اثر اکسید نیتریک بر میزان پرولین، قندهای محلول و فعالیت آنزیم های آنتی‌اکسیدانی در شرایط تنش سرب در گیاه کلزا (*Brassica napus* L.)

حسین حمیدی، ناهید مسعودیان* و سکینه سعیدی‌سار

دامغان، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد دامغان، گروه زیست شناسی

تاریخ دریافت: ۹۳/۷/۱۹ تاریخ پذیرش: ۹۳/۱۲/۲۳

چکیده

تنش سرب یکی از مهمترین تنش‌های محیطی است که رشد گیاهان را محدود می‌کند. اکسید نیتریک (NO) در انتقال پیام و پاسخ به تنش زیستی و غیرزیستی دخالت می‌کند. در این تحقیق به بررسی اثر اکسید نیتریک در شرایط تنش سرب بر پرولین، قندهای محلول و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی در گیاه کلزا رقم Hyola ۴۰۱ در محیط کشت هیدروپونیک و با استفاده از محلول غذایی هوگلند در ریشه و اندام هوایی پرداختیم. آنالیزهای آماری توسط نرم افزار SPSS و مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون دانکن انجام گرفت. سه سطح سرب توسط $Pb(NO_3)_2$ [۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میکرومول بر لیتر] و دو سطح NO توسط نیتروپروساید سدیم [۰ و ۱۰۰ میکرومول بر لیتر] صورت گرفت. در تنش سرب ملایم، میزان پرولین ریشه افزایش معنی‌داری داشت و NO باعث افزایش سازگاری گیاه با محیط شد. قندهای محلول در ریشه و اندام هوایی افزایش معنی‌داری نیافتند. فعالیت آنزیم پراکسیداز در تمام تیمارهای ریشه و اندام هوایی کاهش معنی‌داری داشت. فعالیت کاتالاز در شرایط تنش سرب در اندام هوایی بطور معنی‌داری کاهش یافته بود اما فعالیت کاتالاز ریشه تغییر معنی‌داری نداشت. کاهش فعالیت آنزیم‌های پراکسیداز و کاتالاز می تواند ناشی از فعالیتNO بعنوان یک آنتی‌اکسیدان باشد.

واژه های کلیدی: پراکسیداز، سازگاری، کاتالاز، نیتروپروساید سدیم

* نویسنده مسئول، تلفن:۰۹۱۲۴۷۴۴۱۳۷، پست الکترونیکی: n.masoudian@damghaniau.ac.ir

مقدمه

کلزا (*Brassica napus* L.) یکی از مهمترین گیاهان روغنی بعد از سویاست که کشت و تولید آن در ایران بخصوص در گیلان پس از کشت برنج بعنوان کشت دوم توسعه زیادی یافته‌است (۲). آلودگی سرب در خاک موجب کاهش درصد جوانه زنی گشته و اثرات مضری بر رشد و متابولیسم گیاه بر جای می‌گذارد (۲۳). نشانه‌های غیر اختصاصی و قابل مشاهده سمیت سرب شامل ممانعت از رشد ریشه، جلوگیری از رشد گیاه و زرد شدن گیاه است (۶). فلزات سنگین احتمالاً با تولید رادیکال‌های آزاد و اشکال مختلف اکسیژن فعال موجب تنش اکسیداتیو می-شود (۱۷). این اشکال مختلف می‌توانند با لیپیدها واکنش داده و سبب پراکسیداسیون لیپیدها، آسیب‌های غشایی و غیرفعال‌سازی آنزیمی شده بنابراین حیات سلول را به خطر می‌اندازند (۱۲).

مکانیسم اکثر گیاهان و جلبکها در پاسخ به فلزات سنگین، تولید پرولین می‌باشد (۲۵). پرولین احتمالا" در سلولهای تحت تنش، نقش آنتی‌اکسیدانی دارد(۳۱). گیاه با افزایش قندهای محلول در شرایط تنش علاوه بر حفظ پتانسیل اسمزی، قادر خواهد بود تا ذخیره کربوهیدراتی خود را برای متابولیسم پایه سلولی در حد مطلوب نگه دارد (۱۳). کاهش قندهای محلول، تحت تنش سرب از جذب عناصری مثل Mn، Fe و Mg جلوگیری می‌کند (۲۸ و ۳۰).

گیاهان جهت تنظیم میزان گونه‌های اکسیژنی فعال و حفاظت سلولها در شرایط تنشی، دارای چندین آنزیم جاروبگر مثل کاتالاز و پراکسیداز می‌باشند (۲۷). تیمار با سرب سبب تغییر در فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و آسیب به ساختار ترکیبات آلی می‌شود (۱۸). افزایش فعالیت پراکسیداز بعنوان آنزیم اصلی و کلیدی در تنش‌های مربوط به فلز سنگین به اثبات رسیده است، تا جایی‌که فعالیت این آنزیم را بعنوان مارکرهای استرس در تنش فلزات سنگین می‌شناسند (۹).

نیتروپروساید سدیم (SNP) یک ترکیب آزاد کننده نیتریک اکسید است که در حالت محلول بشدت به نور حساس می‌باشد (۳۴). نیتریک اکسید یک ملکول گازی کوچک و قابل انتشار است که بصورت درون‌زا در بسیاری از سیستم‌های بیولوژیکی مثل جانوران، گیاهان و باکتری‌ها تشکیل می‌شود و دارای نقش‌های فیزیولوژیکی متعددی می‌باشد (۱۱). اثر محافظت‌کنندگی NO به توانایی آن در واکنش به بعضی ROS ها مانند O_2^- مربوط است که NO بعنوان شکننده‌ی زنجیره عمل کرده وخصوصیات آنتی-اکسیدانی بروز می‌دهد (۱۰). گیاهچه‌ی کانولا و یا کلزایی که با غلظت پایین SNP تیمار شده بودند، طول ریشه و وزن خشک بیشتری داشتند، در حالی که غلظت بالاتر، مقادیر این پارامترها را کاهش داد (۳۵). در دهه اخیر، درباره اثرات مثبت ومنفی NO خارجی بر سمیت فلزات سنگین تعداد در حال افزایشی از مقالات گزارش شده است (۲۰، ۲۲، ۲۹، ۳۵ و ۳۶).

در این تحقیق میزان پرولین، قندهای محلول و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی در گیاه کلزا رقم Hyola ۴۰۱ تحت تنش سرب بررسی شد و اثر تیمار نیتروپروساید سدیم (SNP) بعنوان رها کننده NO در تخفیف صدمات گیاه کلزا در شرایط تنش سرب بررسی گردید و نقش آنتی‌اکسیدانی نیتریک اکسید ارزیابی شد.

مواد و روشها

بمنظور کشت حدود ۴۰۰ بذر کلزا رقم Hyola ۴۰۱ و بدست آوردن دانه رست، ابتدا بذرها با هیپوکلریت سدیم ۲۰ درصد سترون گردیدند و سپس بوسیله آب مقطر استریل شستشو داده شده و پس از آن به درون ظروف پتری دارای یک لایه کاغذ صافی مرطوب منتقل شدند بطوریکه سطح بذرها نیز توسط لایه دیگر کاغذ واتمن پوشانده شد. جوانه زنی بذرها در اتاقک رشد و در دمای ۲۸ درجه سانتی گراد در تاریکی انجام گرفت. پس از ۷ روز دانه رست‌های حاصل به محیط کشت دارای محلول غذایی هوگلند انتقال یافتند. در درون ظروفی با حجم ۴۰۰ میلی‌لیتر که قبلاً با الکل ۹۶٪ سترون شده بودند، محلول کامل هوگلند ریخته شد. درب ظرف‌ها دارای ۸ سوراخ بود که دانه رست‌ها پس از خروج از پتری دیش‌ها و شستشو با آب مقطر استریل با کمک پنبه در این سوراخ‌ها طوری قرار گرفتند که ریشه آن‌ها بطور کامل داخل محلول غذایی قرار گرفت. هوادهی محلول غذایی پنج بار در روز و هر بار بمدت نیم ساعت انجام گرفت. pH محلول‌های غذایی بین ۵/۵ تا ۵/۷ تنظیم شده بود. پس از گذشت شش روز محلول غذایی تجدید شد، بنحویکه محلول غذایی هوگلند با غلظت‌های مختلف سرب از منبع نیترات سرب [$Pb(NO_3)_2$ ۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میکرومول بر لیتر] (۱۴) و NO از منبع نیتروپروساید سدیم (SNP) [۰ و ۱۰۰ میکرومول بر لیتر] (۸) تهیه شد و به ظروف پلاستیکی اضافه گردید. آب تعرق شده توسط گیاه بصورت روزانه با آب مقطر جبران گردید. پس از گذشت هفت روز برداشت انجام شد و سپس نمونه‌ها به آزمایشگاه منتقل شدند.

سنجش مقدار پرولین: نمونه‌های خشک گیاهی توزین شده (یک گرم) را در ۱۰ میلی‌لیتر محلول ۳ درصد اسید سولفوسالیسیلیک ساییده و سپس نمونه‌ها صاف گردید. آن‌گاه ۲ میلی‌لیتر معرف نین هیدرین و ۲ میلی‌لیتر اسید استیک خالص به نمونه‌ها افزوده شد و لوله‌ها در بن ماری با دمای ۱۰۰ درجه سانتی گراد بمدت یک ساعت قرار داده

شد، سپس لوله‌ها در حمام یخ بمدت نیم ساعت قرار گرفتند. به هر لوله آزمایش ۴ میلی‌لیتر تولوئن افزوده و آنها را خوب تکان داده و میزان جذب لایه رنگی فوقانی (حاوی تولوئن و پرولین) با دستگاه اسپکتروفوتومتر (U.V) و کوت کوارتز در طول موج ۵۲۰ نانومتر قرائت شد. برای محاسبه غلظت نمونه‌ها (C)محلول‌های شاهد از ۰، ۱۰، ۲۵، ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ میکرومول بر لیتر پرولین تهیه و کلیه مراحل کار بر روی یک میلی‌لیتر از هر کدام آنها تکرار شد. سپس با استفاده از اعداد جذب(Abs) خوانده شده منحنی استاندارد با r = 0/98 (ضریب همبستگی) و C = Abs × 825/302+3/369 بدست آمد که مقدار پرولین نمونه‌ها ارزیابی شد. مقدار پرولین بصورت میکرومول در گرم خشک نمونه‌ی گیاهی ارزیابی شد (۵).

سنجش قندهای محلول با استفاده از روش فنل–اسید سولفوریک: در ابتدا برگ و ریشه را بمدت ۴۸ ساعت در داخل آون در دمای ۱۱۰ درجه سانتی گراد قرار داده شد و پس از خشک شدن میزان ۰/۰۲ گرم از نمونه‌ها را با استفاده از ترازوی دیجیتال وزن کرده و به هر یک از نمونه‌ها، ۱۰ میلی‌لیتر الکل ۷۰٪ افزوده شد و در ظروف پلی‌اتیلنی بمدت یک هفته در درون یخچال قرار داده شدند. با این عمل، قندهای محلول در اتانول حل گردیده و در بخش بالایی محلول جمع شدند، سپس ۱ میلی‌لیتر از بخش بالایی محلول برداشته و با آب مقطر حجم آن را به ۲ میلی‌لیتر رسانده شد. در ادامه نیز ۱ میلی‌لیتر فنل ۵٪ و ۵ میلی‌لیتر اسید سولفوریک غلیظ به محلول فوق اضافه شد. با افزودن اسید سولفوریک محلول زرد رنگی بدست آمد که به مرور زمان تغییر رنگ داد. محلول را بمدت نیم ساعت در دمای آزمایشگاه قرار داده تا خنک شده و به رنگ نهایی برسد.

در پایان نیز جذب نوری محلول در طول موج ۴۸۵ نانومتر با استفاده از شاهد توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر خوانده شد. برای محاسبه‌ی غلظت قندهای محلول نمونه‌ها (C) با استفاده از منحنی استاندارد، محلول‌هایی به غلظت ۰، ۱۰، ۲۰، ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰ و ۳۰۰ میلی‌گرم در لیتر گلوکز بعنوان قند شاهد تهیه و کلیه مراحل کار بر روی ۲ میلی‌لیتر از هر کدام آنها تکرار شد. سپس با استفاده از اعداد جذب(Abs) خوانده شده منحنی استاندارد با r = 0/99 (ضریب همبستگی) و C = (Abs × 107/111) + 2/93605 بدست آمد که مقدار قند نمونه‌ها ارزیابی گردید. مقدار قند بصورت میلی‌گرم در گرم خشک نمونه‌ی گیاهی بدست آمد (۱۵).

سنجش فعالیت آنزیم پراکسیداز: برای اندازه گیری فعالیت آنزیم پراکسیداز در ریشه و برگ، ابتدا گیاه از تیمارهای مختلف با ۳ تکرار بطور تصادفی انتخاب و بعد از توزین ریشه و برگ برای انجام عملیات زیر آماده شد (۲۱).

برای تهیه‌ی محلول عصاره گیری ۱/۲ گرم تریس، ۲ گرم آسکوربیک اسید، ۳/۸ گرم بوراکس (دی–سدیم ترابورات)، ۲ گرم $EDTANa_2$ و ۵۰ گرم پلی اتیلن گلیکول ۲۰۰۰ مخلوط و حجم به ۱۰۰ میلی‌لیتر با آب مقطر رسانده شد (محلول در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد برای ۲۴ ساعت گذاشته شد).

برای استخراج عصاره آنزیمی، ۱ گرم از بخش‌های مورد مطالعه‌ی گیاه (برگ و ریشه) در ۴ میلی‌لیتر محلول عصاره گیری بمدت ۳۰ دقیقه ساییده شده و محلول تهیه شده بمدت ۲۴ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی گراد نگهداری شد. سپس محلول بمدت نیم ساعت با دور g ۴۰۰۰ سانتریفیوژ شد. بعد از سانتریفیوژ محلول رویی بعنوان عصاره آنزیمی در دمای ۴ درجه سانتی گراد نگهداری شد. و برای سنجش فعالیت آنزیمی، ۱ میلی‌لیتر بافر استات ۰/۲ مولار، pH = ۵ با ۰/۴ میلی‌لیتر آب اکسیژنه ۳٪ و ۰/۲ میلی‌لیتر بنزیدین محلول در الکل ۵۰ درجه و ۰/۰۱ مولار مخلوط شد. به مخلوط حاصل ۰/۱ میلی‌لیتر عصاره آنزیمی اضافه و تغییرات جذب در طول موج ۵۳۰nm در مقابل

شاهد دستگاه خوانده شد. فعالیت آنزیم بر حسب واحد (OD/min/g. F.W) محاسبه شد.

سنجش فعالیت آنزیم کاتالاز: فعالیت کاتالاز بوسیله روش چنس و مهلی در سال ۱۹۹۵(۷) بدست آمد. پنج میلی‌لیتر محلول حاوی ۳۰۰μM بافر فسفات (pH = ۶/۸) و ۱۰۰μM پراکسید هیدروژن (H_2O_2) تهیه شد و ۱ میلی-لیتر از عصاره آنزیمی (۲ مرتبه رقیق شده) اضافه شد و در ۲۵ درجه سانتی گراد برای ۱ دقیقه گذاشته شد. سپس برای متوقف شدن واکنش، ۱۰ میلی‌لیتر سولفوریک اسید (٪۲) اضافه شد و برای تخمین میزان H_2O_2 باقی مانده، با پتاسیم پرمنگنات (N ۰/۰۱) تیتر شد تا وقتی که رنگ صورتی بدست آمد. فعالیت آنزیم تجزیه‌ی μM ۱ از H_2O_2 در ۱ دقیقه بود.

محاسبات آماری: این مطالعه با توجه به رقم گیاه کلزا بصورت فاکتوریل در قالب تصادفی و با ۳ تکرار صورت گرفت و مقایسه میانگین داده‌ها با استفاده از نرم افزار SPSS به روش دانکن و رسم نمودارها با استفاده از نرم افزار Excel انجام شد.

نتایج

سرب ملایم و اثر برهم کنش آن با کاربرد اکسید نیتریک تاثیر معنی‌داری (P ≤۰/۰۵) بر میزان پرولین ریشه داشت (جدول های ۱ و ۲). مقایسه میانگین داده‌های میزان پرولین ریشه ، افزایش معنی‌داری را در همه تیمارها نسبت به شاهد نشان داد و بیشترین میزان پرولین اندام هوایی در تیمار اکسید نیتریک مشاهده شد که با تیمار شاهد اختلاف معنی‌داری را نشان داد.

کاربرد سرب ملایم و اکسید نیتریک بر میزان قندهای محلول اندام هوایی اثر معنی داری (P ≤۰/۰۵) داشت (جدول ۱ و ۲). استفاده از تیمار NO تغییر معنی‌داری را در میزان قندهای محلول ریشه ایجاد نکرد.

کاربرد سرب و اکسید نیتریک سبب کاهش معنی داری (P ≤۰/۰۵) در میزان فعالیت پراکسیداز ریشه و اندام هوایی شد (جدول ۱ و ۲). بیشترین میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز ریشه و اندام هوایی در تیمار سرب شدید مشاهده شد. کاربرد سرب و اکسید نیتریک باعث کاهش معنی‌داری (P ≤۰/۰۵) در میزان فعالیت کاتالاز اندام هوایی شد (جدول ۱ و ۲). تیمار NO باعث تغییر معنی‌داری در فعالیت آنزیم کاتالاز ریشه نشد. پس تیمار NO تنها در بخش اندام هوایی باعث کاهش معنی‌دار در شرایط تنش سرب شد.

جدول ۱- مقایسه میانگین برهمکنش اکسید نیتریک و سرب بر میزان پرولین، قندهای محلول و فعالیت آنزیم های آنتی‌اکسیدانی در گیاه کلزا

تنش سرب (μM)	کاربرد اکسید نیتریک (μM)	کاتالاز (μM H_2O_2destroyed min-1)		پراکسیداز (OD g-1 FW min-1)		قندهای محلول (mg g-1 DW)		پرولین (μmol g-1 DW)	
		اندام هوایی	ریشه	اندام هوایی	ریشه	اندام هوایی	ریشه	اندام هوایی	ریشه
شاهد (۰)	بدون اکسید نیتریک (۰)	۶۴/۸۳c	۱۹/۱۷c	۰/۰۱۴cd	۰/۰۰۸c	۰/۱۳b	۰/۱۱c	۶/۸۷b	۳/۹۲d
	با اکسید نیتریک (۱۰۰)	۶۳/۶۷c	۱۸/۹۵c	۰/۰۱۵c	۰/۰۰۷d	۰/۱۴b	۰/۱۱c	۷/۶۰a	۵/۸۲c
تنش ملایم (۱۰۰)	بدون اکسید نیتریک (۰)	۷۵/۳۳b	۳۵/۵۰b	۰/۰۲c	۰/۰۱۰b	۰/۱۳۸b	۰/۱۱۱bc	۷/۰۳b	۵/۸۰c
	با اکسید نیتریک (۱۰۰)	۶۴/۱۷c	۳۵/۸۳b	۰/۰۱d	۰/۰۰۸c	۰/۱۴۳a	۰/۱۱۳ab	۷/۲۵ab	۶/۳۰b
تنش شدید (۲۰۰)	بدون اکسید نیتریک (۰)	۹۸/۶۷a	۳۸/۸۳a	۰/۰۱۸a	۰/۰۱۳a	۰/۱۴a	۰/۱۲a	۷/۴۵a	۸/۳۷a
	با اکسید نیتریک (۱۰۰)	۸۱/۸۳b	۳۸/۵۰a	۰/۰۱۶b	۰/۰۱۱b	۰/۱۴a	۰/۱۲a	۷/۵۲a	۸/۷۰a

رقم Hyola ۴۰۱ میانگین‌های دارای حروف مشترک در هر ستون مطابق آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح ۵ درصد اختلاف معنی‌دار ندارند.

جدول۲- نتایج آزمون F برای میزان پرولین، قندهای محلول و فعالیت آنزیم های آنتی‌اکسیدانی در گیاه کلزا رقم Hyola ۴۰۱

		پرولین		قندهای محلول		پراکسیداز		کاتالاز	
		ریشه	اندام هوایی	ریشه	اندام هوایی	ریشه	اندام هوایی	ریشه	اندام هوایی
	درجه آزادی	۲	۲	۲	۲	۲	۲	۲	۲
سرب	میانگین مربعات	۲۹/۹۳۷**	۰/۵۴۲*	۰/۰۰۰*	۰/۰۰۰**	۰/۰۰۰**	۰/۰۰۰**	۶۶۴/۶۶۷**	۱۷۹۹/۳۸۹**
	ضریب تغییرات	۰/۳۲۱	۰/۰۵۸	۰/۰۳۱	۰/۰۳۷	۰/۲۱۷	۰/۱۱۲	۰/۲۹۵	۰/۱۹۷
	درجه آزادی	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱
اکسید نیتریک	میانگین مربعات	۱۰/۸۳۰**	۱/۶۱۳**	۰/۰۰۰ns	۰/۰۰۰ns	۰/۰۰۰ns	۰/۰۰۰ns	۰/۱۴۱ns	۴/۰۸۳ns
	ضریب تغییرات	۰/۲۱۷	۰/۰۵۹	۰/۰۳۰	۰/۰۱۷	۰/۱۳۲	۰/۰۸۷	۰/۰۵۷	۰/۱۰۱
	درجه آزادی	۲	۲	۲	۲	۲	۲	۲	۲
سرب و	میانگین مربعات	۳۴/۳۲۱**	۰/۶۴۱*	۰/۰۰۰**	۰/۰۰۰**	۰/۰۰۰**	۰/۰۰۰**	۶۵۸/۶۶۷**	۶۳۶/۲۲۲**
اکسید نیتریک	ضریب تغییرات	۰/۳۲۲	۰/۰۵۶	۰/۰۳۴	۰/۰۴۰	۰/۱۷۱	۰/۱۰۲	۰/۲۸۶	۰/۱۳۸

ns، * و ** بترتیب عدم وجود اختلاف معنی‌دار، معنی‌دار در سطح احتمال ۵٪ و ۱٪

بحث

کاربرد تیمار NO در شرایط غیر تنش موجب افزایش معنی‌دار میزان پرولین ریشه و اندام هوایی نسبت به شاهد شد. در شرایط تنش سرب شدید و ملایم، کاربرد تیمار NO موجب افزایش کمی در میزان پرولین اندام هوایی شد که این افزایش نسبت به شاهد (بدون تیمار NO) معنی‌دار نبود. در ریشه کاربرد تیمار NO سبب افزایش معنی‌دار پرولین در شرایط تنش سرب ملایم شد، اما افزایش میزان پرولین در شرایط تنش سرب شدید معنی‌دار نبود. پس میزان افزایش NO تا حد معینی در شرایط تنش سرب باعث افزایش سازگاری گیاه شد. هیر و کرس (۱۹۹۷) با مطالعاتی که انجام دادند، بیان کردند وقتی SNP بعنوان دهنده NO مصرف شود، باعث افزایش بیش از حد پرولین می شود (۱۶) که با نتایج حاضر همخوانی دارد. پیش تیمار گیاهان با SNP باعث افزایش پرولین تحت تنش خشکی گردید که این امر می‌تواند بدلیل افزایش سنتز پرولین باشد (۳). القای فعالیت آنزیم پیرولین ۵- کربوکسیلاز بعنوان آنزیم اصلی در مسیر بیوسنتز پرولین، توسط NO در گیاهچه در حال رشد برنج گزارش شده است (۳۳). در حضور نیکل به‌تنهایی، پروتئین محلول، پرولین و فعالیت سوپراکسید-دیسموتاز افزایش یافت، در حالیکه فعالیت پراکسیداز و بخصوص کاتالاز مهار شد (۲۶).

تحت تیمار توام سرب و نیتروپروساید سدیم، میزان قندهای محلول در شرایط تنش سرب ملایم و شدید در ریشه و در شرایط تنش سرب شدید در اندام هوایی نسبت به شاهد (بدون تیمار NO) افزایش معنی‌داری نداشت، اما در اندام هوایی میزان قندهای محلول در شرایط تنش سرب ملایم با کاربرد تیمار NO نسبت به شاهد (بدون تیمار NO) افزایش معنی‌داری داشت. کاربرد تیمار NO در شرایط غیر تنش سبب افزایش معنی‌داری در میزان قندهای محلول ریشه و اندام هوایی نشد. افزایش قندهای محلول در اغلب شرایط تنش‌زا بعنوان یک مکانیسم تحمل در برابر تنش است و در واقع باعث تنظیم پتانسیل آب سلول در بخش سیتوزول برای مقابله با غلظت بالای یون‌های جذب شده و تجمع یافته در واکوئل می‌گردد (۱۹). تجمع قندهای محلول در گونه‌های دیگر گیاهی نیز مشاهده شده است (۱). بنظر می‌رسد که NO نقش مستقیمی در بیوسنتز قندها در شرایط تنش ندارد (۳). قندهای محلول فقط در

شرایط تنش ملایم با کاربرد تیمار NO نسبت به شاهد باعث افزایش تحمل در شرایط تنش شد. پس کاربرد تیمار NO در تنش سرب ملایم از طریق افزایش مواد اسمزی سبب افزایش سازگاری اندام هوایی گیاه کلزا بشرایط تنش شده بود.

تیمار توام سرب و نیتروپروساید سدیم، فعالیت آنزیم پراکسیداز ریشه و اندام هوایی را بطور معنی‌داری در شرایط تنش سرب ملایم و شدید کاهش داد. غلظت پایین دهنده NO (SNP) باعث افزایش فعالیت آنزیم پراکسیداز در کلم می‌شود، در حالیکه غلظت‌های بالا حالت بازدارندگی دارد (۳۷). تیمار گندم با غلظت اندک SNPمقدار H_2O_2 را کاهش می دهد، اما فعالیت آنتی-اکسیدانی افزایش می یابد (۳۲). با توجه به کاهش معنی‌دار پراکسیداز ریشه در شرایط کاربرد تیمار NO بنظر می‌رسد NO خود بعنوان آنتی‌اکسیدان در شرایط تنش و غیر تنش عمل کرده و موجب کاهش فعالیت آنزیم پراکسیداز می-شود.

در تحقیق حاضر در میزان فعالیت کاتالاز اندام هوایی تحت تیمار توام سرب و تیمار NO کاهش معنی‌داری مشاهده شد که اختلاف آن با شاهد معنی‌دار بود. در سیستم‌هاییکه سمیت بیشتر بخاطر ROS اتفاق می‌افتد، NO ممکن است بعنوان یک شکننده زنجیر عمل نموده و بدین ترتیب خسارت را بحداقل می‌رساند (۲۴). افزودن ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میکرومولار SNP به‌محلول حاوی سرب محتوای کلروفیل و سرعت فتوسنتز خالص را افزایش داد، و با کاهش خسارت اکسیداتیو ناشی از سرب، فعالیت آنزیم-های آنتی‌اکسیدان را بهبود بخشید (۴).NO نقش مستقیمی در برطرف کردن H_2O_2 تحت شرایط تنش خشکی دارد (۳). بنظر می‌رسد تیمار NO خود بعنوان یک آنتی‌اکسیدان عمل نموده و در نتیجه موجب کاهش فعالیت آنزیم کاتالاز در اندام هوایی در شرایط تنش شده است، اما در ریشه هیچ گونه اثر معنی‌داری نداشت.

نتیجه گرفته شد که تیمار NO بیشترین تاثیر را بر میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز در ریشه و اندام هوایی و کاتالاز در اندام هوایی داشت. پیشنهاد می‌شود که برای افزایش مقاومت گیاه کلزا به تنش سرب و سایر تنش‌ها مکانیسم مولکولی نیتریک اکسید در ارقام مختلف کلزا با غلظت‌های مختلف نیتریک اکسید بررسی شود.

سپاسگزاری

از کلیه استادان و دست اندرکاران دانشگاه آزاد اسلامی دامغان قدردانی می گردد.

منابع

۱- احمدی موسوی، ع. منوچهری کلانتری، خ. و ترکزاده، م. ۱۳۸۴. اثر نوعی براسینواستروئید(24-epibrassinolide) بر مقدار تجمع مالون دآلدئید، پرولین، قند و رنگیزه‌های فتوسنتزی در گیاه کلزا (*Brassica napus* L.) تحت تنش کم آبی. مجله زیست‌شناسی ایران، جلد ۱۸. شماره ۴. ص ۳۰۶-۲۹۵.

۲- بلوچی، ح. باقری، ف. کایدنظامی، ر. موحدی‌دهنوی، م. و یدوی، ع. ۱۳۹۲. اثر پیری تسریع شده بذر بر جوانه‌زنی و مؤلفه‌های رشد گیاهچه‌های سه رقم کلزا (*Brassica napus*). مجله پژوهشهای گیاهی (مجله زیست‌شناسی ایران)، جلد ۲۶. شماره ۴. ص ۴۱۱-۳۹۷.

۳- نصیبی، ف. منوچهری کلانتری، خ. و یعقوبی، م.م. ۱۳۹۰. مقایسه اثر پیش تیمار سدیم نیترو پروساید و آرژینین بر برخی پاسخهای فیزیولوژیکی گیاه گوجه فرنگی (*Lycopersicun esculentum*) تحت تنش کم آبی. مجله زیست شناسی ایران، جلد ۲۴. شماره ۶. ص ۸۴۷-۸۳۳.

4- Bai, X.Y., Y.J. Dong, Q.H. Wang, L.L. Xu, J. Kong, and S. Liu. 2014. Effects of lead and nitric oxide on photosynthesis, antioxidative ability, and mineral element content of perennial ryegrass. Biol. Plant. 1-8.

5- Bates, L.S., R.P. Waldern, and I.D. Teare. 1973. Rapid determination of free proline for water stress studies. plant soil. 39:205-207.

6- Burton, D., and R. Nadiv. 1984. Uptake of Pb, Cd, Cu and DDT by vegetables grown in urbon environments. EPHC: 151-161.

7- Chance, B., and C. Maehly. 1995. Assay of catalase and peroxidase. Methods enzymol. 11: 764-775.

8- Chen, J., D.Y. Xiong, W.H. Wang, W.J. Hu, M. Simon, Q. Xiao, J. Chen, T.W. Liu, X. Liu, and H.L. Zheng. 2013. Nitric Oxide Mediates Root K^+/Na^+ Balance in a Mangrove Plant, *Kandelia obovata*, by Enhancing the Expression of AKT1-Type K^+ Channel and Na^+/H^+ Antiporter under High Salinity. PLoS ONE. 8(8): 1-11.

9- Choudhary, M., U.K. Jetley, M.A. Khan, S. Zutshi, and T. Fatma. 2007. Effect of heavy metal stress on proline, malondialdehyde, and superoxide dismutase activity in the cyanobacterium *Spirulina platensis*-S5. Ecotoxicol. Environ. Saf. 66(2): 204-209.

10- Conner, E. M., and M.B. Grisham. 1996. Inflammation, free radicals and antioxidants. Nutrition. 12:274-277.

11- DelRio, L.A., F.J. Corpas, and J.B. Barroso. 2004. Nitric oxide and nitric oxide synthase activity in plants. Phytochem. 65: 783-792.

12- Dixi, V., V. Pandey, and R. Shyam. 2001. Differential antioxidative responses to heavy metal in roots and leaves of pea (*Pisum sativum* L. CV. Azad). J. Exp. Bot. 52: 1101-1109.

13- Dubey, R. S., and A.k. Singh. 1999. Salinity induces accumulation of soluble sugars and alters the activity of sugar metabolizing enzyme in rice plants. Plant Biol. 42 : 233-239.

14- Gohari, M., A.R. Habib-Zadeh, and M.Khayat. 2012. Assessing the intensity of tolerance to lead and its effect on amount of protein and proline in root and aerial parts of two varieties of rape seed (*Brassica napus* L.). J. Basic Appl. Sci. Res. 2 : 935–938.

15- 1978. Handbook of physiological methods. Cambridge Univ. press, Cambridge.

16- Hare, P.D., and W.A. Cress. 1997. Metabolic implications of stress-induced proline accumulation in plants. Plant Growth Regul. 21: 79-102.

17- Hendry, G.A.F., A.J.M. Baker, and C.F. Ewart. 1992. Heavy metal tolerance and toxicity, oxygen radical processes and molecular damage in cadmium tolerant clones of *Holcus lanatus* L. . Acta Botany Neerl. 41 : 271-281.

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

19- Kameli, A., and D.M. Losel. 1993. Carbohydrates and water stress in wheat plants under water stress. New Phytol. 125 (3):609-614.

20- Kopyra, M., and E.A. Gwozdz. 2003. Nitric oxide stimulates seed germination and counteracts the inhibitory effect of heavy metals and salinity on root growth of *Lupinus luteus*. Plant Physiol. Biochem. 41: 1011-1017.

21- Koroi, S.A. 1989. Gelelektrophers tische and spectral photometrischoe unter uchungen zomeinfifss der temperature auf stracktur and aktritat der amylase and peroxidase isoenzyme. physiol. Veg. 20: 15-23.

22- Laspina, N.V., M.D. Groppa, M.L. Tomaro, and M.P. Benavides. 2005. Nitric oxide protects sunflower leaves against Cd-induced oxidative stress. Plant Sci. 169: 323-330.

23- Li, W., M.A. Khan, and S. Yamaguchi. 2007. Effects of heavy metals on seed germination and early seedling growth of *Arabidopsis thaliana*. Plant Growth Regul. 46: 45-65.

24- Lipton, S.A., Ch. Yun-Beom, Z.H. Pan, S.Z. Lei, H.S. Vincent Chen, N.J. Sucher, J. Loscalzo, D.J. Singel, and J.S. Stamler. 1993. A redox based mechanism for the neuroprotective and neurodestructive effects of nitric oxide and related nitroso-compounds. Nature, 364: 626-632.

25- Mehta, S.K., and J.P. Gaur. 1999. Heavy-metalinduced proline accumulation and its role in ameliorating metal toxicity in *Chlorella vulgaris*. New Phytol. 143: 253-259.

26- Mihailovic, N., and G. Drazic. 2011. Incomplete alleviation of nickel toxicity in bean by nitric oxide supplementation. Plant Soil Environ. **57**: 396–401.

27- Nector, G., and C.H. Foyer. 1998. Ascorbat and glutathione: Keeping active oxygen under control. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 49: 249-279.

28- Oliver, D., and R. Nadiv. 2003. Uptake of Cu, Pb, Cd, and DDT by vegetables grown in urbon environments. EPHC; 151-161.

29- Phang, I.C., D.W.M. Leung, H.H. Taylor, and D.J. Burritt. 2011. The protective effect of sodium nitroprusside (SNP) treatment on

Arabidopsis thaliana seedlings exposed to toxic level of Pb is not linked to avoidance of Pb uptake. Ecotoxicol. Environ. Saf. 74: 1310–1315.

30- Sharma, P., and R.S. Dubey. 2004. Ascorbate peroxidase from rice seedling. Plant Sci. 167:541-550.

31- Siripornadulsil, S., S. Traina, D.S. Verma, and R.T. Sayre. 2002. Molecular mechanisms of proline-mediated tolerance to toxic heavy metals in transgenic microalgae. Plant Cell. 14:2837-2847.

32- Tian, X. and Y. Lei, 2006. Nitric oxide treatment alleviates drought stress in wheat seedlings. Biol. Plant. 50, 775-778.

33- Uchida, A., A.T. Jagendorf, T. Hibino, T. Takabe, and T. Takabe. 2002. Effects of hydrogen peroxide and nitric oxide on both salt and heat stress tolerance in rice. Plant Sci. 163: 515-523.

34- Wieczorek, J.F., G. Milczarek, M. Arasimowicz, and A. Ciszewski. 2006. Do nitric oxide donors mimic endogenous No-related response in plants? Planta. 224: 1363-1372.

35- Xiong, J., G. Fu, L. Tao, and C. Zhu, 2010. Roles of nitric oxide in alleviating heavy metal toxicity in plants. Arch. Biochem. Biophys. 497: 13–20.

36- Xiong, J., L. An, H. Lu, and C. Zhu, 2009. Exogenous nitric oxide enhances cadmium tolerance of rice by increasing pectin and hemicellulose contents in root cell wall. Planta. 230: 755–765.

37- Zanardo, D.I.L., F.M.L. Zanardo, M.D.L.L. Ferrarese, J.R. Magalhaes, and O.F. Filho. 2005. Nitric oxide affecting seed germination and peroxidase activity in canola (*Brassica napus* L.). Physiol. Mol. Biol. Plants. 11: 81-86.

Nitric oxide effect on proline, soluble sugars and activity of antioxidant enzymes in Pb stress terms in *Brassica napus* L.

Hamidi H., Masoudian N. and Saeedisar S.

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

Abstract

Lead Stress is one of the most important environmental stresses that limit plant growth. Nitric oxide (NO) in signal transduction and biological and abiotic stress response is involved. In this study, the effect of nitric oxide of lead stress on proline, soluble sugars and activities of antioxidant enzymes in 401 Hyola canola plants in hydroponic culture using Hoagland solution was investigated in roots and shoots. Statistical analysis using SPSS and the comparisons were performed using Duncan. Three levels of lead by $Pb(NO_3)_2$ [0, 100 and 200 μM] and two levels of NO by sodium nitroprusside [0 and 100 μM] took place. Lead to mild stress, root proline increased significantly and NO increases the plant adaptation to the environment. Soluble sugars in roots and shoots were not significantly increased. Peroxidase enzyme activity was significantly reduced in all treatments, roots and shoots. CAT activity in shoots under stress conditions lead to significantly reduced but Root catalase activity did not change significantly. Peroxidase and catalase enzyme activity loss can be caused by the activity of NO as an antioxidant.

Key words: Adaptation, Catalase, Peroxidase, Sodium nitroprusside