Archive of SID

فصلنامه علوم زیستی دانشگاه آزاد اسلامی واحد زنجان
شماره پیاپی ۱۰، جلد ۳، شماره ۳، تابستان ۸۹، صفحه ۷۱ تا صفحه ۸۰

تاثیر سالیسیلیک اسید برونزا بر پراکسیداسیون لیپید و فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدان در برگ‌های گیاهان کلزا تحت تنش نیکل

نادر کاظمی[۱]، رمضانعلی خاوری نژاد[۲]، حمید فهیمی[۳]، سارا سعادتمند[۴]، طاهر نژاد ستاری[۵]

۱- دانشجوی دکتری فیزیولوژی گیاهی، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم،دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران .bionader@yahoo.com
۲- استاد گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه تربیت معلم تهران.
۳- استادیار گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه تهران.
۴- استادیار گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران.
۵- دانشیار گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران.

تاریخ دریافت: ۸۹/٤/۲۰ تاریخ پذیرش: ۸۹/٦/۱٦

چکیده

در این پژوهش به بررسی اثر سالیسیلیک اسید (SA) در گیاه کلزا از نظر مقابله با تنش اکسیداتیو ناشی از نیکل پرداخته شد. گیاهان ۲۱ روزه به مدت ده روز در معرض غلظت‌های مختلفی از $NiCl_2 . 6H_2O$(۰ و۰/۵ و ۱ میلی مولار) و SA (۰و۰/۲ میلی مولار) قرار گرفتند. تجمع نیکل در ریشه‌ها به مراتب بیشتراز بخش‌های هوایی گیاه بود. نتیجه جالب توجه دراین تحقیق کاهش انتقال نیکل از ریشه به اندام‌های هوایی در تیمارهای دارای SA بود. درغیاب SA، مقادیر بالای نیکل موجب کاهش وزن خشک ریشه‌ها و اندام‌های هوایی و نیز کاهش مقدار کلروفیل در برگ‌ها شد. در حالی که SA سبب تعدیل این اثرات گردید. در گیاهان تیمار شده با نیکل، سطح فعالیت لیپوکسی ژناز (LOX) و مقادیر مالون دی آلدئید (MDA) و H_2O_2 افزایش یافت. به علاوه، تغییرات در فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدان کاتالاز، گایاکول پراکسیداز و سوپراکسید دیسموتاز در برگ‌ها نشان داد که نیکل موجب تنش اکسیداتیو در گیاهان کلزا گردید. افزودن SA به همراه یون‌های نیکل سبب تعدیل فعالیت آنزیم LOX و کاهش مقدار MDA و H_2O_2 گردید. هم چنین SA فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدان را در شرایط تنش نیکل افزایش داد. بنابراین، سالیسیلیک اسید از یک طرف با توقیف نیکل در ریشه‌ها و از طرف دیگر با افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدان تا حد زیادی آسیب‌های اکسیداتیو ناشی از نیکل را کاهش می‌دهد.

کلید واژه: نیکل، تنش اکسیداتیو، آنزیم‌های آنتی اکسیدان، سالیسیلیک اسید، کلزا.

مقدمه

نیکل یکی از فراوان‌ترین آلوده کننده‌های فلز سنگین محیط است(۳۸). این فلز عمدتا توسط فعالیت‌های انسان مانند استخراج معدن، سوزاندن زغال سنگ، به کار گیری فاضلاب، استفاده از کودهای فسفاته و آفت کش‌ها وارد محیط زیست می‌گردد(۱۳). نیکل در غلظت‌های اضافی برای اکثریت گونه‌های گیاهی سمی می‌باشد و بسیاری از فرایندهای فیزیولوژیکی را تغییر می‌دهد. آشکارترین علائم سمیت نیکل شامل ممانعت رشد، کلروز، نکروز و پژمردگی می‌باشد(۲۷). در سطح سلولی، غلظت‌های بالای نیکل تولید اکسیژن‌های فعال (ROS) مانند O^{-2} و H_2O_2 را تحریک می‌کند(۱۱) و با پراکسیداسیون لیپیدهای غشا تنش اکسیداتیو را القا می‌کند(۳۲، ۲). هم چنین نیکل

www.SID.ir

Archive of SID

با فعال نمودن آنزیم لیپوکسی ژناز(LOX) نیز می‌تواند موجب پراکسیداسیون لیپیدهای غشایی گردد (۳۱) که یک عامل مهم ممانعت رشد در گیاهان تحت تنش فلزات سنگین از جمله نیکل می‌باشد(۳). اما سلول‌های گیاهی برای حفاظت در مقابل آسیب‌های اکسیداتیو مجهز به یک سیستم جاروب کننده رادیکال‌های آزاد می‌باشند. این سیستم شامل آنزیم‌های آنتی اکسیدان مانند کاتالاز، پراکسیداز و سوپراکسید دیسموتاز و نیز سیستم غیرآنزیمی مانند گلوتاتیون و آسکوربات می‌باشند(۲۴). بررسی‌ها نشان می‌دهد که غلظت‌های نیکل اضافی فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدان را تحت تاثیر قرار می‌دهد (۲،۵)، اما نتایج مربوط به تاثیر نیکل روی این آنزیم‌ها متفاوت هستند از آن جا که هر دو تحریک (۲) و ممانعت (۵،۲۷) در فعالیت‌های آن‌ها یافت شده است. سالیسیلیک اسید (SA) یک مولکول سیگنال مهم در گیاهان است و تحمل گیاه به تنش‌های زیستی و غیرزیستی مختلف را القا می‌کند(۱۷). گزارش شده است که کاربرد SA اگزوژن اثرات مضر فلزات سنگین مانند کادمیوم(۲۲)، سرب و جیوه را بهبود می‌بخشد(۲۳). هم چنین SA نقش مهمی در تنظیم تعدادی از فرآیندهای فیزیولوژیکی در گیاهان ایفا می‌کند مانند تاثیرات روی رشد و نمو، جذب و انتقال یون و نفوذپذیری غشا(۳۰). به علاوه، SA اگزوژن روی سرعت تولید انواع اکسیژن فعال (ROS) تحت شرایط تنش تاثیر می‌گذارد و فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدان مانند کاتالاز، پراکسیداز و سوپراکسید دیسموتاز را تغییر می‌دهد و از این طریق تحمل گیاه به تنش‌های غیرزیستی را افزایش می‌دهد(۱۷). اماSA اثرات مختلفی روی سازگاری تنش و هم چنین گسترش آسیب در گیاهان دارد که بستگی به گونه گیاهی، غلظتSA، روش و زمان استعمال SA دارد(۲۲).کلزا جزء گیاهان تیره شب بو می‌باشد که در مناطق مختلفی از ایران کشت می‌شود و به عنوان یکی از مهم ترین گیاهان روغنی ایران و جهان محسوب می‌شود. پژوهش‌های انجام یافته نشان می‌دهد که این گیاه مقاومت کمتری نسبت به تنش فلزات سنگین نشان می‌دهد اما برخی از گونه‌های گیاهی این تیره مثل *Allysum* و *Thlaspi* مقاومت بیشتری نسبت به تنش فلزات سنگین به ویژه نیکل داشته و به عنوان انباشتگرهای فلز سنگین در فرایند گیاه پالایی خاک‌های آلوده به فلزات سنگین مورد استفاده قرار می‌گیرند(۳۶). در سال‌های اخیر، اطلاعات کافی در مورد تعدیل سمیت نیکل در گیاهان وجود ندارد و هدف از این پژوهش حاضر بررسی سمیت نیکل در گیاهان کلزا و نقش حفاظت احتمالی SA برون‌زا در برابر تنش اکسیداتیو ناشی از نیکل می‌باشد.

مواد و روش‌ها

کشت گیاه و تیماردهی

بذرهای سالم کلزا (*Brassica napus* L. cv. PF) با محلول هیپوکلریت سدیم ۲٪ برای مدت ۵ دقیقه سترون و سپس چندین مرتبه با آب مقطر استریل شسته شدند. جوانه زنی بذرها در ظروف پتری محتوی کاغذ صافی مرطوب و سترون به مدت چهار روز صورت گرفت. دانه رست‌های با اندازه یکسان انتخاب و به گلدان‌های پلاستیکی محتوی پرلیت سترون منتقل شدند و با محلول هوگلند رقیق (۱:۲v/v) به مدت یک هفته آبیاری شدند .سپس آبیاری دانه رست‌ها با محلول هوگلند کامل صورت گرفت. گیاهان ۲۱ روزه به محلول‌های غذایی جدید با غلظت‌های مختلف نیکل (Ni) و سالیسیلیک اسید (SA) انتقال یافتند. نیکل به صورت $NiCl_2 . 6H_2O$ در غلظت‌های ۰، ۰/۵ و۱ میلی مولار و سالیسیلیک اسید (SA) در غلظت‌های ۰ و ۰/۲ میلی مولار اضافه گردید. تنظیم pH محلول غذایی در ۶/۵ و تعویض آن دو بار در هفته صورت می گرفت و گیاهان در شرایط تنظیم شده با طول روز ۱۶ ساعت و شدت نور۱۹۰ میکرومول فوتون در متر مربع در ثانیه و تناوب دمایی ۲۶/۲۲ درجه سانتی‌گراد (شب/روز) و رطوبت نسبی ۵ ±۶۵٪ به مدت ده روز رشد یافتند. پس از سپری شدن دوره تیمار، برداشت گیاهان انجام شد. ریشه‌ها و اندام‌های هوایی از یکدیگر جدا شده و با آب

www.SID.ir

Archive of SID

مقطر بدون یون شسته شدند. نمونه‌های مورد استفاده برای تعیین رشد گیاهی و سنجش نیکل در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد خشک شدند و مواد تازه گیاهی به منظور اندازه‌گیری فعالیت آنزیمی پس از قرار گرفتن در نیتروژن مایع در ۷۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

اندازه گیری نیکل

عمل عصاره گیری و هضم ریشه‌ها و اندام‌های هوایی با کمک مخلوط اسیدی HNO_3:HCl (۵:۱ v/v) صورت گرفت. غلظت نیکل به وسیله اسپکتروسکوپی جذب اتمی (SpectrAA-200, Varian, Australia) تعیین گردید(۳۳).

اندازه گیری کلروفیل

۲/۰ گرم از برگ‌های جوان گیاه با استن ۸۰٪ همگن و صاف گردید و سپس حجم نهایی عصاره به ۲۰ میلی لیتر رسانده شد. مقدار کلروفیل با تعیین جذب عصاره در طول موج‌های ۶۴۵ و ۶۶۳ نانومتر و با استفاده از فرمول Lichtenthaler محاسبه گردید(۱۹).

اندازه گیری مقدار پراکسید هیدروژن (H_2O_2)

برای تعیین غلظت H_2O_2، ۰/۲ گرم از بافت برگی با ۳ میلی لیتر تری کلرو استیک اسید (TCA) ۰/۱ درصد در یک هاون چینی و محیط یخ سائیده شد و عصاره در ۱۲۰۰۰g به مدت ۱۵دقیقه سانتریفوژ گردید. ۰/۵ میلی‌لیتر از مایع رویی به ۰/۵ میلی‌لیتر از بافر فسفات (pH=۷) و ۱ میلی‌لیتر یدید پتاسیم (KI) یک مولار اضافه گردید. جذب مخلوط در طول موج ۳۹۰ نانومتر خوانده شد و مقدار H_2O_2 با استفاده از ضریب خاموشی ۰/۲۸ $\mu M^{-1}cm^{-1}$ محاسبه و برحسب میکرومول بر گرم وزن تر بیان گردید(۳۷).

تعیین پراکسیداسیون لیپید

پراکسیداسیون لیپید در بافت برگی با اندازه‌گیری مالون دی آلدئید (MDA) تعیین گردید. ۰/۲گرم از بافت برگی در ۳ میلی لیتر TCA ۰/۱ درصد سائیده شد و محلول همگن در ۱۰۰۰۰g به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ گردید. به ۱ میلی لیتر از مایع رویی ۴ میلی لیتر از محلول TCA ۲۰٪ 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 گردید و دوباره مخلوط به مدت ۵ دقیقه در ۱۰۰۰۰g سانتریفوژ گردید. میزان جذب این محلول در طول موج ۵۳۲ نانومتر تعیین و مقدار جذب غیر اختصاصی در ۶۰۰ نانومتر از آن کسر گردید. برای محاسبه غلظت MDA از ضریب خاموشی معادل ۱۵۵ $mM^{-1}cm^{-1}$ استفاده شد و بر حسب میکرومول بر گرم وزن تر بیان گردید(۱۶).

استخراج عصاره آنزیمی

۵/۰ گرم از بافت‌های تر گیاهی در۵ میلی لیتر بافر فسفات پتاسیم (۵۰ mM و pH= ۷/۵) حاوی پلی وینیل پیرولیدین (PVP) ۱درصد، Na_2-EDTA ۱ میلی مولار سائیده شد. تمام مراحل استخراج در یخ انجام گرفت. سپس عصاره‌ها به مدت ۳۰ دقیقه در ۱۵۰۰۰g و در دمای ۴ درجه سانتی گراد سانتریفوژ شدند. سنجش‌های آنزیمی در مایع رویی با استفاده از اسپکتروفتومتر (Shimadzu UV-2101 PC) و در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد انجام پذیرفت. مقدار پروتئین در هر نمونه با روش Bradford مورد ارزیابی قرار گرفت(۶).

سنجش‌های آنزیمی

سنجش فعالیت آنزیم کاتالاز (CAT)

بررسی میزان فعالیت کاتالاز با بررسی کاهش مقدار H_2O_2 در ۲۴۰ نانومتر برای یک دقیقه انجام شد. مخلوط واکنش شامل بافر فسفات پتاسیم ۱۰۰ میلی مولار (pH=۷) و ۱۵ H_2O_2 میلی مولار و ۵۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی در یک حجم ۳ میلی لیتر بود. میزان فعالیت آنزیم با استفاده از ضریب خاموشی معادل ۳۹/۴ $mM^{-1}cm^{-1}$ محاسبه و بر حسب یک واحد (میکرومول پراکسید هیدروژن مصرف شده در دقیقه) به ازای میلی گرم پروتئین بیان گردید(۱).

www.SID.ir

Archive of SID

سنجش فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز (GPX)

فعالیت آنزیم پراکسیداز بر اساس روش Polle و همکاران (۱۹۹۴) اندازه گیری شد(۲۸). در این روش ۳ میلی لیتر مخلوط واکنش حاوی بافر فسفات پتاسیم ۱۰۰ میلی مولار (pH=۷)، گایاکول ۲۰ میلی مولار، H_2O_2 ۱۰ میلی مولار و ۵۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی بود. افزایش جذب به دلیل اکسیداسیون گایاکول در طول موج ۴۷۰ نانومتر به مدت ۳ دقیقه اندازه گیری شد. در نهایت فعالیت آنزیم پراکسیداز با استفاده از ضریب خاموشی معادل $mM^{-1}cm^{-1}$ ۲۶/۶ محاسبه و بر حسب یک واحد (میکرومول تتراگایاکول تولید شده در دقیقه) به ازای میلی گرم پروتئین بیان گردید.

سنجش فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز (SOD)

فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز بر اساس روش Giannopolitis و همکارانش(۱۹۷۷) اندازه‌گیری شد (۱۲). در این روش بازدارندگی آنزیم SOD از احیا نوری نیتروبلوتترازولیوم (NBT)، اساس اندازه‌گیری فعالیت این آنزیم است. بر اساس این روش ۳ میلی لیتر مخلوط واکنش حاوی بافر فسفات پتاسیم ۵۰ میلی مولار (pH=۷/۸)، متیونین ۱۳ میلی مولار، نیتروبلوتترازولیوم ۷۵ میکرومولار، ریبوفلاوین ۲۰ میکرومولار، EDTA ۰/۱ میلی مولار و ۱۰۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی بود. واکنش با برداشتن فویل آلومینیومی و قرار دادن نمونه‌ها در مقابل نور (۵۰۰۰ LUX) شروع می شود. پس از ۱۵ دقیقه نور قطع شده و بلافاصله جذب نمونه‌ها در ۵۶۰ نانومتر خوانده شد. در این آزمایش دو نمونه شاهد مورد استفاده قرار می گیرد که هر دو بدون عصاره آنزیمی بوده، نمونه اول بدون دریافت نور و نمونه دوم ۱۵دقیقه در مقابل منبع نوری قرار می گیرد. یک واحد فعالیت آنزیمی مقداری از آنزیم است که موجب ۵۰ درصد ممانعت احیای NBT در ۵۶۰ نانومتر می‌شود. میزان فعالیت آنزیم بر حسب یک واحد در دقیقه به ازای میلی گرم پروتئین محاسبه گردید.

سنجش فعالیت آنزیم لیپوکسی ژناز (LOX)

فعالیت آنزیم لیپوکسی ژناز بر اساس روش Doderer و همکاران (۱۹۹۲) اندازه گیری شد(۹) .در این روش محلول سوبسترا با افزودن ۳۵ میکرولیتر لینولئیک اسید به ۵ میلی لیتر آب مقطر محتوی ۵۰ میکرولیتر Tween-02 تهیه گردید. با افزودن سود (NaOH) ۰/۲مولار، pH محلول در ۹ تنظیم گردید تا همه لینولئیک اسید حل گردد و pH ثابت بماند. سپس با افزودن HCl ۲/۰ مولار pH محلول به ۶/۵ تنظیم شد و با بافر فسفات ۰/۱ مولار (pH=۶/۵)به حجم کلی ۱۰۰ میلی لیتر رسانده شد. فعالیت LOX با افزودن ۵۰ میکرو لیتر عصاره آنزیمی به ۲/۹۵ میلی لیتر سوبسترا تعیین گردید. جذب محلول در طول موج ۲۳۴ نانومتر ثبت و فعالیت آنزیم بر حسب یک واحد (میکرو مول سوبسترا اکسید شده در دقیقه) به ازای میلی گرم پروتئین محاسبه شد.

تحلیل آماری

این پژوهش در سال ۱۳۸۸ در مجتمع آزمایشگاهی واحد علوم و تحقیقات دانشگاه آزاد اسلامی در قالب یک طرح کاملا تصادفی به صورت آزمایش فاکتوریل با دو عامل نیکل در سه سطح و سالیسیلیک اسید در دو سطح با حداقل چهار تکرار انجام گرفت. تجزیه و تحلیل آماری تمام داده‌های حاصل از آزمایش‌های متفاوت با استفاده از نرم افزار SPSS-16 انجام پذیرفت. میانگین شاخص‌های اندازه گیری شده با استفاده از آزمون دانکن گروه بندی شدند.

نتایج

علائم سمیت نیکل از جمله کلروز و لکه‌های نکروزه در سطح برگ‌ها در تیمارهای فاقد سالیسیلیک اسید مشاهده شد. در حالی که در تیمارهای دارای SA این علائم به ویژه در غلظت ۰/۵ میلی مولار نیکل به طور قابل توجهی کاهش یافت. افزودن SA به محیط غذایی اثرات سمی نیکل را به طور قابل توجهی کاهش داد. اثرات

www.SID.ir

Archive of SID

بازدارندگی نیکل بر رشد گیاه از کاهش شدید وزن خشک ریشه و اندام هوایی مشهود بود. اما سالیسیلیک اسید به طور قابل توجهی کاهش رشد گیاهان تحت تیمار نیکل را تعدیل نمود. مقدار نیکل در بافت‌های گیاهی با بالا رفتن غلظت آن در محیط کشت افزایش یافت. البته تجمع نیکل در ریشه‌ها بیش از اندام‌های هوایی بود (جدول ۱). با کاربرد SA در گیاهان تحت تنش نیکل مقدار نیکل در ریشه‌ها افزایش و در اندام‌های هوایی به طور قابل توجهی کاهش یافت. مقادیر موجود در جدول خطای استاندارد ± میانگین می‌باشند. آزمایش‌ها در چهار تکرار انجام شده است. در هر ستون میانگین‌های با حروف غیرمشابه از نظر آماری($p< ۰/۰۵$) اختلاف معنی دار نشان می‌دهند.

در هر دو تیمار نیکل مقدار کلروفیل کل کاهش پیدا کرد. در حالی که کاربرد سالیسیلیک اسید به همراه یون‌های نیکل سبب شد که مقدار کلروفیل در این تیمارها به طور معنی داری افزایش یابد(جدول ۲). برای بررسی فرضیه‌ای که مقدار نیکل اضافی می تواند تنش اکسیداتیو را القا کند مقدار MDA و فعالیت LOX به عنوان شاخص‌های تنش اکسیداتیو اندازه گیری شدند. همان طوری که در جدول ۲ مشاهده می‌شود، در هر دو

جدول ۱- اثرات نیکل و سالیسیلیک اسید برمیزان تجمع نیکل و وزن خشک در ریشه و اندام هوایی گیاه کلزا

SA (میلی مولار)	Ni (میلی مولار)	مقدار نیکل در ریشه (میلی گرم بر گرم وزن تر گیاه)	مقدار نیکل در اندام هوایی (میلی گرم بر گرم وزن تر گیاه)	وزن خشک ریشه (میلی گرم)	وزن خشک اندام هوایی (میلی گرم)
۰	۰	۰/۰۰۷d	۰/۰۰۲e	۳۰/۴۷۵ ± ۰/۷۸۲ a	۲۳۵/۴۰ ± ۳/۸۵۷b
	۰/۵	۱۵/۱۲۶ ± ۰/۶۸۸ c	۳/۲۹۸ ± ۰/۳۱۵ c	۱۳/۰۵۰ ± ۰/۴۴۶ c	۱۱۲/۷۲ ± ۳/۱۱۸ e
	۱	۱۸/۷۰۵ ± ۰/۷۵۱b	۷/۷۸۸ ± ۰/۴۲۳ a	۹/۴۳۲ ± ۰/۳۲۵ d	۹۲/۴۹۵ ± ۱/۷۳۷ f
۰/۲	۰	۰/۰۰۷d	۰/۰۰۲e	۳۱/۴۰ ± ۰/۷۳۸ a	۲۴۹/۷۰ ± ۴/۴۲۱a
	۰/۵	۱۶/۷۵۲ ± ۰/۶۷۱ c	۱/۸۴۲ ± ۰/۱۷۲d	۱۹/۲۲۷ ± ۰/۳۶۵ b	۱۶۲/۱۲ ± ۴/۴۹۱ c
	۱	۲۱/۹۲ ± ۰/۸۸۶ a	۴/۹۶۱ ± ۰/۲۱۴b	۱۳/۹۵ ± ۰/۳۳۶c	۱۲۸/۷۵± ۲/۰۶۵ d

جدول ۲- اثرات نیکل و سالیسیلیک اسید بر مقدار کلروفیل کل، مالون دی آلدئید (MDA) و H_2O_2 در برگ‌های گیاهان کلزا

SA (mM)	Ni (mM)	مقدار کلروفیل کل (mg g^{-1} FW)	مقدار مالون دی آلدئید (µmol g^{-1} FW)	مقدار آب اکسیژنه (µmol g^{-1} FW)
۰	۰	۱/۸۵۶ ± ۰/۰۵۶ a	۱/۷۸۲ ± ۰/۱۲۷ e	۱۷/۸۵ ± ۰/۶۳۱ e
	۰/۵	۰/۷۲۴ ± ۰/۰۴۲ cd	۵/۵۸ ± ۰/۳۰۳ c	۴۱/۳۵۸ ± ۱/۲۷۸ c
	۱	۰/۵۸۹ ±۰/۰۳۵ d	۸/۴۴۷ ± ۰/۲۳۵ a	۶۳/۶۶۶ ± ۱/۴۱۸ a
۰/۲	۰	۱/۷۸۱ ± ۰/۰۶۶ a	۱/۶۲۲ ± ۰/۱۲۸ e	۱۷/۲۰۷ ± ۰/۶۳۵ e
	۰/۵	۱/۰۱۱ ± ۰/۰۵۱ b	۳/۵۱۷ ± ۰/۱۸۸d	۳۰/۴۵۱ ± ۱/۳۰۸ d
	۱	۰/۷۷۴ ± ۰/۰۴۷ c	۶/۵۶۷ ± ۰/۱۹۴b	۵۵/۴۹۱ ± ۱/۴۳۶b

www.SID.ir

Archive of SID

غلظت نیکل، میزان MDA در برگ‌ها به شدت افزایش یافته است. کاهش MDA در تیمارهای دارای SA بیان گر نقش حفاظتی سالیسیلیک اسید بر غشاهای سلولی می‌باشد. افزایش MDA در تیمارهای نیکل می‌تواند ناشی از افزایش فعالیت آنزیم LOX باشد. فعالیت این آنزیم در هر دو تیمار نیکل به طور معنی دار افزایش یافت. در حالی که سالیسیلیک اسید سبب تعدیل فعالیت این آنزیم در تیمارهای نیکل شده است(جدول ۳). نتایج نشان می دهد که در هر دو تیمار نیکل مقدار H_2O_2 در برگ‌ها در مقایسه با گیاهان کنترل به طور معنی داری افزایش یافت در حالی که کاربرد SA تجمع H_2O_2 را در گیاهان تحت تنش نیکل به طور معنی داری کاهش داد(جدول ۲). در این پژوهش آنزیم‌های CAT، GPX وSOD جهت بررسی آسیب‌های اکسیداتیو ناشی از نیکل بر سیستم آنزیمی انتخاب شدند. فعالیت آنزیم‌های CAT و GPXدر برگ‌ها با افزایش غلظت نیکل به طور قابل توجهی کاهش یافت(جدول ۳). در حالی که فعالیت آنزیم SOD در غلظت پایین نیکل به طور معنی دار افزایش و در غلظت بالای نیکل فعالیت این آنزیم به طور معنی داری کاهش یافت. کاربرد SA به همراه هر دو تیمار نیکل موجب افزایش معنی دار فعالیت هر سه آنزیم گردید(جدول ۳).

مقادیر موجود در جدول خطای استاندارد ± میانگین می‌باشند. آزمایش‌ها در چهار تکرار انجام شده است. در هر ستون میانگین‌های با حروف غیرمشابه از نظر آماری($p< ۰/۰۵$) اختلاف معنی دار نشان می‌دهند.

جدول ۳- اثرات نیکل و سالیسیلیک اسید بر میزان فعالیت آنزیم‌های لیپوکسی ژناز (LOX)، کاتالاز (CAT)، گایاکول پراکسیداز (GPX) و سوپراکسید دیسموتاز (SOD) در برگ‌های گیاهان کلزا

SA (میلی مولار)	Ni (میلی مولار)	لیپوکسی ژناز (Unit mg^{-1}protein)	کاتالاز (Unit mg^{-1}protein)	گایاکول پراکسیداز (Unit mg^{-1}protein)	سوپراکسید دیسموتاز (Unit mg^{-1}protein)
۰	۰	۰/۱۶۸ ± ۰/۰۱۵ d	۵/۴۳۸ ± ۰/۳۳۵ a	۷/۰۷ ± ۰/۳۲ a	۷۶/۳۸۹ ± ۲/۳۴۹c
	۰/۵	۰/۵۷۹ ± ۰/۰۱۹ b	۳/۷۴۸ ± ۰/۱۴۶ c	۳/۷۹۸ ± ۰/۱۳۴ c	۹۵/۳۸۷± ۳/۵۸۱ b
	۱	۰/۸۶ ± ۰/۰۳۵a	۲/۴۰۹ ± ۰/۱۱۹ e	۲/۷۴۵ ± ۰/۱۹۲ d	۶۱/۶۲۸ ± ۱/۶۳۴d
۰/۲	۰	۰/۱۵۳ ± ۰/۰۱۳ d	۴/۹۳۱ ± ۰/۲۸۲ ab	۷/۴۴۲± ۰/۳۹ a	۷۰/۱۳۳ ± ۲/۸۹۱c
	۰/۵	۰/۳۲۷ ± ۰/۰۲ c	۴/۶۶۵ ± ۰/۱۲۶b	۶/۶۴۵ ± ۰/۲۷۹ a	۱۱۰/۳۵۸ ± ۲/۷۴۱ a
	۱	۰/۶۳۲ ± ۰/۰۱۷ b	۳/۱۲۹ ± ۰/۱۸۳d	۴/۹۰۳ ± ۰/۱۴۸b	۷۴/۲۸۱± ۱/۳۸ c

بحث و نتیجه گیری

علائم سمیت نیکل مانند کلروز و لکه‌های نکروز به طور قابل ملاحظه‌ای در گیاهان کلزا تیمار شده با نیکل مشاهده شد. محققین مختلف کاهش مقدار کلروفیل را در برگ‌های گیاهان تیمار شده با نیکل گزارش کرده‌اند(۳۶، ۳۲، ۲۷). این حالت کلروز در گیاهان تحت تنش نیکل نتیجه‌ای از کمبود آهن و منیزیم و ممانعت سنتز کلروفیل می‌باشد(۳۶). در تحقیق حاضر، کلروز برگ‌ها، کاهش در مقدار کلروفیل و کاهش وزن خشک ریشه و اندام هوایی مشاهده گردید. تاثیر بازدارنده نیکل روی رشد گیاه توسط چندین محقق گزارش شده است(۳۲، ۲۷، ۱۱). در گیاهان تیمار شده مقادیر بالای نیکل در ریشه‌ها و برگ‌ها تجمع یافت. نیکل با تجمع در دیواره سلول موجب کاهش انعطاف پذیری دیواره‌های سلول می گردد

www.SID.ir

Archive of SID

و تکثیر سلول را مختل می‌کند و در نتیجه موجب کاهش رشد می‌گردد. هم چنین غلظت‌های بالای نیکل، اثرات منفی بر روی برخی فرآیندهای متابولیکی کلیدی مرتبط با رشد در گیاهان دارد(۳۶). نیکل به طور مشابه با فلزات سنگین دیگر تولید انواع اکسیژن فعال (ROS) را در گیاهان القا می‌کند(۱۱، ۵). افزایش در مقدار H_2O_2 در پاسخ به تنش نیکل در تارهای کشنده قدومه(۵) و برگ‌های گندم(۱۱) یافت شده است. در بررسی حاضر گیاهان کلزا با افزایش مقدار H_2O_2 در برگ‌ها به تیمار نیکل پاسخ دادند. پیشنهاد شده است که H_2O_2 یک نقش مهمی در ممانعت رشد گیاهان تحت تنش فلز سنگین ایفا می‌کند(۷) و به عنوان سوبسترا برای پراکسیدازها در سخت کردن دیواره‌های سلول شرکت می‌کند که منجر به محدودیت طویل شدن سلول می‌گردد. هم چنین، H_2O_2 بر تکثیر سلول‌ها تاثیر منفی دارد(۳۵). در گیاهان کلزا تنش اکسیداتیو ناشی از نیکل اضافی مشهود بود به خاطر این که پراکسیداسیون لیپیدهای غشا در برگ‌ها افزایش یافت. در مقایسه با گیاهان کنترل، تیمار نیکل در غیاب SA موجب افزایش فعالیت LOX و مقدار MDA گردید. این نتایج در مقایسه با گزارش محققین دیگر در ریشه‌ها و برگ‌های گیاهان سویا هستند(۳۲). طبق گزارش، افزایش فعالیت LOX تحت شرایط تنش منجر به اکسیداسیون اسیدهای چرب متصل به غشا و انتشار پراکسیداسیون لیپیدها می‌گردد(۲۶). هم چنین، تجمع بالای H_2O_2 در این شرایط با تحریک واکنش Haber-Weiss و تولید رادیکال‌های هیدروکسیل موجب پراکسیداسیون لیپیدها و آسیب‌های غشایی می‌گردد(۲۵) که در نهایت به کاهش رشد گیاه نیز منجر می‌شود. علاوه بر این، پیشنهاد شده است که فلزات سنگین غیر احیایی از جمله نیکل به طور غیر مستقیم با کاهش کارآیی سیستم آنتی اکسیدان، تنش اکسیداتیو را القا می‌کنند(۵). در پژوهش حاضر، هردو تیمار نیکل فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدان (CAT وGPX) را کاهش داد و تنش اکسیداتیو را القا کرد. در بیشتر بررسی‌های مربوط به تاثیر نیکل روی گیاهان، کاهش فعالیت کاتالاز گزارش شده است(۲۷، ۳۲و۵) اما اطلاعات مربوط به تاثیر تیمار نیکل روی فعالیت‌های GPX و SOD در گیاهان متناقض هستند به خاطر این که هر دو تحریک(۲) و ممانعت(۵) فعالیت این آنزیم‌ها گزارش شده است. آنزیم‌های CATو GPX محتوی آهن در ساختارشان هستند. از آن جا که غلظت‌های بالای نیکل، نشان داده شده که مقدار آهن را در بافت‌های گیاهی کاهش می‌دهد(۲۷) احتمالا، کاهش در فعالیت‌های این آنزیم‌ها در برگ‌های گیاهان کلزا تحت تنش نیکل، نتیجه‌ای از کمبود آهن برای بیوسنتز این مولکول‌های آنزیمی می‌باشد. هم چنین کاهش در فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدان ممکن است به علت اختلال مولکول‌های آنزیم توسط اکسیژن‌های فعال (ROS) باشد(۳۴). در این پژوهش، غلظت پایین نیکل موجب افزایش فعالیت SOD و غلظت بالای نیکل موجب کاهش فعالیت این آنزیم گردید. افزایش فعالیت SOD در غلظت پایین نیکل، نقش حفاظتی این آنزیم را در برابر تنش اکسیداتیو و انواع اکسیژن فعال نشان می‌دهد. اما کاهش فعالیت این آنزیم توسط غلظت بالای نیکل احتمالا به خاطر این است که نیکل جذب مس و روی را که کوفاکتورهای این آنزیم هستند، مختل می‌نماید(۲۷).

نتیجه جالب توجه این است که گیاهان تیمار شده با SA، مقدار نیکل کمتری نسبت به گیاهان دیگر در اندام هوایی انباشته کردند. غلظت پایین نیکل در اندام‌های هوایی این گیاهان به علت کاهش جذب نیکل و یا کاهش انتقال نیکل می‌باشد. به علت این که هیچ اختلافی در مقدار نیکل ریشه گیاهان کنترل و گیاهان تیمار شده با SA وجود ندارد، بنابراین SA احتمالا بر روی جذب نیکل توسط ریشه‌ها تاثیر نمی‌گذارد. پیشنهاد می‌شود که SA انتقال نیکل را از ریشه به اندام هوایی کاهش داده و در نتیجه تجمع نیکل در اندام‌های هوایی کاهش یافته است. در بررسی حاضر وقتی SA به طور هم زمان با

www.SID.ir

Archive of SID

یون‌های نیکل به کار رفت، این ماده فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدان (GPX، CAT و SOD) را افزایش داد و فعالیت LOX و مقدار MDA و H_2O_2 را کاهش داد. Rao و همکارانش در سال ۱۹۹۷ گزارش کردند که SA به عنوان یک مولکول سیگنال، سیستم آنتی اکسیدان را با ممانعت کاتالاز و تحریک پراکسیدازها تغییر می‌دهد(۲۹). در تحقیق ما، فعالیت آنزیم کاتالاز در گیاهان تیمار شده با SA تنها تا اندازه‌ای کاهش یافت اما حضور SA در گیاهان تحت تنش نیکل فعالیت آنزیم کاتالاز را افزایش داد. بررسی‌های مشابهی مربوط به افزایش فعالیت پراکسیداز و سوپراکسید دیسموتاز به وسیله پیش تیمار با SA در گیاهان برنج تحت تنش کادمیوم گزارش شده است(۱۴و۱۵). پیشنهاد شده که تحریک آنتی اکسیدان‌ها ممکن است به خاطر تحریک سنتز پروتئین توسط SA حاصل شود(۲۱). هم چنین SA به عنوان یک مولکول سیگنال با تغییر فعالیت آنزیم‌های متابولیزه کننده H_2O_2 در تنظیم سطوح H_2O_2 شرکت می‌کند(۸). در بررسی حاضر تیمار با SA فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدان را افزایش داد و سطح H_2O_2 را در برگ‌ها کاهش داد. در مقایسه با بررسی حاضر، SA اگزوژن فعالیت LOX و مقدار MDA را در گیاهان برنج تحت تنش سرب و جیوه کاهش داد و آسیب غشایی القا شده را بهبود بخشید(۲۳). مکانیسم عمل SA ممکن است به علت ممانعت تشکیل اتیلن باشد و به خاطر ارتباطی که بین فعالیت LOX القا شده توسط فلز و تشکیل اتیلن وجود دارد(۴). به علاوه، SA با عمل کلات کردن فلزات(۱۷) مقدار MDA را در گیاهان تحت تنش فلز سنگین کاهش می‌دهد. بنابراین SA در تثبیت غشاهای سلول شرکت می‌کند(۲۳) و با افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدان در برگ‌ها منجر به تعدیل آسیب اکسیداتیو می‌گردد به طوری که با کاهش مقادیر H_2O_2 و MDA نشان داده شده است. مشاهده شد که SA، سمیت نیکل روی رشد و مقدار کلروفیل را کاهش می‌دهد. در مقایسه با بررسی ما، گزارش شده که SA دستگاه فتوسنتزی را تحریک می‌کند و مقدار کلروفیل و رشد گیاهان آفتابگردان تحت تنش مس را افزایش می‌دهد(۱۰). به علاوه، SA در تنظیم بزرگ شدن سلول و تقسیم در سینرژی در طول نمو گیاه دخالت می‌کند(۱۸). مهم ترین نتیجه به دست آمده از این تحقیق، کاهش انتقال نیکل از ریشه به اندام‌های هوایی در تیمارهای دارای SA بود. به این ترتیب سالیسیلیک اسید با مهار نیکل در ریشه‌ها و جلوگیری از انتقال آن به اندام‌های هوایی از بروز علائم سمیت نیکل در بخش‌های هوایی گیاه می‌کاهد. بنابراین سالیسیلیک اسید علاوه بر افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدان با جلوگیری از انتقال نیکل به اندام‌های هوایی نیز موجب کاهش قابل ملاحظه آسیب‌های اکسیداتیو ناشی از تجمع نیکل در گیاه کلزا می‌شود. با توجه به این که اغلب گیاهان بردبار به عناصر سنگین مقدار زیادی از یون‌های فلزی را در ریشه‌های خود انباشته می‌کنند و باقی ماندن عناصر سنگین در ریشه‌ها، به ویژه در گونه‌هایی از گیاهان زراعی که ریشه آن‌ها مورد استفاده انسان قرار نمی‌گیرد، یکی از اهداف مهم بسیاری از پژوهش‌های حال حاضر دنیا محسوب می‌شود(۲۰)، بنابراین نتایج حاصل از این تحقیق حائز اهمیت خواهد بود.

منابع

1. Aebi, H. (1984). Catalase in vitro. Methods Enzymol, 105; 121-126.

2.Baccouch ,S., Chaoui, A., El Ferjani ,E. (1998). Nickel-induced oxidative damage and antioxidant responses in Zea mays shoots. Plant Physiol. Biochem,36(9); 689-694.

3.Baccouch, S., Chaoui ,A., El Ferjani, E. (2001). Nickel toxicity induces oxidative damage in Zea mays roots. J Plant Nutr, 24(7); 1085-1097.

4.Bhattacharjee, S. (1997/98). Membrane lipid peroxidation, free radical scavengers and

www.SID.ir

Archive of SID

ethylene evolution in *Amaranthus* as affected by lead and cadmium. Biol Plant,40(1); 131-135.

5.Boominathan, R, Doran ,P.M. (2002). Ni-induced oxidative stress in roots of the Ni hyperaccumulator, Alyssum bertolonii. New Phytol, 156(2);205-215.

6.Bradford, M.M. (1976). A rapid sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem, 72(1-2);248-254.

7.Chen,L.M., Lin, C.C., Kao, C.H. (2000). Copper toxicity in rice seedlings: Changes in antioxidative enzyme activities, H2O2 level, and cell wall peroxidase activity in roots. Bot Bull Acad Sin,41(2); 99-103.

8.Chen, Z., Silva, H., Klessig, D.F. (1993). Active oxygen species in the induction of plant systematic acquired resistance by salicylic acid. Science,262(5141);1883-1886.

9.Doderer, A., Kokkelink, I., Van der Veen, S., Valk, B., Schram ,A., Douma, A. (1992). Purification and characterization of two lipoxygenase isoenzymes from germinating barley. Biochim Biophys Acta,1120(1); 97-104.

10. El-Tayeb, M.A., El-Enany, A.E., Ahmed, N.L. (2006). Salicylic acid-induced adaptive response to copper stress in sunflower (*Helianthus annuus L.*). Plant Growth Regul,50(2-3);191-199.

11. Gajewska, E., Sklodowska ,M. (2007). Effect of nickel on ROS content and antioxidative enzyme activities in wheat leaves. BioMetals,20(1);27-36.

12. Giannopolitis, C.N., Ries, S.K. (1977). Superoxide dismutase. I. Occurrence in higher plants. Plant Physiol,59;309-314.

13. Gimeno-Garcia, E., Andreu, V., Boluda, R. (1996). Heavy metals incidence in the application of inorganic fertilizers and pesticides to rice farming soil. Environ Pollut,92(1); 19-25.

14. Guo, B., Liang, Y., Zhu, Y. (2009). Does salicylic acid regulate antioxidant defense system, cell death, cadmium uptake and partitioning to acquire cadmium tolerance in rice? J Plant Physiol, 166(1); 20-31.

15. Guo, B., Liang ,Y.C., Zhu, Y.G., Zhao, F.J. (2007). Role of salicylic acid in alleviating oxidative damage in rice roots (*Oryza sativa*) subjected to cadmium stress. Environ Pollut, 147;743-749.

16. Heath, R.L., Packer, L. (1968). Photoperoxidation in isolated chloroplasts. I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. Arch Biochem. Biophys,125(1);189-198.

17. Horvath, E., Szalai, G., Janda, T. (2007). Induction of abiotic stress tolerance by salicylic acid signaling. J Plant Growth Regul,26(3); 290-300.

18. Li, L. (1995). Effects of resorcinol and salicylic acid on the formation of adventitious roots on hypocotyls cutting of *Vigna radiata*. J Trop Subtrop Bot,3;67-71.

19. Lichtenthaler, H.K. (1987). Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. Methods Enzymol, 148; 350-382.

20. Madhava Rao, K.V., Sresty ,T.V.S. (2000). Antioxidative parameters in the seedling of pigeonpea (*Cajanus cajan* L. Millspaugh) in response to Zn and Ni stresses. Plant Sci,157;113-128.

21. Mazen, A. (2004). Accumulation of four metals in tissues of *Corchorus olitorius* and possible mechanisms of their tolerance. Biol Plant,48(2); 267-272.

22. Metwally, A., Finkemeier, I., Georgi, M., Dietz, K. J. (2003). Salicylic acid alleviates the cadmium toxicity in barley seedlings. Plant Physiol,132(1); 272-281.

www.SID.ir

Archive of SID

23. Mishra, A., Choudhuri, M.A. (1999). Effects of salicylic acid on heavy metal-induced membrane deterioration mediated by lipoxygenase in rice. Biol. Plant,42(3); 409-415.

24. Mittler, R., Vanderauwera, S., Gollery, M., Van Breusegem, F. (2004). Reactive oxygen gene network of plants. Trends Plant Sci,9(10); 490-498.

25. Mittler, R. (2002). Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. Trends Plant Sci,7(9); 405-410.

26. Molassiotis, A., Sotiropoulos, T., Tanou, G., Diamantidis, G., Therios, I.(2006). Boron-induced oxidative damage and antioxidant and nucleolytic responses in shoot tips culture of the Apple rootstock EM9 (*Malus domestica Borkh*). Environ Exp Bot ,56;54-62.

27. Pandey ,N., Sharma,C.P. (2002). Effect of heavy metals Co2+, Ni2+ and Cd2+ on growth and metabolism of cabbage. Plant Sci,163(4); 753-758.

28. Polle, A., Otter, T., Seifert, F. (1994). Apoplastic peroxidases and lignification in needles of Norway spruce (*Picea abies L.*). Plant Physiol,106(1);53-60.

29. Rao, M.V., Paliyath, G., Ormond, P., Murr, D.P., Watkins, C.B. (1997). Influence of salicylic acid on H2O2 production, oxidative stress and H2O2–metabolizing enzymes. Plant Physiol. ,115(1);137-149.

30. Raskin, I. (1992). Role of salicylic acid in plants. Annu. Rev Plant Physiol Plant Mol. Biol, 43;439-463.

31. Rucinska, R., Gwozdz, E.A. (2005) .Influence of lead on membrane permeability and lipoxygenase activity in lupine roots. Biol. Plant, 49(4);617-619.

32. Saeidi-Sar ,S., Khavari-Nejad, R.A., Fahimi, H., Ghorbanli, M., Majd, A. (2007). Interactive effects of Gibberellin A3 and ascorbic acid on lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities in *Glycine max* seedlings under nickel stress. Russ J Plant Physiol,54(1);74-79.

33. Sagner, S., Kneer, P., Wanner, G., Cosson, J.P., Numann, B.D., Zenk ,M.H. (1998). Hyperaccumulation, complexation and distribution of nickel in sebertia acuminata. Phytochemistry,47(3);339-347.

34. Sandalio, L.M., Dalurzo, H.C., Gómez, M., Romero-Puertas ,M.C., del Río, L.A. (2001). Cadmium- induced changes in the growth and oxidative metabolism of pea plants. J Exp Bot,52(364);2115-2126.

35. Santoro, A., Lioi, M.B., Monfregola ,J., Salzano, S., Barbieri, R., Ursini, M.V. (2005). L-Carnitine protects mammalian cells from chromosome aberrations but not from inhibition of cell proliferation induced by hydrogen peroxide. Mutation Res,587(1-2); 16-25.

36. Seregin, I.V., Kozhevnikova, A.D. (2006). Physiological role of nickel and its toxic effects on higher plants. Russ J Plant Physiol,53(2); 257-277.

37. Velikova ,V., Yordanov, I., Edreva, A. (2000). Oxidative stress and some antioxidant systems in acid rain-treated bean plants. Plant Sci, 151(1);59-66.

38. Wo-Niak, K., Basiak, J. (2003). Free radicals-mediated induction of oxidized DNA-bases and DNA protein cross-links by nickel chloride. Mutat Res/Gen Toxicol Environ Mutagen,514 (1-2); 233-243.

www.SID.ir