Archive of SID

اثر سالیسیلیک اسید و آسکوربیک اسید بر محتوای رنگیزه‌های فتوسنتزی و فعالیت برخی آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در گیاه ریحان (*Ocimum basilicum* L.) تحت تنش سرب

سمیه قیصری، فاطمه سعید نعمت‌پور* و اکبر صفی‌پور افشار

نیشابور، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد نیشابور، گروه زیست‌شناسی

تاریخ دریافت: ۹۲/۵/۷ تاریخ پذیرش: ۹۲/۱۲/۱۵

چکیده

آلودگی فلزات سنگین یک مشکل عمده برای مناطق وسیعی از جهان است. سرب یکی از فلزات سنگین با سمیت بالاست که توسط گیاهان عمدتا از طریق ریشه و در مقادیر کم از طریق برگ‌ها جذب می‌شود و پس از ورود به سلول مانع فعالیت بسیاری از آنزیم ها و تأثیر بر ساختار و نفوذپذیری غشاء می شود. هدف از این پژوهش، بررسی اثر غلظت های مختلف سالیسیلیک اسید (SA) و آسکوربیک اسید (AsA) بر محتوای رنگیزه های فتوسنتزی و آنزیم های آنتی اکسیدان گیاه ریحان تحت تنش سرب (Pb) است. بدین منظور آزمایشی به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملا تصادفی با سه تکرار انجام شد. تیمارها ترکیبی از کاربرد سه غلظت سرب (۷۰۰ ppm و ۳۵۰ ، ۰) و دو غلظت SA (۰/۱mM و ۰) و سه غلظت AsA (۲۰۰ ppm و ۱۰۰ ، ۰) بود. نتایج نشان داد که افزایش غلظت سرب باعث کاهش محتوای کلروفیل و کارتنوئیدها و افزایش فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدان (CAT و SOD) شد. از سوی دیگر، استفاده از SA و AsA به تنهایی و همزمان، به میزان قابل توجهی محتوای کلروفیل را افزایش داد و باعث کاهش فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدان شد. به طور کلی، نتایج به دست آمده از این تحقیق نشان داد که کاربرد SA و AsA پارامترهای فیزیولوژیکی گیاه ریحان را بهبود می بخشد.

واژه های کلیدی: آسکوربیک اسید، آنزیم های آنتی اکسیدان، سالیسیلیک اسید، سرب، گیاه ریحان

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۹۱۵۵۲۵۳۹۷۵ ، پست الکترونیکی: fnematpour@yahoo.com

مقدمه

زمین های زراعی در بسیاری از نقاط جهان به فلزات سنگینی مانند سرب، کادمیوم، مس، روی، کروم و آرسنیک آلوده شده اند؛ که این می تواند بدلیل استفاده طولانی‌مدت از کودهای فسفاته، کاربرد پسابهای شهری و صنعتی، گرد و غبارهای کارخانجات باشد (۴۴). سرب یکی از فراوانترین فلزات سنگین و بسیار سمی است. اگرچه سرب یک عنصر ضروری برای گیاهان و حیوانات نمی باشد، ولی هر دو آنها سرب را به راحتی جذب می کنند (۳۹). تجمع فلزات سنگین ازجمله سرب در گیاهان سبب عوارضی همانند کاهش رشد ریشه و ساقه، کاهش فتوسنتز، اختلال در میتوز و شکست کروموزومی می شود (۴۳). اولین پاسخ گیاهان به حضور فلزات سنگین در محیط تولید اکسیژن های واکنشگر (ROS) است که منجر به آسیب های اکسیداتیو مانند پراکسیداسیون لیپیدها و تخریب رنگیزه های فتوسنتزی می شود (۲۹).

گزارش‌های متعددی مبنی بر استفاده از تنظیم کننده های رشد گیاهی در جهت کاهش عوارض ناشی از تجمع فلزات سنگین در گیاهان وجود دارد (۱۸، ۲۲ و ۴۲). یکی از این تنظیم کننده های رشد سالیسیلیک‌اسید یا اورتوهیدروکسی بنزوئیک اسید است که به گروهی از ترکیبات فنلی تعلق داشته و از نام *Salix* (بید) مشتق شده است (۳۰). سالیسیلیک‌اسید نقش مهمی در تعدادی از

www.SID.ir

Archive of SID

فعالیتهای فیزیولوژیک گیاه نظیر کنترل تنفس، بسته شدن روزنه‌ها، جوانه‌زنی دانه، رسیدن میوه، گلیکولیز، گلدهی و تولید گرما ایفا می‌کند (۱۲). سالیسیلیک‌اسید باعث کاهش آثار ناشی از تنشهای زیستی و غیرزیستی مانند خشکی، شوری، گرما، سرما و فلزات سنگین می گردد. این ماده با اثر بر روی متابولیت هایی مانند آسکوربیک اسید (۶)، گلوتاتیون و نیز آنزیمهای آنتی اکسیدان مانند کاتالاز، سوپراکسیددیسموتاز، پلی فنل اکسیداز و پراکسیداز آثار ناشی از تنش می کاهد (۲۹).

از طرفی اسید آسکوربیک نیز یک آنتی اکسیدان مهم است که گیاه را از طریق سرکوب آسیب اکسیداتیو محافظت می‌کند (۴۲). آسکوربات همچنین در تنظیم تقسیم سلولی و فتوسنتز دخیل است. آسکوربات دارای ارزش تغذیه ای برای انسان و احتمالا برای تحمل گیاهان در برابر تنش فتواکسیداتیو مهم است (۴۲ و ۹، ۸). گیاه ریحان (*Ocimumbasilicum* L.) به عنوان سبزی خوراکی در حاشیه بسیاری از شهرها کشت می شود، بنابراین احتمال تجمع فلزات سنگین در آن وجود دارد. همچنین ریحان در طب سنتی نیز مصارف متعددی داشته و برگ های خشک آن معمولا به عنوان طعم‌دهنده بسیاری از مواد غذایی استفاده می‌شود (۱۹). اگرچه در مطالعات متعدد به تأثیر سالیسیلیک اسید به عنوان تنظیم کننده رشد و آسکوربیک اسید به عنوان آنتی اکسیدان بر گیاهان در محیط های آلوده به فلزات سنگین پرداخته شده است اما گزارشی از کاربرد همزمان این دو ترکیب وجود ندارد. بنابراین در تحقیق حاضر اثر متقابل سالیسیلیک اسید و آسکوربیک اسید بر برخی شاخص های فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی گیاه ریحان در حضور فلز سرب بررسی می شود.

مواد و روشها

به منظور بررسی اثر محلول آسکوربیک اسید و سالیسیلیک اسید بر محتوای رنگیزه های فتوسنتزی و آنزیم های آنتی اکسیدان گیاه ریحان در شرایط اعمال تنش سرب، آزمایشی به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملا تصادفی در شرایط گلخانه ای انجام شد. بذرهای گیاه به مدت یک دقیقه در آب ژاول ۱۰ درصد ضدعفونی شده و بعد به مدت ۵ دقیقه با آب مقطر شستشو شدند و داخل گلدان های حاوی شن شسته شده کشت شدند. در ابتدا بذرها با محلول هوگلند (۲۵) ۲۵ درصد به مدت ۱۰ روز آبیاری گردیدند. سپس با هوگلند ۵۰ درصد (به مدت ۷ روز) پس از آن با هوگلند ۷۵ درصد (به مدت ۷ روز) آبیاری شدند. در طی این مدت هر دو روز یک بار شن‌های داخل گلدان ها با آب مقطر شستشو داده می شدند تا از تجمع عناصر هوگلند در داخل شن ها جلوگیری شود. پس از ۲۴ روز از زمان کشت که گیاهان به مرحله ۶ تا ۸ برگی رسیدند، آبیاری آنها با محلول های نیترات سرب ($Pb(NO_3)_2$) با غلظت‌های (۰ ، ۳۵۰ و ۷۰۰ میلی گرم بر لیتر) به مدت یک هفته انجام شد. سپس برگها با محلول های آسکوربات (صفر، ۱۰۰ و ۲۰۰ قسمت در میلیون) و سالیسیلات (صفر و ۰/۱ میلی مولار) به مدت ۴ روز به صورت یک روز در میان اسپری شدند. گیاهان شاهد نیز با حجم برابر با آب مقطر اسپری شدند. در نهایت پس از اتمام تیمارهای فوق گیاهان (هم گیاهان شاهد و هم گیاهان تیمار شده) جمع آوری شدند و برای سنجش فعالیت آنزیم ها و محتوای رنگیزه های فتوسنتزی، در فریزر ۸۰- درجه سانتی گراد نگهداری شدند.

سنجش رنگیزه های فتوسنتزی: سنجش رنگیزه ها به روش Lichtenthaler (۱۹۸۷) انجام شد. بدین منظور ۰/۱ گرم برگ با ۴ میلی لیتر استون ۸۰٪ در هاون سائیده شد. سپس محلول حاصل به مدت ۵ دقیقه در ۳۰۰۰ دور سانتریفیوژ شده، سپس جذب محلول رویی برای تعیین میزان کلروفیل های a وb و کاروتنوئیدها به ترتیب در طول موج ۶۴۷، ۶۶۴ و ۴۷۰ نانومتر توسط اسپکتروفتومتر (مدلJENWAY6305) قرائت شد. مقدار رنگیزه ها بر حسب میلی گرم بر گرم وزن تر گزارش گردید.

www.SID.ir

Archive of SID

سنجش آنزیمی: استخراج عصاره آنزیمی: برای تهیه عصاره آنزیمی برای تعیین فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان از روش Sairam و همکاران (۲۰۰۲) استفاده شد.

سنجش فعالیت آنزیم کاتالاز: فعالیت آنزیم کاتالاز با استفاده از روش Pereira و همکاران (۲۰۰۲) با بررسی میزان کاهش مقدار H_2O_2 در ۲۴۰ نانومتر به روش اسپکتروفتومتری سنجیده شد. محلول مورد استفاده شامل بافر فسفات پتاسیم ۵۰ میلی مولار با pH= 7 و پراکسید هیدروژن ۳۰ میلی مولار بود. سنجش با افزودن مقدار مناسب عصاره آنزیمی (۱۰میکرو لیتر) در حجم نهایی ۳ میلی لیتر آغاز شد. بلافاصله پس از افزودن عصاره آنزیمی، کاهش جذب در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد در ۲۴۰ نانومتر به مدت ۲ دقیقه و هر ۳۰ ثانیه یکبار به وسیله اسپکتروفتومتر (مدلJENWAY6305) ثبت گردید. میزان فعالیت آنزیم در تیمارهای مختلف بر اساس تجزیه یک مول پراکسید هیدروژن در دقیقه به ازای هر گرم وزن تر بیان گردید.

سنجش فعالیت آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز: فعالیت آنزیم سوپراکسیددیسموتاز با استفاده از روش Beauchamp و Fridovich (۱۹۷۱) سنجیده شد. سنجش فعالیت این آنزیم با استفاده از سنجش مهار احیای نوری نیتروبلوتترازولیوم (NBT) در طول موج ۵۶۰ نانومتر انجام شد. بدین منظور ابتدا محلول بافر فسفات ۵۰ میلی مولار با pH=۷/۵ تهیه شد. سپس برای تهیه مخلوط واکنش، ترکیبات EDTA ۰/۱ مولار، NBT ۷۵ میکرو مولار، متیونین ۱۳ میلی مولار و ریبو فلاوین ۴ میلی مولار به ترتیب اضافه شد. قبل از اضافه کردن این ترکیبات به بافر فسفات پتاسیم ظرف حاوی مخلوط واکنش با فویل آلومینیوم به خوبی پوشانده شد تا به هیچ وجه نور نبیند. پس از افزودن مقدار ۴۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی در حجم نهایی ۳ میلی لیتر، لوله ها تحت روشنایی لامپ فلورسنت (۴۰ وات) با فاصله ۵۰ سانتی متر قرار داده شدند تا واکنش آغاز گردد. پس از ۱۵ دقیقه جذب نمونه ها در طول موج ۵۶۰ توسط دستگاه اسپکتروفتومتر خوانده شد.

تجزیه و تحلیل آماری داده‌های جمع‌آوری شده این پژوهش با استفاده از نرم افزارهای آماری SPSSver19 و SAS ver 9.2 انجام شد. مقایسه میانگین‌ها با آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح ۵ درصد انجام شد و برای رسم نمودارها از نرم‌افزار Excel استفاده شد.

نتایج

رنگیزه‌های فتوسنتزی: در این پژوهش اثرات ساده و متقابل کلیه فاکتورها بر محتوای رنگیزه‌های فتوسنتزی (کلروفیل‌های *a*، *b* و کاروتنوئیدها) معنی‌دار بود (جدول۱). همچنان که شکلهای ۱ و ۲ مشاهده می‌شود، غلظت‌های مختلف سرب باعث کاهش رنگ‌دانه‌های فتوسنتزی نسبت به شاهد شد. استفاده از سالیسیلیک اسید چه در حضور سرب (شکل ۱ـ الف) و چه توام با آسکوربیک اسید (شکل ۳ـ الف) باعث افزایش غلظت کلروفیل‌های *a* و *b* شد. از طرفی تیمار سالیسیلیک اسید در حضور غلظت‌های مختلف سرب (شکل ۱ـ ج) و همچنین همراه با آسکوربیک اسید (شکل ۳ـ ج) سبب کاهش محتوای کاروتنوئیدها شد. نتایج این تحقیق نشان داد که تیمار آسکوربیک اسید سبب افزایش رنگ‌دانه‌های فتوسنتزی شامل کلروفیل‌های *a* و *b* و کارتنوئیدها شد (شکل‌های ۲ و ۳). بعلاوه در سطوح مختلف آسکوربیک اسید، افزایش غلظت سالیسیلیک اسید سبب افزایش مقدار کلروفیل *a* و *b* شد (شکل۳). همچنین در سطوح مختلف سرب، افزایش آسکوربیک اسید سبب افزایش همه رنگ‌دانه‌های فتوسنتزی شد (شکل ۲).

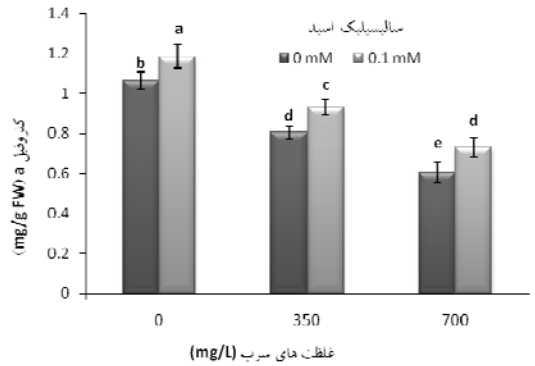
آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان: در بررسی اثر سرب بر فعالیت آنزیم کاتالاز، آنالیز داده‌ها نشان‌دهنده‌ی اثر معنی‌دار سرب بر فعالیت این آنزیم در گیاه ریحان بود (جدول ۱)

www.SID.ir

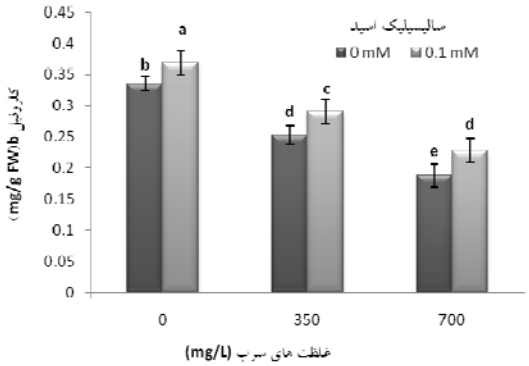
Archive of SID

به‌طوری‌که افزایش غلظت سرب اثر افزایشی بر فعالیت این آنزیم نسبت به گیاهان شاهد داشت (شکل ۴).

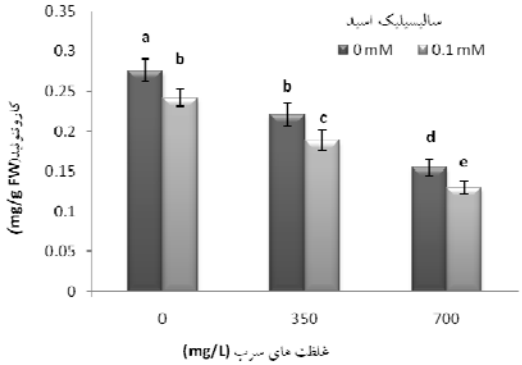
الف



ب



ج



شکل ۱- تأثیر متقابل سالیسیلیک اسید و سرب بر (الف) کلروفیل a، (ب) کلروفیل b و (ج) کارتنوئیدها. مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن می‌باشد و حروف غیرمشترک نشانه اختلاف معنی‌دار در سطح پنج درصد می‌باشد.

جدول ۱- تجزیه واریانس صفات فیزیولوژیک

منابع تغییر		میانگین مربعات				
	درجه	کلروفیل **a**	کلروفیل **b**	کاروتنوئید	کاتالاز	سوپراکسیددیسموتاز
سرب	۲	۱,۰۳۴**	۰,۱۰۱**	۰,۰۶۲**	۰,۲۳۷**	۲۵۴۷,۲۹۹**
آسکوربیک اسید	۲	۰,۳۹۲**	۰,۰۳۸**	۰,۰۲۴**	۰,۰۵۳**	۴۰۹۱,۰۹۹**
سالیسیلیک اسید	۱	۰,۱۶۶**	۰,۰۰۱۶**	۰,۰۰۸**	۰,۰۱۷**	۳۵۲۲,۲۳۴**
آسکوربیک اسید و سرب	۴	۰,۰۱۶**	۰,۰۰۲**	۰,۰۰۱**	۰,۰۰۵**	۱۰۱,۲۶۶**
سالیسیلیک اسید و سرب	۲	۰,۰۰۴**	۰,۰۰۰۱**	۰,۰۰۰۱۲**	۰,۰۰۲**	۱۰۰,۸۱۸**
آسکوربیک اسید و سالیسیلیک اسید	۲	۰,۰۱۶**	۰,۰۰۲**	۰,۰۰۰۳**	۰,۰۰۰۰۵۱^{ns}	۱۸۶,۷۴۷**
آسکوربیک اسید، سالیسیلیک اسید و سرب	۴	۰,۰۰۱^{ns}	۰,۰۰۰۰۳۴**	۰,۰۰۰۰۲۱	۰,۰۰۲۲۰۷^{ns}	۸,۵۷۱**
خطا	۳۶	۰,۰۰۰۲۸۰۷	۰,۰۰۰۳۶۶۷	۰,۰۰۰۰۰۱۳	۰,۰۰۷۱۶۵	۴,۳۱۶
CV		۱۴	۱۶,۲۲	۱۸,۴۵	۱۱	۱۸

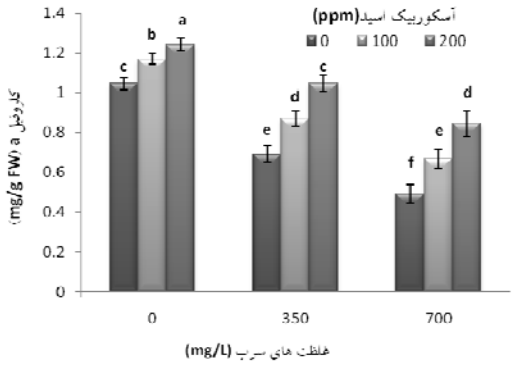
****،*، ns**: به‌ترتیب معنی دار در سطح ۱٪ و ۵٪ و معنی‌دار نبودن

www.SID.ir

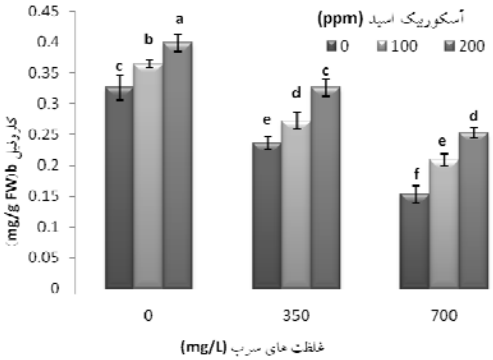
Archive of SID

در این پژوهش، محلول‌پاشی سالیسلیک اسید بر گیاهان تیمار شده با سرب باعث کاهش در فعالیت آنزیم کاتالاز شد (شکل ۴ـ الف). به‌طور مشابهی استفاده از آسکوربیک اسید نیز سبب کاهش فعالیت این آنزیم هم در گیاهان تیمار شده با سرب و هم در گیاهان شاهد شد (شکل ۴ـ ب). تجزیه داده‌ها نشان داد که محلول‌پاشی هم‌زمان سالیسیلیک اسید و آسکوربیک اسید در شرایط تنش و بدون تنش تأثیری بر فعالیت آنزیم کاتالاز نداشت (جدول۱).

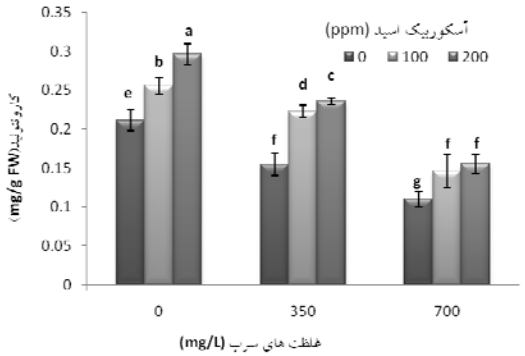
الف



ب

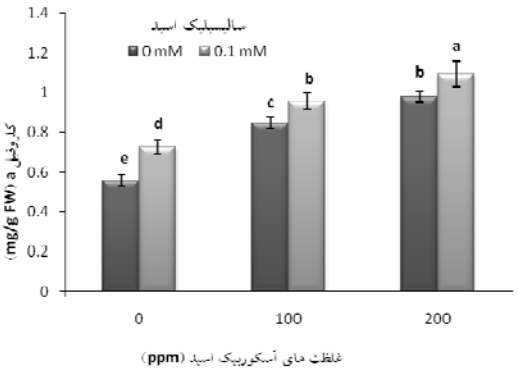


ج

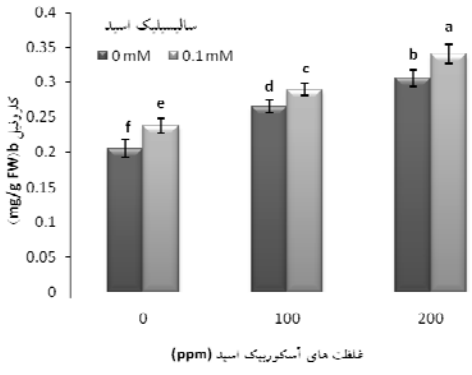


شکل ۲- تأثیر متقابل آسکوربیک اسید و سرب بر (الف) کلروفیل a، (ب) کلروفیل b و (ج) کارتنوئیدها. مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن می‌باشد و حروف غیرمشترک نشانه اختلاف معنی‌دار در سطح پنج درصد می‌باشد.

الف



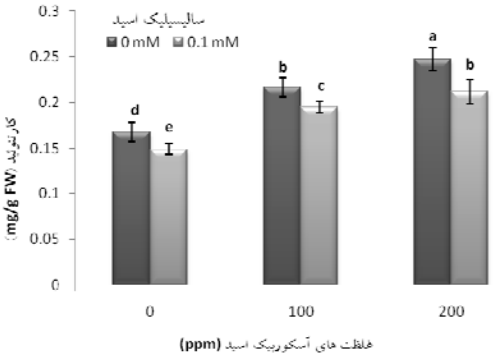
ب



www.SID.ir

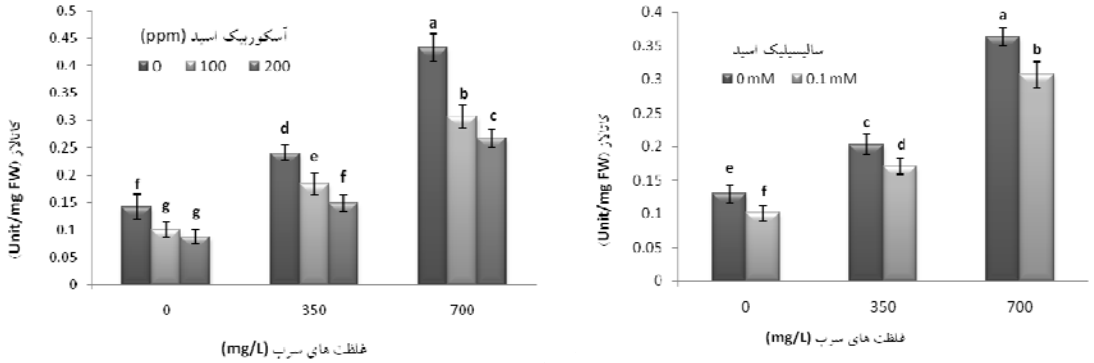
Archive of SID

ج



شکل ۳- تأثیر متقابل آسکوربیک اسید و سالیسیلیک اسید بر (الف) کلروفیل a، (ب) کلروفیل b و (ج) کارتنوئیدها. مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن می‌باشد و حروف غیرمشترک نشانه اختلاف معنی‌دار در سطح پنج درصد می‌باشد.

الف ب



شکل ۴- تأثیر متقابل (الف) سرب و سالیسیلیک اسید و (ب) سرب و آسکوربیک اسید بر میزان فعالیت آنزیم کاتالاز. مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن می‌باشد و حروف غیرمشترک نشانه اختلاف معنی‌دار در سطح پنج درصد می‌باشد.

در این پژوهش اثرات ساده و متقابل کلیه فاکتورها بر فعالیت آنزیم سوپر اکسیددیسموتاز(SOD) در گیاه ریحان معنی‌دار بود (جدول۱). طبق نتایج ما استفاده از آسکوربیک اسید و سالیسیلیک اسید در گیاهان تحت تنش سرب سبب کاهش فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز شد (شکل ۵). بعلاوه کاربرد هم‌زمان این دو ترکیب نیز بر گیاهان ریحان تیمار شده با سرب باعث کاهش فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز شد. لازم به ذکر است که استفاده از آسکوربیک اسید و سالیسیلیک اسید در گیاهانی که هیچ سربی را هم دریافت نکرده بودند بازهم منجر به کاهش فعالیت این آنزیم شد (شکل ۵).

بحث

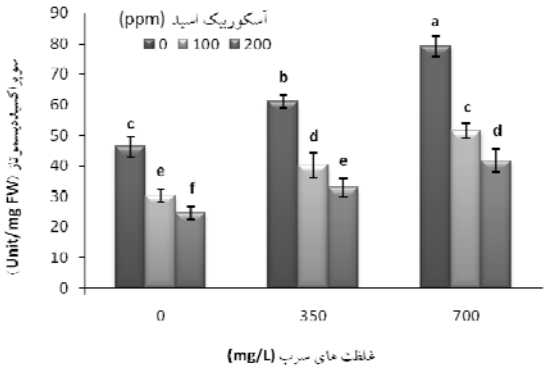
رنگیزه های فتوسنتزی: کاهش چشمگیر میزان رنگیزه های فتوسنتزی (کلروفیلa ,b و کارتنوئیدها) در گیاهان تحت تیمار سرب نمایانگر وسعت آسیب‌های اکسیداتیو است. این کاهش می‌تواند به دلیل بازدارندگی مراحل مختلف بیوسنتز رنگیزه ها توسط سرب باشد (۲۴). کاهش رنگ‌دانه‌های فتوسنتزی تحت تنش سرب با نتایج Zengin و Munzuroglu (۲۰۰۵) و Prasada (۲۰۰۴) و Rady و Osman (۲۰۱۲) همسو است (۳۳ و۳۱ ،۱۷). طبق نتایج به‌دست‌آمده از این تحقیق، سالیسیلیک اسید چه در حضور سرب و چه همراه با آسکوربیک اسید باعث افزایش کلروفیل‌های *a* و *b* شد که این نتایج با مشاهدات Gharib (۲۰۰۶) هم‌راستا هستند که نشان داد سالیسیلیک اسید در

www.SID.ir

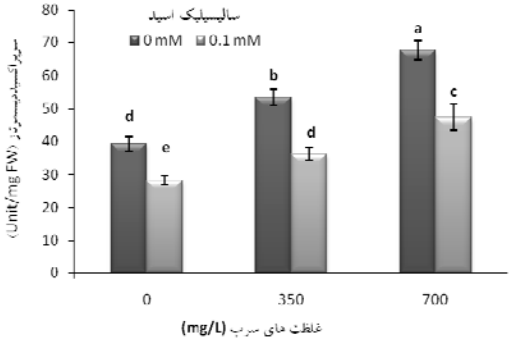
Archive of SID

گیاهان ریحان و مرزنجوش سنتز کلروفیل کل را تحریک می‌کند (۲۱).

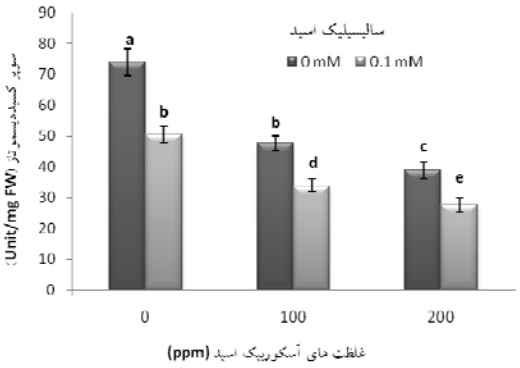
الف



ب



ج



شکل ۵- تأثیر متقابل (الف) سرب و سالیسیلیک اسید، (ب) سرب و آسکوربیک اسید و (ج) سالیسیلیک اسید و آسکوربیک اسید بر میزان فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز. مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن می‌باشد و حروف غیرمشترک نشانه اختلاف معنی‌دار در سطح پنج درصد می‌باشد.

در مطالعات Shakirova و همکاران (۲۰۰۳) و Iqbal و همکاران (۲۰۰۶) روی گیاه گندم، Abdel- Wahed و همکاران (۲۰۰۶)و El-Mergawi و Abdel- Wahed (۲۰۰۷)روی گیاه ذرت و Chen و همکاران (۲۰۰۷) روی گیاه برنج مشخص شد که سالیسیلیک اسید باعث افزایش قابل‌توجهی در محتوای کلروفیل می‌شود (۸، ۱۲، ۱۶، ۲۷ و ۴۱).

از طرفی کاهش محتوای کاروتنوئیدها در گیاه ریحان پس از تیمار با سالیسیلیک اسید در شرایط تنش سرب و همچنین همراه با آسکوربیک اسید با نتایج مظاهری و همکاران (۱۳۸۷) و هاشمی و همکاران (۱۳۸۹) مشابه است (۷ و۶). سالیسیلیک اسید معمولا با اثر بر روی هورمون‌های آبسیزیک اسید (۳۸) و اتیلن (۴۵) بسیاری از روندهای فیزیولوژیکی و رشد گیاه را تنظیم می‌کند. ازجمله با اثر بر روی آبسیزیک اسید و تجمع این هورمون در گیاه باعث خوگیری گیاهان نسبت به تنش‌های محیطی می‌شود (۴۱). بنابراین کاهش مشاهده‌شده در مقدار کاروتنوئیدها در این پژوهش می‌تواند به دلیل تبدیل کاروتنوئیدها به آبسیزیک اسید باشد (۶). آسکوربیک اسید به دلیل خواص آنتی‌اکسیدانی خود از تخریب کلروفیل جلوگیری کرده و به‌طور غیرمستقیم سبب افزایش آن می‌شود. در این تحقیق افزایش رنگ‌دانه‌های فتوسنتزی شامل کلروفیل‌های *a*، *b* و کارتنوئیدها با تیمار آسکوربیک اسید مشاهده شد (۳). به‌طور مشابه، Shaddad و همکاران در سال ۱۹۹۰، Abdel- Wahed و همکاران در سال ۲۰۰۶

www.SID.ir

Archive of SID

در ذرت، Hathout و همکاران در سال ۱۹۹۳ در گوجه‌فرنگی، Salem و همکاران در سال ۲۰۰۰ در چغندرقند، Hanna و همکاران در سال ۲۰۰۱ در گندم و El-Gabas در سال ۲۰۰۶ در گیاه آفتابگردان نشان دادند که آسکوربیک اسید کلروفیل‌های *a*، *b* وکلروفیل کل را افزایش داد و این را به تحریک بیوسنتز کلروفیل‌ها و تأخیر در پیری برگ توسط آسکوربیک اسید نسبت دادند (۴۰، ۳۴، ۱۵،۲۳، ۸). یافته‌های این تحقیق مبنی برافزایش کلروفیل *a* و *b* در کاربرد هم‌زمان سالیسیلیک اسید و آسکوربیک اسید با نتایج Amin و همکاران (۲۰۰۸) همسو است (۱۰). تجمع رنگ‌دانه‌های فتوسنتزی به‌عنوان یک نتیجه از تیمارهای متقابل ممکن است با توجه به افزایش در بازده فتوسنتزی توسط افزایش در محتوای کلروفیل در برگ‌های گیاهان منعکس‌شده باشد. همچنین افزایش رنگ‌دانه‌های فتوسنتزی در سطوح مختلف سرب با تیمار آسکوربیک اسید با نتایج سلاح‌ورزی و همکاران (۱۳۹۰) همسو است (۵). آسکوربیک اسید به‌عنوان یک آنتی‌اکسیدان قوی توانسته از فعالیت رادیکال‌های آزاد اکسیژن ناشی از تنش و به دنبال آن تخریب غشای کلروپلاستی در گیاه مرزنجوش جلوگیری نموده و محتوای کلروفیلی گیاه را حفظ کند (۵).

آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان: همان‌طور که در نتایج گزارش شد، افزایش غلظت سرب اثر افزایشی بر فعالیت آنزیم کاتالاز داشته است که این نتیجه مشابه با نتایج بلادی و همکاران (۱۳۸۹) است (۱). به نظر می‌رسد که این‌گونه‌ی گیاهی درواقع عملکرد ترکیبی SOD و CAT را برای مقابله با سمیت ناشی از سرب افزایش داده تا بتواند از تولید رادیکال‌های آزاد تولیدی جلوگیری و یا رادیکال‌های آزاد تولیدی بیشتری را جاروب کند، تا بدین‌وسیله سیستم حفاظتی برای سلول‌ها در مقابل اثرات زیان‌بخش ناشی از سرب را فراهم آورد (۱). کاهش در فعالیت آنزیم کاتالاز توسط تیمار سالیسلیک اسید در این پژوهش نیز با نتایج دولت‌آبادیان و همکاران (۱۳۸۷) و Chen و همکاران (۲۰۰۷) همسو است (۱۲ و۲). سالیسیلیک اسید، بازدارنده‌ی فعالیت آنزیم کاتالاز که یک آنزیم پاک‌سازی کننده‌ی پراکسیدهیدروژن است، بوده و درنتیجه باعث کاهش فعالیت این آنزیم در گیاه می‌شود (۲۴). تحقیقات قبلی نشان داده‌اند که سالیسیلیک اسید با باند شدن به آنزیم کاتالاز سبب کاهش فعالیت آن در توتون (۱۳) و چندین گونه‌ی دیگر گیاهی (۳۵) شده است. در این تحقیق تیمار سالیسیلیک اسید در غلظت‌های مختلف سرب نیز سبب کاهش فعالیت کاتالاز در گیاه ریحان شد، که با نتایج Chen و همکاران (۲۰۰۷) مشابه است (۱۲). در نتایج تحقیق ما مشابه با نتایج دولت‌آبادیان و همکاران (۱۳۸۸) در شرایط بدون تنش، آسکوربیک اسید نیز سبب کاهش فعالیت آنزیم کاتالاز شد (۳). در این شرایط به دلیل عدم تولید بیش‌ازحد رادیکال‌های آزاد اکسیژن، تولید پراکسید هیدروژن ناشی از یون سوپراکسید کاهش‌یافته و درنتیجه فعالیت آنزیم کاتالاز کاهش می‌یابد. آسکوربیک اسید نیز به دلیل خنثی‌سازی و از بین بردن یون سوپراکسید در پاک‌سازی این یون مخرب نقش داشته و درنتیجه سبب کاهش تولید پراکسید هیدروژن و در پی آن کاهش فعالیت آنزیم کاتالاز می‌شود (۲۹). در شرایط تنش نیز مشاهده گردید آسکوربیک اسید سبب کاهش فعالیت آنزیم کاتالاز شد. افزایش فعالیت این آنزیم زمانی رخ می‌دهد که یون سوپراکسید درون‌سلولی افزایش یابد.

بررسی اثر سرب بر فعالیت آنزیم سوپر اکسیددیسموتاز (SOD) در گیاه ریحان حاکی از تأثیر معنی‌دار سرب بر فعالیت این آنزیم در گیاه ریحان بود که با نتایج بلادی و همکاران (۱۳۸۹) همسو است (۱). در شرایط تنش، اکسیژن فعال در گیاه افزایش می‌یابد و در این شرایط گیاه مکانیسم‌های متفاوتی را برای حذف و از بین بردن گونه‌های فعال اکسیژن به کار می‌گیرد. آنزیم سوپراکسید دیسموتاز(SOD) اولین آنزیم در فرآیند سمیت زدایی به شمار می‌رود (۲۰) و واکنش تبدیل رادیکال‌های سوپر اکسید به H_2O_2 و O_2 را کاتالیز می‌کند (۱۴). در این تحقیق

www.SID.ir

Archive of SID

سالیسیلیک اسید در غلظت‌های مختلف سرب و همچنین در حضور آسکوربیک اسید، سبب کاهش فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز شد که با نتایج دولت‌آبادیان و همکاران (۱۳۸۷) همسو است (۲). می‌توان نتیجه گرفت که ممکن است این ماده به‌طور مستقیم در از بین بردن رادیکال‌های آزاد نقش داشته و با پاک‌سازی این گونه‌های اکسیژن فعال، از افزایش فعالیت آنزیم جلوگیری می‌کند. همچنین نتایج ما نشان داد که در شرایط بدون تنش و همچنین در سطوح مختلف سرب، افزایش آسکوربیک اسید سبب کاهش فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز می‌شود که با نتایج دولت‌آبادیان و همکاران (۱۳۸۸) مشابه است (۳). افزایش فعالیت این آنزیم زمانی رخ می‌دهد که یون سوپراکسید درون‌سلولی افزایش یابد. این گونه‌ی فعال اکسیژن در اثر تنش‌های محیطی مختلف ازجمله کم‌آبی، شوری و تشعشع بالا افزایش می‌یابد (۴۳).

نتیجه‌گیری

به طور کلی داده های حاصل از تحقیق بیانگر آن است که با افزایش شدت تنش سرب محتوای رنگیزه های فتوسنتزی کاهش یافته و فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدانی (کاتالاز و سوپر اکسید دیسموتاز) افزایش یافته است. تیمار گیاه در سطوحی از تنش سرب با محلول آسکوربیک اسید و سالیسیلیک اسید باعث حفاظت بیشتر آنها شده و باعث افزایش مقاومت گیاه به تنش سرب شده است. در مورد آسکوربیک اسید غلظت ۲۰۰ پی پی ام و در مورد سالیسیلیک اسید غلظت ۰/۱ میلی مول نسبت به غلظت های دیگری که در این پژوهش به کار رفته است بهترین بازده را بر روی شاخص های بیوشیمیایی گیاه ریحان داشته‌اند.

منابع

۱. بلادی، م.، کاشانی، ع.، حبیبی، د. و پاک نژاد، ف. (۱۳۸۹) ارزیابی توزیع فلز سنگین سرب ومس و نقش دو آنزیم آنتی اکسیدان دریونجه (*Medicago sativa*) رقم همدانی. مجله زارعت و اصلاح نباتات، ۶(۴): ۷۳- ۸۴.

۲. دولت آبادیان، آ.، ثانوی، ع. و اعتمادی، ف. (۱۳۷۸). اثر پیش تیمار سالیسیلیک اسید بر جوانه زنی بذر گندم(*Triticumaestivum* L.) در شرایط تنش شوری. مجله زیست شناسی ایران ۱۲ (۴):۷۰۲-۶۹۲.

۳. دولت آبادیان، آ.، ثانوی، م. و شریفی، م. (۱۳۸۸). اثرتنش کم آبی و محلول پاشی اسیدآسکوربیک برمیزان فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدان وبرخی تغییرات بیوشیمیایی دربرگ ذرت دانه ای (*Zeamaize* L.). مجله زیست شناسی ایران. ۲۲(۳): ۴۰۷-۴۲۲

۴. دولت آبادیان، آ.، ثانوی، م. و شریفی، م. (۱۳۸۸). اثر تغذیه برگ با آسکوربیک اسید بر فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدان، تجمع پرولین و لیپید پراکسیداسیون کلزا (*Brassica napus* L.) در شرایط تنش شوری. علوم و فنون کشاورزی و منابع طبیعی. ۱۳ (۴۷): ۶۱۱-۶۲۲.

۵. سلاح ورزی، ی.، گلدانی، م.، نباتی، ج. و علیرضایی، م. (۱۳۹۰). تأثیر کاربرد برون زای آسکوربیک اسید بر برخی از تغییرات فیزیوشیمیایی مرزنجوش(*Origanummajorana* L.) تحت تنش شوری. مجله علوم باغبانی ایران، ۴۲(۲): ۱۶۷- ۱۵۹.

۶. مظاهری تیرانی، م.، کلانتری، خ. و حسیبی، ن. (۱۳۸۷). مطالعه اثر متقابل اتیلن و سالیسیلیک اسید برالقاء تنش اکسیداتیو و مکانیسمهای مقاومت به آن درگیاهان کلزا (*Brassica napus* L.). مجله زیست شناسی ایران. ۲۱(۳):۴۲۱-۴۳۲.

۷. هاشمی، ش.، اسرار، ز. و پورسیدی، ش. (۱۳۸۹). اثر پیش تیمار بذر توسط سالیسیلیک اسید بر رشد و برخی از شاخص های فیزیولوژیک و بیوشیمیایی در شاهی(*Lepidiumsativum*) ، زیست شناسی گیاهی ایران، ۲(۲):۱۰-۱.

8. Abdel-Wahed, M.S.A., Amin, A.A. and El-.Rashad, S.M. (2006). Physiological effect of some bioregulators on vegetative growth, yield and chemical constituents of yellow maize plants. World Journal of Agricultural Sciences 2(2): 149-155.

9. Abou–Leia, B.H., Aly, M.S. and Abdel-Hadey, N.F. (1994). Effect of foliar application of GA

www.SID.ir

Archive of SID

and Zn on Ocimumbasilicum L. grown in different soil types. Egyptian Journal of Physiological Sciences, 18(2): 365-380.

10. Amin, A.A., Rashad, El-Sh., Fatma, M. and Gharib, A.E. (2008). Changes in Morphological, Physiological and Reproductive Characters of Wheat Plants as Affected by Foliar Application with Salicylic Acid and Ascorbic Acid. Acid.Australian Journal of Basic and Applied Sciences,2(2): 252-261.
11. Chehregani, A. and Malayeri, B. (2007). Removal of heavy metals by native accumulator plants. International Journal of Agriculture andBiology, 9(3):462-465.
12. Chen, J., Cheng, Z. and Zhong, S. (2007) Effect of exogenous salicylic acid on growth and H2O2- Metabolizing enzymes in rice seedlings lead stress. Journal of Environmental sciences, 19:44-49.
13. Chen, Z., Ricigliano J.R. and Klessig, D.F. (1993). Purification and characterization of a soluble salicylic acid binding protein from tobacco. Proceedings of the National Academy of Sciences, 90: 9533-9537.
14. Del-Rio, L.A., Lyon, D.S., Olah, I., Glick, B. and M. Salin. (1983). Immunocytochemical evidence for a peroxisomal localization of manganese superoxide dismutase in leaf protoplasts from a higher plant. Planta, 158: 216-224.
15. El-Gabas, N.M.M., (2006). Physiological studies on the effect of ascorbic acid and micronutrients on sunflower plants grown under salinity stress. B.Sc. (Botany). Fac. Sci., Al-Azhar Univ.
16. El-Mergawi, R. and Abdel-Wahed, M. (2007). Diversity in salicylic acid effects on growth criteria and different indole acetic acid forms among faba bean and maize International Plant Growth Substances Association.19th Annual meeting, Puerto Vallarta, Mexico, July 21-25: 2007.
17. Zengin, F.K., and Munzuroglu, O. (2005). Effects of some heavy metals on content of chlorophyll, proline and some antioxidant chemicals in bean (phaseolus vulgaris) Seedlings. ActaBiologicaCracoviensia Series Botanica , 47/2: 157–164.
18. Fässler, E., Evangelou, M. W., Robinson, B. H. and Schulin, R. (2010) Effects of indole-3-acetic acid (IAA) on sunflower growth and heavy metal uptake in combination with ethylene diaminedisuccinic acid (EDDS). Chemosphere 80: 901-907.
19. Fatma A. E. and Gharib. (2006) Effect of Salicylic Acid on the Growth, Metabolic Activities and Oil Content of Basil and Marjoram. International Journal of Agriculture and Biology, 1560–8530
20. Garnczarska, M. and Ratajczak, L. (2000). Metabolic responses of Lemna minor to lead ions, II. Induction of antioxidant enzymes in roots. ActaPhysiologiaePlantarum, 22: 429-432.
21. Gharib, F.A. (2006). Effect of salicylic acid on the growth, metabolic activities and oil content of basil and marjoram. International Journal of Agricultural Biology, 4: 485-492.
22. Hadi, F., Bano, A. and Fuller, M. P. (2010). The improved phytoextraction of lead (Pb) and the growth of maize (Zea mays L.): the role of plant growth regulators (GA3 and IAA) and EDTA alone and in combinations. Chemosphere 80: 457-462.
23. Hathout, T.A., Sheteawi, S.A. and khallal, S.M. (1993). Effect of mode of application of some growth regulators on the physiology of tomato plants. III. Effect of Nicotinamide on morphology growth, metabolism and productivity. Egyptian Journal of Physiological Sciences, 17(2): 183-200.
24. Hegedus, A., Erdei, S. and Horvath, G. (2001). Comparative studies of H2O2 detoxifying enzymes in green and greening barley seedlings under cadmium stress. Plant Sciences, 160: 1085–1093.
25. Hoagland, D.R. and D.I. Arnon. (1950). The water-culture method for growing plants without Soil. California Agricultural Experiment Station Circular, 347:1-32.
26. Igwe, J. C. and Abia, A. A. (2007) Equilibrium sorption isotherm studies of Cd(II), Pb(II) and Zn(II) ions detoxification from waste water using unmodified and EDTA-modified maize husk. Electronic Journal of Biotechnology, 10(4): 536-548.
27. Iqpal, M., Ashraf, M., Jamil, A. and Shafiq, U.R. (2006). Does seed priming induce changes in the levels of some endogenous plant hormones in hexaploid wheat plant under salt stress. Journal of Integrative Plant Biology, 48(2): 181-189.
28. Jaja, E. T. and Odoemena, C. S. I. (2004) Effect of Pb, Cu and Fe compounds on the germination and early seedling growth of tomato varieties. Journal of Applied Sciences and Environmental Management, 8(2): 51-53.
29. Nagajyoti, P. C., Lee, K. D. and Sreekanth, T. V. M. (2010) Heavy metals, occurrence and toxicity

www.SID.ir

Archive of SID

for plants: a review. Environmental Chemistry Letters, 8: 199-216.

30. Popova, L., Pancheva, T. and Uzunova. A. (1997). Salicylic acid: Properties, Biosynthesis and Physiological Role. Bulgarian Journal of Plant Physiology, 23: 85-93.

31. Prasad, M.N.V. (2004). Heavy metal stress in plants: from biomolecules to ecosystems. Berlin: Springer-Verlag.

32. Priscila, L. G., Polle, A., Lea, P. J. and Azevedo, R. A. (2005) Making the life of heavy metalstressed plants a little easier. Functional Plant Biology, 32: 481-494.

33. Rady M. M., and Osman A. Sh. (2012). Response of growth and antioxidant system of heavy metal-contaminated tomato plants to 24-epibrassinolide. African Journal of Agricultural Research, 7(21):3249-3254.

34. Salem, H.M., Abdel-Rahman, S. and Mohamed, S.I. (2000). Response of sugar beet plants to boron and ascorbic acid under filed conditions. Journal of the Faculty of Education, 48: 1-20.

35. Sanchez-Casas, P. and Klessig, D.F. (1994). A salicylic acid-binding activity and a salicylic acid inhibitable catalase activity are present in a variety of plant species. Plant Physiology, 106: 1675-1679.

36. Schneider M., Marquard R. (1996). Investigation on the uptake of cadmium in Hypericumperforatum L., ActaHorticulturae, 426:435-441.

37. Scora R. W. and Chang A. C. (1997). Essential oil quality and heavy metal concentrations of peppermint grown on a municipal sludge-amended soil, Journal of Environmental Quality, 26(4):975-979.

38. Senaranta, T., Touchell, D., BumM, E. and Dixon, K. (2002). Acetylsalicylic (aspirin) and salicylic acid induce multiple stress tolerance in bean and tomato plants. Plant Growth Regulation. 30: 157-161.

39. Sengar, R. S., Gautam, M., Sengar, S., Garg, S. K., Sengar, K. and Chaudhary, R.(2008). Lead Stress Effects on Physiobiochemical Activities of Higher Plants. Reviews of Environmental Contamination and Toxicology, 196:73-93.

40. Shaddad, M. A., Radi, A. F., Abdel-Rahman, A. M. and Azooz, M.M. (1990). Response of seeds of Lupinustermis and Viciafaba to the interactive effect of salinity and ascorbic acid or pyridoxine. Plant and Soil, 122: 177-183.

41. Shakirova, F. M., Sakhabutdinova, A. R., Bozrutkova, M. V., Fatkhutdinova, R. A. and Fatkhutdinova, D. R. (2003) Changes in the hormonal status of wheat seedlings induced by salicylic acid and salinity. Plant Sciences, 164: 317-322.

42. Tassi, E., Pouget, J., Petruzzelli, G. and Barbafieri, M. (2008) The effects of exogenous plant growth regulators in the phytoextraction of heavy metals. Chemosphere 71: 66-73.

43. Wu, J.-W., Shi, Y., Zhu, Y.-X., Wang, Y.-C. and Gong, H.-J. (2013) Mechanisms of Enhanced Heavy Metal Tolerance in Plants by Silicon: A Review. Pedosphere 23: 815-825.

44. Yadav, S. K. (2010) Heavy metals toxicity in plants: An overview on the role of glutathione and phytochelatins in heavy metal stress tolerance of plants. South African Journal of Botany 76: 167-179.

45. Zhang, W., Curtin, C., Kikuchi, M. and, Franco. C. (2002). Integration of jasmonic acid and light irradiation for enhancement of anthocyanin biosynthesis in Vitis -inifera suspension cultures. Plant Sciences, 162: 459–468.

46. Zheljazkov, V. and Nielsen, N.E., (1996). Growing clary sage (*Salvia sclarea* L.) in heavy metal polluted areas, ActaHorticulturae, 426:309-328.

www.SID.ir

Archive of SID

The effects of salicylic acid and ascorbic acid on photosynthetic pigments and some antioxidant enzyme activities in basil (*Ocimumbasilicum* L.) under lead stress

Gheysari S., Saeid Nematpour F. and SafipourAfshar A.

Biology Dept., Neyshabur Branch, Islamic Azad University, Neyshabur, I.R. of Iran

Abstract

Heavy metals pollution is a major problem for the large parts of the world. Lead is a heavy metal with high toxicity that absorbed by plants mainly through the root system and in minor amounts through the leaves. After entering the cells, lead inhibits activities of many enzymes, and affects membrane structure and permeability. The objective of this research was to evaluate the effect of different concentrations of Salicylic Acid (SA) and Ascorbic Acid (AsA) on the content of photosynthetic pigments and antioxidant enzyme activities of *Ocimumbasilicum* L. under Pb stress. Factorial experimentin a completely randomized design with three replications was conducted. Treatments were combination of 3 levelsapplication ofPb (0, 350 & 700 $mg.l^{-1}$) and 2 concentrations of SA (0, 0.1 mM) and AsA (0, 100 & 200 ppm). The results revealed that increasing lead concentration reduced chlorophyll and carotenoid content and increased activity of antioxidant enzymes (SOD, CAT). On the other hand, application SA and AsA alone and/ortogether, significantly increased chlorophyll content and reduced activity of antioxidant enzymes. Generally, the results of this study indicate that SA and AsA applications improved plant physiological parameters of *Ocimumbasilicum* L.

Key words: Antioxidant enzymes, Ascorbic Acid, lead, *Ocimumbasilicum* L., Salicylic Acid

www.SID.ir