شاهد به ترتیب ۳۰% و ۵۵% کاهش یافت. این کاهش در حضور هم‌زمان ژیبرلین و اسکوربیک اسید در گیاهان تحت تیمار نیکل به ۱۷% رسید.

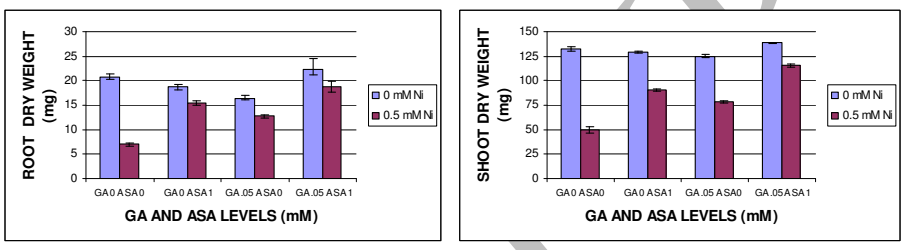
تولید MDA در گیاهان در معرض نیکل، نشان دهنده پراکسیداسیون لیپیدهای غشایی بود. در ریشه و برگ دانه‌رست‌هایی که پنج روز تحت تیمار نیکل قرار گرفته بودند، میزان تولید MDA به ترتیب ۱۲۳% و ۳۱۸% نسبت به شاهد افزایش نشان داد. در حضور ژیبرلین یا اسکوربیک اسید از تولید MDA کاسته شد، اما در گیاهانی که به طور همزمان تحت تیمار نیکل، ژیبرلین و اسکوربیک اسید قرار گرفته بودند، میزان تولید MDA تقریباً مشابه شاهد بود (شکل ۲).

Archive of SID

www.SID.ir

فعالیت آنزیم کاتالاز در ریشه و برگ گیاهان تحت تیمار نیکل به شدت مهار شده بود. این کاهش به ترتیب۳۰% و ۴۴% نسبت به شاهد بود. وقتی ژیبرلین یا اسکوربیک اسید به همراه یون‌های نیکل به محیط کشت اضافه شد، فعالیت این آنزیم افزایش نشان داد، اما در تیمار هم‌زمان ژیبرلین و اسکوربیک اسید، فعالیت آنزیم کاتالاز در ریشه و برگ به ترتیب ۸۹ % و ۸۵ % نسبت به شاهد افزایش نشان داد (شکل ۳).

فعالیت گایاکول پراکسیداز نیز در ریشه و برگ دانه‌رست‌های تحت تیمار نیکل ۲۷ % و ۴۴ % نسبت به شاهد کاهش یافت. در تیمارهایی از نیکل که فقط ژیبرلین یا اسکوربیک اسید اضافه شده بود، فعالیت گایاکول پراکسیداز اندکی افزایش یافت، اما در تیمار دارای نیکل، ژیبرلین واسکوربیک اسید، فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز در ریشه و برگ به ترتیب ۷۰% و ۲۷% نسبت به شاهد افزایش نشان داد (شکل ۳).



شکل ۱– اثرات نیکل، ژیبرلین و اسکوربیک اسید بر وزن خشک ریشه و اندام هوایی سویا. مقادیر موجود در نمودار خطای استاندارد ± میانگین می‌باشند.

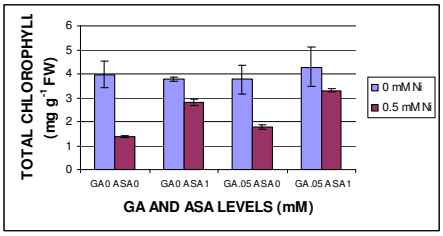
Fig. 1. Effects of Ni, GA_3 and AsA on root and shoot dry weights of soybean plants (Means± S.E.).

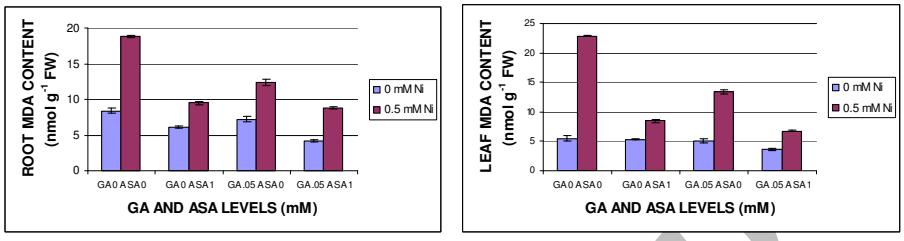
بحث

نتایج حاصل از پژوهش حاضر، نشان دهنده آثار سمی نیکل در دانه‌رست‌های سویا بود. کلروز، تشکیل لکه های قرمز- قهوه‌ای در سطح برگ‌ها و نیز کاهش شدید رشد، از مهم‌ترین آثار سمیت نیکل در گیاه سویا محسوب می‌شوند. فلزات سنگین به روش‌های گوناگون مانع رشد گیاهان می‌شوند. از یک طرف، فلزات سنگین با کاهش تورژسانس سلول موجبات کاهش تقسیم سلولی و مهار رشد سلول را فراهم می‌آورند (Baccouch *et al.* 2001, 1998) و از طرف دیگر، با تجمع در دیواره سلولی و ورود به سیتوپلاسم و ایجاد اختلال در متابولیسم طبیعی سلول منجر به کاهش رشد می‌گردند (Molassiotis *et al.* 2005a, 2005b). فلزات سنگین با القای تولید انواع مختلف اکسیژن فعال، آسیب‌های جدی را به سلول وارد می‌کنند

Archive of SID

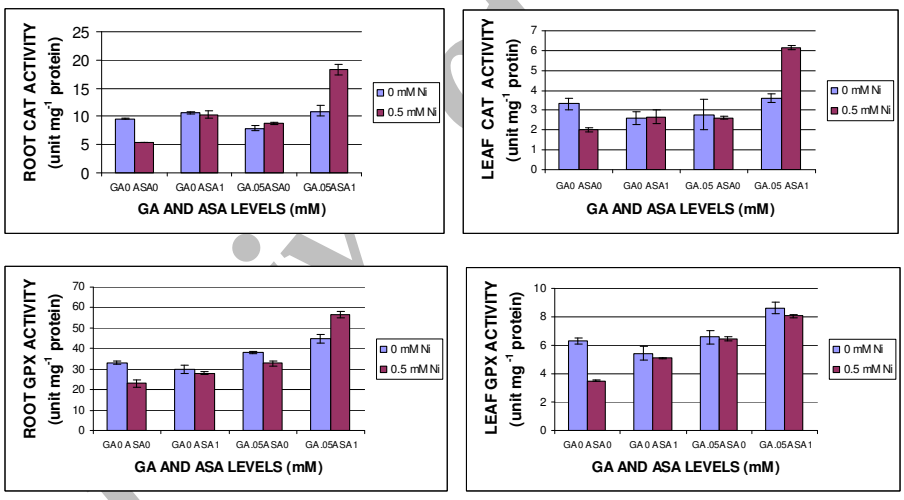
www.SID.ir





شکل ۲- اثرات نیکل، ژیبرلین و اسکوربیک اسید بر میزان کلروفیل کل در برگ و میزان مالون دی‌آلدهید (MDA) در ریشه و برگ گیاه سویا. مقادیر موجود در نمودار خطای استاندارد ± میانگین می‌باشند.

Fig. 2. Effects of Ni, GA_3 and AsA on total chlorophyll and malondialdehyde (MDA) contents in roots and leaves of soybean plants (Means ± S.E.).



شکل ۳- اثرات نیکل، ژیبرلین و اسکوربیک اسید بر میزان فعالیت آنزیم کاتالاز (CAT) و آنزیم گایاکول پراکسیداز (GPX) در ریشه و برگ گیاه سویا. مقادیر موجود در نمودار خطای استاندارد ± میانگین می‌باشند.

Fig. 3. Effects of Ni, GA_3 and AsA on CAT and GPX activities in roots and leaves of soybean plants (Means ± S.E.).

www.SID.ir

(Madhava Rao & Sresty 2000, Vangronsveld & Clijesters 1994). در تحقیق حاضر، تولید MDA و افزایش پراکسیداسیون لیپیدها، تنش اکسیداتیو ناشی از نیکل را در گیاه سویا تأئید می‌نمود. نتایج مشابه متعددی در این زمینه به دست آمده است (Laspina *et al.* 2005, Molassiotis *et al.* 2005a, Baccouch *et al.* 2001, Groppa *et al* 2001, Madhava Rao & Sresty 2000, Cho & Park 2000, Pandolfini *et al.* 1996).

به نظر می‌رسد افزایش پراکسید هیدروژن در گیاهان تحت تنش فلزات سنگین، با تحریک واکنش Haber-Weiss و تولید $OH^{\cdot}$، موجب پراکسیداسیون لیپیدها و آسیب‌های غشایی می‌شود که در نهایت منجر به کاهش رشد گیاه نیز می‌گردد (Mittler 2002). کاهش چشم‌گیر میزان کلروفیل نیز در گیاهان تحت تیمار نیکل نمایانگر وسعت آسیب‌های اکسیداتیو می‌باشد. این کاهش می‌تواند به دلیل بازدارندگی مراحل مختلف بیوسنتز کلروفیل باشد (Hegedus *et al.* 2001). فلزات سنگین با بازدارندگی بیوسنتز پروتئین‌های کمپلکس جمع‌کننده نوری II(LHC) در سطح رونویسی (Tziveleka *et al.* 1999)، تشکیل این کمپلکس را مختل می‌سازند (Horvath *et al.* 1996). تجزیه زیستی کلروفیل نیز در حضور فلزات سنگین از عوامل مهم کاهش کلروفیل محسوب می‌شود (Hegedus *et al.* 2001). از دیگر آثار سوء نیکل می‌توان به کاهش فعالیت آنزیم‌های CAT و GPX اشاره نمود. از یک طرف، رادیکال‌های آزاد اکسیژن که در شرایط تنش فلزات سنگین به وجود آمده‌اند، با حمله به آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان و آسیب‌های اکسیداتیو موجب مهار آنها می‌شوند (Gallego *et al.* 1996) و به این ترتیب با کاهش فعالیت CAT بر میزان تجمع H_2O_2 افزوده می‌شود که این فرایند نیز به نوبه خود سبب مهار آنزیم‌های حساسی مانند GPX و CAT می‌گردد (del Rio *et al.* 2003) و از طرف دیگر، یون‌های نیکل با اتصال مستقیم به آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان هم می‌توانند موجب مهار این آنزیم‌ها شوند (Schutzendubel *et al.* 2002, Madhava Rao & Sresty 2000). در این پژوهش به منظور کاهش سمیت نیکل در سویا از اسکوربیک اسید و ژیبرلین به طور جداگانه و هم‌زمان استفاده شد. اسکوربیک اسید به عنوان یک آنتی‌اکسیدان مهم گیاهی می‌تواند با انواع مختلف اکسیژن‌های فعال ترکیب شده (Smirnoff & Wheeler 2000) و از بسیاری از آسیب‌های ناشی از افزایش انواع مختلف اکسیژن‌های فعال مانند پراکسیداسیون لیپیدهای غشایی، تخریب پروتئین‌ها و تجزیه کلروفیل بکاهد. در ضمن اسکوربیک اسید سبب افزایش فعالیت آنزیم‌های GPX و بویژه CAT شده و از تولید MDA جلوگیری نموده است. در حضور آسکوربات، فعالیت چرخه گلوتاتیون- آسکوربات و در نتیجه جاروب کننده‌های H_2O_2 افزایش یافته و به دنبال آن با افزایش فعالیت CAT با تنش اکسیداتیو مقابله می‌شود (Dixit *et al.* 2001). به این ترتیب با کاسته شدن از تنش اکسیداتیو، از کاهش رشد و کلروفیل در گیاه جلوگیری خواهد شد. البته با توجه به شواهد موجود اسکوربیک اسید نقش دوگانه‌ای در رشد سلول ایفا می‌کند.

Archive of SID

www.SID.ir

از یک طرف، موجب تغییر چرخه سلولی و تحریک تقسیم سلولی می‌شود (Cordoba-Pedregosa *et al.* 1996) و از طرف دیگر، رشد طولی و گسترش سلولی را امکان‌پذیر می‌سازد (Horemans *et al.* 2000).

از سوی دیگر، کاربرد ژیبرلین نیز موجب افزایش مقاومت گیاه در شرایط تنش شده است. افزایش میزان رشد به وسیله ژیبرلین می‌تواند ناشی از افزایش سطح برگی، تحریک فتوسنتز و تغییر در مسیرهای متابولیسمی فراورده های فتوسنتزی باشد (Ghorbanli *et al.* 1999, Arteca 1995). ژیبرلین با تأثیر بر تقسیم و گسترش سلولی موجب تسریع رشد طولی ساقه در بسیاری از گیاهان می‌شود. در حضور ژیبرلین فعالیت آنزیم اینورتاز افزایش یافته که این فرایند می‌تواند موجب افزایش هگزوزهای مورد نیاز برای رشد دیواره سلولی شود و به این ترتیب ژیبرلین می‌تواند موجب رشد طولی بویژه در اندام هوایی شود (Morvan-Betrand *et al.* 2001). بر اساس نظر *کاپچینا* و *فودونلیا* (Kapchina & Foudonlia 1991) در گیاهان تحت تنش، ژیبرلین با فعال‌نمودن آنزیم‌های پراکسیداز، نقش اساسی در مقابله با تنش اکسیداتیو ایفا می‌کند. با وجود آن‌که در این پژوهش، گیاهان تحت تیمار نیکل در حضور اسکوربیک اسید نسبت به گیاهان در معرض ژیبرلین، مقاومت بیشتری در شرایط تنش نشان دادند، ولی در کاربرد هم‌زمان ژیبرلین و اسکوربیک اسید علایم سمیت نیکل فوق العاده کاهش پیدا کرد. برهم‌کنش ژیبرلین- اسکوربیک اسید از کاهش رشد و میزان کلروفیل و از افزایش پراکسیداسیون لیپیدهای غشایی جلوگیری نمود. به علاوه با افزایش همه جانبه آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان درحضور ژیبرلین و اسکوربیک اسید در گیاهان در معرض تنش، آسیب‌های اکسیداتیو ناشی از نیکل به حداقل رسید.

بنابراین، با توجه به نتایج حاصل از پژوهش حاضر استفاده از اسکوربیک اسید و ژیبرلین به طور جداگانه و بویژه هم‌زمان، به طور قطع تا حد زیادی موجب حفاظت گیاه سویا در برابر تنش اکسیداتیو ناشی از نیکل می‌شود، اما به منظور شناخت دقیق مکانیسم احتمالی برهم‌کنش اسکوربیک اسید و ژیبرلین در شرایط تنش اکسیداتیو ناشی از فلزات سنگین باید پژوهش‌های دقیق‌تری انجام پذیرد.

منابع

جهت ملاحظه منابع به صفحات 27-21 متن انگلیسی مراجعه شود.

نشانی نگارندگان: سکینه سعیدی‌سار و دکتر حمید فهیمی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات؛ دکتر رمضانعلی خاوری‌نژاد و دکتر احمد مجد، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات و دانشگاه تربیت معلم تهران و دکتر مه‌لقا قربانلی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد گرگان.

Archive of SID

www.SID.ir

AMELIORATION OF NICKEL TOXICITY IN SOYBEAN PLANTS BY GIBBERELLIN AND ASCORBIC ACID

S. SAEIDI-SAR*, R.A. KHAVARI-NEJAD, H. FAHIMI, M. GHORBANLI and **A. MAJD**

Science & Res. Branch, Islamic Azad Univ.; Dept. of Biology, Univ. of Teachers Education and Gorgan Branch, Islamic Azad Univ.

Received: 08.06.2005 Accepted: 17.10.2005

The interactive effects of nickel (Ni) and ascorbic acid (AsA) and gibberellin (GA_3) on soybean seedlings (*Glycine max* L. cv. Union × Elf) were examined. Seven-day old hydroponically-grown seedlings were exposed to $NiCl_2$, $6H_2O$ (0.5 mM), either with or without AsA (1 mM) or GA_3 (0.05 mM) or AsA (1 mM) plus GA_3 (0.05 mM), for five days. Nickel toxicity symptoms, such as formation of reddish-brown mottled spots on the leaf blade, observed in Ni-treated plants. Addition of GA_3 or AsA to the culture medium reduced toxic effects of nickel. Interestingly, with application of GA_3 plus AsA, these symptoms did not appear in Ni-stressed plants. Ni decreased dry weights of both roots and shoots and reduced chlorophyll content in leaves. An enhanced level of malondialdehyde and changes in the activities of the antioxidant enzymes, catalase (CAT, EC 1.11.1.6) and guaiacol peroxidase (GPX, EC 1.11.1.7), in both roots and leaves indicated that Ni caused oxidative stress in soybean plants. The Ni-stressed seedlings that exposed to AsA or GA_3, especially both GA_3 plus AsA, exhibited much better growth, when compared

* Corresponding author

Archive of SID

www.SID.ir

to those of other Ni-treated plants. Interaction of AsA plus GA_3 prevented the decrease in chlorophyll content and lipid peroxidation as well as increased the activities of CAT and GPX enzymes. These results suggest that GA_3 plus AsA treatment causes a decrease in the negative effects of heavy metal damage in soybean seedlings.

Keyword: Nickel, Gibberellin, Ascorbic acid, Oxidative damage, Soybean

To look at the figures, please refer to the Persian text (pages: ۶۷-۷۵).

References

ARNON, D.I. 1949. Copper enzymes in isolated chloroplast. Polyphenol oxidase in *Beta vulgaris.* Plant Physiology 24: 1-15.

ARTECA, R.N. 1995. Plant growth substances. 1st ED-Chapman and Hall, London.

ARTETXE, U., GARCIA–PLAZAOLA, J.I., HERNANDEZ, A. and BECERRIL, J.M. 2002. Low light grown duckweed plants are more protected against the toxicity induced by Zn and Cd. Plant Physiology and Biochemistry. 40: 859-863.

BACCOUCH, S., CHAOUI, A. and EL FERJANI, E. 2001. Nickel toxicity induces oxidativedamage in *Zea mays* roots. Journal of Plant Nutrition. 24: 1085-1095.

BACCOUCH, S., CHAOUI, A. and EL FERJANI, E. 1998. Nickel toxicity: effects on growthand metabolism of maize. Journal of Plant Nutrition 21: 577-588.

BENAROYA, R.O., TZIN, V., TEL-OR, E. and ZAMSKI E. 2004. Lead accumulation in theaquatic fern *Azolla filiculoides*. Plant Physiology and Biochemistry 42: 639-645.

BRADFORD, M.M. 1976. A rapid sensitive method for the quantitation of microprogram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry 72: 248-254.

CHAOUI, A., MAZHOUDI, S., GHORBAL, M.H. and EL FERJANI, E. 1997. Cadmium and zinc induction of lipid peroxidation and effects of antioxidant

Archive of SID

www.SID.ir

enzyme activities in bean (*Phaseolus vulgaris* L.). Plant Science 127: 139-147.

CHAPARZADEH, N., AMICO, M.L.D., KHAVARI-NEJAD, R.A., IZZO, R. and NAVARI-IZZO, F. 2004. Antioxidative responses of *Calendula officinalis* under salinity conditions. Plant Physiology and Biochemistry 42: 695-701.

CHO, V.H. and PARK, J.O. 2000. Mercury-induced oxidative stress in tomato seedlings. Plant Science 126: 1-9.

CORDOBA-PEDREGOSA, M., GONZALEZ-REYCR, J.A., CANADILLAS, M.S., NAVAS, P. and CORDOBA, F. 1996. Role of appoplastic and cell-wall peroxidases on the stimulation of root elongation by ascorbate. Plant Physiology 112: 1119-1125.

DAVIES, P.J. 1987. Plant hormones and their role in plant growth and development, the Kluwer Academic Dordrecht. The Netherlands.

DEL RIO, L.A., CORPAS, F.J. Sandalio, L.M., Palma, J.M. and Barroso, J.B. 2003. Plantperoxisomes, reactive oxygen metabolism and nitric oxide. IUBMB Life 55: 71-81.

DIXIT, V., PANDEY, V. and SHYAM, R. 2001. Differential antioxidative responses to cadmium in roots and leaves of pea (*Pisum sativum*). Journal of Experimental Botany 52: 1101-1109.

FECHT-CHRISTOFFERS, M.M., MAIER, P. and HORST, W.J. 2003. Apoplastic peroxidases and ascorbate are involved in manganese toxicity and tolerance of *Vigna unguiculata*. Physiologia Plantarum 117: 237-244.

FERREIRA, R.R., FORNAZIER, RF., VITORIA, A.P. and LEA, P.J. 2002. Changes in antioxidant enzyme activities in soybean under cadmium stress. Journal of Plant Nutrition 25: 327-342.

FIELDING, J.L and.HALL, J. 1978. A biochemical and cytochemical study of peroxidase activity in roots of *Pisum sativum*. Journal of Experimental Botany 29: 989-981.

FOYER, C.H., LOPEZ-OELGADO, H., DAT, J.F. and SCOTT, I.M. 1997. Hydrogen peroxide and glutathione-associated mechanisms of acclimatory stress tolerance and signaling. Physiologia Plantarum 100: 241 – 254.

Archive of SID

www.SID.ir

GALLEGO, S.M., BENAVIDES, M.P. and TOMARO, M.L. 1996. Effect of heavy metal ion excess on sunflower leaves: evidence for involvement of oxidative stress. Plant Science 121: 151-159.

GERENDAS, J., POLACCO, J., FREYERMUTH, S.K. and SATTELMACHER, B. 1999. Significance of nickel for plant growth and metabolism. Journal of Plant Nutrition and Soil Science 162: 241-256.

GHORBANLI, M., HADAD KAVEH, S. and FARZAMI SEPEHR, M. 1999. Effects of cadmium and gibberellin on growth and photosynthesis of *Glycine max* Photosynthetica 17: 627-631.

GROPPA, M.D., TOMARO, M.L. and BENAVIDES, M.P. 2001. Polyamines as protectors against cadmium or copper-induced oxidative damage in sunflower leaf discs. Plant Science 161: 481-488.

GUPTA, M., CUYPERS, A., VANGRONSVELD, J. and CLIJSTERS, H. 1999. Copper affects the enzyme of the ascorbate-glutathione cycle and its related cell walls from horseradish (*Armoracia lapathifolia* Gilib). Planta 136: 271-276.

HEGEDUS, A., ERDEI, S. and HORVATH, G. 2001. Comparative studies of H_2O_2 detoxifying enzymes in green and greening barely seedlings under cadmium stress. Plant Science 160: 1085-1093.

HOAGLAND, DR. and ARNON, D.I. 1957. California Agriculture Experiment Station. Circular 347.

HOREMANS, N., FOYER, C.H., POTTERS, G. and ASARD, H. 2000. Ascorbate function and associated transport system in plants. Plant Physiology and Biochemistry 38: 531-541.

HORVATH, G., DORPPA, M., ORAVECZ, A., RASKIN, V.I. and MARDER, I.B. 1996. Formation of the photosynthetic apparatus during greening of cadmium-poisoned barely leaves. Planta 199: 228-243.

KANG, G., WANG, C., SUN, G. and WANG, Z. 2003. Salicylic acid changes activities of H_2O_2-metabolizing enzymes and increases the chilling tolerance of banana seedlings. Environmental and Experimental Botany 50: 9-15.

Archive of SID

www.SID.ir

KAPCHINA, V. and FOUDONLIA, A. 1991. Effects of growth regulators and polyamines on salinity-induced changes of growth and peroxidase activity in *Pisum sativum*. Fizidogia Natasteniyata 17: 35-40.

LASPINA, N.V., GROPPA, M.D., TOMARO, M.L. and BENAVIDES, M.P. 2005. Nitric oxide protects sunflower leaves against Cd-induced oxidative stress. Plant Science (in press).

MADHAVA RAO, K.V. and SRESTY, T.V.S. 2000. Antioxidative parameters in the seedling of pigeonpea (*Cajanus cajan* L. Millspaugh) in response to Zn and Ni stresses. Plant Science 157: 113-128.

MITTLER, R. 2002. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. Trends Plant Science 7: 405-410.

MOLASSIOTIS, A., SATIPOULOS, T., TANOU, G., DIAMANTIDIS, G. and THERIOS, I. 2005a. Boron-induced oxidative damage and antioxidant and nucleolytic responses in shoot tips culture of apple rootstock EM9 (*Malus domestica* Borkh.). Environmental and Experimental Botany (In Press).

MOLASSIOTIS, A., TANOU, G., DIAMANTIDIS, G. and PATAKAS, A. 2005b. Effects of 4-month Fe deficiency exposure on Fe reduction mechanism, photosynthetic gas exchange chlorophyll fluorescence and antioxidant defence in two peach rootstocks differing in Fe deficiency tolerance. Journal of Plant Physiology (in press).

MOR, I.R., GOKANI, S.J. and CHANDA, S.V. 2002. Effects of mercury toxicity on hypocotyls elongation and cell wall lossening in *Phaseolus seedlings*. Journal of Plant Nutrition 25: 843-860.

MORVAN-BETRAND, A., ERNSTSEN, A., LINGRAD, B., KOSHIOKA, M., L.E. SAOS, J., BAUCAUD, J., PRUD HOME, M.P. and JUNTTILA, O. 2001. Endogenous gibberellins in *Lolium perene* and influence of defoliation on their contents in elongating leaf bases and in leaf sheaths. Physiologia Plantarum 111: 225-231.

PALACIOS, G., GOMEZ, I., CARBONEL-BARRACHINA, A., NAVARRO PEDRENO, J. and MATAIX, J. 1998. Effect of nickel concentration on

Archive of SID

www.SID.ir

tomato plant nutrition and dry matter yield. Journal of Plant Nutrition 21: 2179-2191.

PANDA, SK., CHAUDHURY, I., and KHAN, M.H. 2003. Heavy metals induce lipid peroxidation and affect antioxidants in wheat leaves. Biologia Plantarum 46: 289-294.

PANDOLFINI, T., GABBRIELLI, R. and CISCATO, M. 1996. Nickel toxicity in two drum wheat cultivars differing in drought sensitivity. Journal of Plant Nutrition 19: 1611-1627.

PEREIRA, G.J.G., MOLINA, S.M.G., LEA, P.J. and AZEVEDO, R.A. 2002. Activity of antioxidant enzymes in response to cadmium in *Crotalaria juncea*. Plant and Soil 239: 123-132.

SCHUTZENDUBEL, A., NIKOLOVA, P., RUDOLF, C. and POLLE, A. 2002. Cadmium and H_2O_2-induced oxidative stress in *Populus*×*Canescens* roots. Plant Physiology and Biochemistry 40: 577-584.

SHIGEOKA, S., ISHIKAWA, T., TAMI, M. and MIYAGAWA, Y. 2002 Regulation and function of ascorbate peroxidase isoenzymes. Journal of Experimental Botany 53: 1305-1319.

SMIRNOFF, N., CONKLIN, P. and LOEWUS, F.A. 2001. Biosynthesis of ascorbic acid in plants: A renaissance. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology 52: 437-467.

SMIRNOFF, N. 2000. Ascorbic acid metabolism and functions of multi-factted molecule. Current Opinion of Plant Biology 3: 229-235.

SMIRNOFF, N. and WHEELER, G.L. 2000. Ascorbic acid in plants: biosynthesis and function. Critical Reviews in Plant Sciences 19: 267-290.

TZIVELEKA, L., KALDIS, A., HEGEDUS, A., KISSIMON, J., PROMBONA, A., HORVATH, G. and ARGYROUDI-AKOYOU, J. 1999. The effect of Cd on chlorophyll and light-harvesting complex II biosynthesis in greening plants. Naturforsch 54c: 740-745.

VANGRONSVELD, J. and CLIJESTERS, H. 1994. Toxic effects of metals, *In*: FARAGO, M.E. (Ed.). Plants and the Chemical Elements-Biochemistry, Uptake, Tolerance and Toxicity, VCH, New York, 149-177.

Archive of SID

www.SID.ir

VETTAKKORUMAKANKAV, N. 1999. A crucial role for gibberellin in stress protecting of plants. Plant and Cell Physiology 40: 542-548.

WITTE-CLAUS, P., TILLER-SARAH, A., TAYLOR-MARK, A. and DAVIES-HOWARD, V. 2002. Addition of nickel to Murashige and Skoog medium in plant tissue culture activates urease and may reduce metabolic stress. Plant Cell Tissue and Organ Culture 68: 103-104.

WO-NIAK, K. and BASIAK, J. 2003. Free radicals-mediated induction of oxidized DNA-bases and DNA protein cross-links by nickel chloride. Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis 514: 233-243.

Addresses of the authors: S. SAEIDI-SAR and Dr. H. FAHIMI, Science & Res. Branch, Islamic Azad Univ., Tehran; Dr. R.A. KHAVARI-NEJAD and Dr. A. MAJD, Science & Res. Branch, Islamic Azad Univ. and Univ. of Teachers Education, Tehran, and Dr. M. GHORBANLI, Gorgan Branch, Islamic Azad Univ., Gorgan, Iran.

Archive of SID

www.SID.ir