

اثر اتیلن دی‌آمین تترا استیک اسید بر تحمل و تجمع نیکل در گیاه همیشه بهار

*(Calendula tripterocarpa Rupr.)*جواد حیدری^۱ و ریحانه عموآقایی^{۱،۲*}^۱ گروه زیست‌شناسی گیاهی، دانشکده علوم، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران^۲ مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۲/۱۲ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۳/۰۸

چکیده

ثابت شده است که کاربرد کلات‌هایی مانند اتیلن دی‌آمین تترا استیک اسید (EDTA) بر تحمل و تجمع فلز در گیاهان تأثیر دارد. بنابراین، در یک آزمایش گلخانه‌ای اثر غلظت‌های مختلف EDTA (۰، ۰/۵، ۱، ۲ گرم بر کیلوگرم خاک) بر گیاهان همیشه بهار (*Calendula tripterocarpa* Rupr.) رشد یافته در خاک با غلظت‌های مختلف نیکل (۰، ۱۰۰، ۱۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) مورد بررسی قرار گرفت و شاخص رشد نسبی، محتوای رنگدانه‌های فتوسنتزی، پراکسیداسیون لیپید و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی کاتالاز و سوپراکسید دیسموتاز در ریشه و برگ گیاه ارزیابی شد. نتایج نشان داد که تحت شرایط بدون تنش و همچنین در هر دو سطح تنش نیکل، افزایش غلظت EDTA شاخص رشد نسبی ریشه و بخش هوایی و میزان کلروفیل کل در برگ را کاهش و محتوای مالون‌دی‌آلدئید برگ و ریشه را افزایش داد. کاربرد غلظت ۰/۵ گرم EDTA بر کیلوگرم خاک، میزان کاروتنوئیدها و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی کاتالاز و سوپراکسید دیسموتاز در برگ و ریشه و غلظت نیکل در ریشه و بخش هوایی را افزایش داد. بطور جالبی با کاربرد غلظت‌های ۱ و ۲ گرم EDTA بر کیلوگرم خاک، غلظت نیکل در ریشه و بخش هوایی و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی کاتالاز و سوپراکسید دیسموتاز کاهش ولی محتوای مالون‌دی‌آلدئید افزایش یافت. در مجموع، کاربرد غلظت ۰/۵ گرم EDTA بر کیلوگرم خاک برای تقویت توان گیاه‌پالایی این گونه همیشه بهار مفید بود ولی سطوح بالای EDTA برای رشد گیاهان سمی بود و تجمع نیکل را کاهش داد. بنابراین کاربرد غلظت بالای این کلات برای بهبود تحمل و تجمع نیکل در گیاه همیشه بهار توصیه نمی‌شود.

واژه‌های کلیدی: آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی، پراکسیداسیون لیپید، رنگدانه‌های فتوسنتزی، نیکل، همیشه بهار، EDTA

* نویسنده مسئول، پست الکترونیکی: rayhanehamooaghaie@yahoo.com

مقدمه

با توسعه زندگی صنعتی، افزایش غلظت فلزات سنگین در خاک‌های سراسر جهان به یک مشکل بزرگ زیست محیطی تبدیل شده است. چون غلظت بالای این فلزات، نه تنها جوانه‌زنی، رشد و تولید محصول گیاهان را کاهش می‌دهد بلکه سلامتی انسان‌ها را نیز به خطر می‌اندازد [۱، ۱۱، ۲۰، ۲۲، ۲۵، ۳۲، ۳۳]. نیکل یکی از فلزات سنگین است که در سال‌های اخیر انتشار آن در محیط‌زیست در اثر فعالیت‌های انسانی، مانند معادن فلزی، سوزاندن سوخت‌های فسیلی، دفع خانگی، ضایعات شهری و صنعتی و کودهای آلی بطور چشمگیری افزایش یافته است [۲۹]. نیکل جزو عناصر ضروری مورد نیاز برای رشد گیاه نیست اما فعالیت‌چندین آنزیم در گیاه، از جمله آنزیم اوره‌آز به وجود یون نیکل بستگی دارد. اگرچه غلظت‌های کم نیکل اثرات تحریکی روی رشد و نمو گونه‌های مختلف گیاهی دارد؛ اما غلظت‌های بالای نیکل موجب تغییر روابط آبی گیاه و کاهش فتوسنتز، تداخل با جذب دیگر یون‌های فلزی ضروری و در نهایت کاهش رشد گیاه و بروز نشانه‌های مختلف سمیت مانند کلروز و نکروز در گیاهان می‌شود [۳۰ و ۳۳].

برای سمیت نیکل در گیاهان، مکانیسم‌هایی مانند جایگزینی نیکل به جای فلز ضروری در متالوپروتئین‌ها، اتصال نیکل به جایگاه فعال برخی آنزیم‌ها، اتصال نیکل در خارج از جایگاه کاتالیزوری برای مهار فعالیت آنزیم و ایجاد تنش اکسیداتیو را پیشنهاد کرده‌اند [۲۹]. نیکل یک فلز فعال ردوکس نیست و به طور مستقیم نمی‌تواند از طریق واکنش‌هایی مثل واکنش فنتون سبب تولید گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) شود ولی بطور غیرمستقیم و از طریق ایجاد اختلال در فرآیندهای فتوسنتز و تنفس باعث انحراف الکترون از زنجیره انتقال الکترون و تولید ROS می‌شود [۸]. گونه‌های فعال اکسیژن به لیپیدهای غشاء سلولی، پروتئین‌ها و DNA آسیب می‌رسانند و در نتیجه سبب پراکسیداسیون لیپیدی، تجزیه بسیاری از آنزیم‌ها و اختلال در متابولیسم و رشد و نمو گیاهان می‌شوند. برخی گیاهان با افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان مانند آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز (SOD)، پراکسیداز (POD)، کاتالاز (CAT) و آسکوربات اکسیداز (APX) که پاکروبی‌کننده گونه‌های فعال اکسیژن هستند، تنش اکسیداتیو ناشی از سمیت فلزات سنگین را در سلول‌ها کاهش می‌دهند [۱۱، ۲۰، ۲۲، ۲۵، ۳۲، ۳۳].

با توجه به اثرات سمی فلزات سنگین بر گیاهان، مدیریت و حذف این آلاینده‌ها از خاک ضروری است. در سال‌های اخیر، "گیاه‌پالایی" بعنوان یکی از روش‌های ایمن و سازگار با محیط زیست و یک تکنیک بسیار کارآمد برای حذف فلزات سنگین از خاک‌های آلوده مورد توجه واقع شده است. برای موفقیت بیشتر این روش، اغلب از تیمارهای مفید برای افزایش توان تجمع و تحمل گیاهان استفاده می‌شود. ثابت شده است که کاربرد کلات‌کننده‌هایی مانند اتیلن دی‌آمین تتراسیتیک اسید (EDTA) یا اسیدهای آلی میزان جذب و انتقال فلزات سنگین در گیاه را افزایش می‌دهد و توان انباشتگری و گیاه‌پالایی گیاهان را بالا می‌برد [۲۶ و ۲۷]. بطور کلی، EDTA با تشکیل کمپلکس محلول با فلزات سنگین موجود در خاک، منجر به افزایش رهایی فلزات در مکان‌های تبدلی ترکیبات معدنی و آلی و بالا رفتن غلظت فلزات در محلول خاک می‌شود و به همین دلیل دسترسی و جذب فلز سنگین توسط گیاه را افزایش می‌دهد [۱۷]. برای مثال، شیرخانی [۲] گزارش کرد کاربرد ۳ سطح EDTA (۳، ۶ و ۱۲ میلی‌مول در کیلوگرم) مقدار کادمیوم در بخش هوایی و زیرزمینی سلمک اورشلیمی (*Chenopodium botrys L*) را افزایش داد. میرخانی [۵] هم گزارش کرد که کاربرد ۲/۷ میلی‌مول EDTA در کیلوگرم خاک موجب حلالیت و رهایی بیشتر سرب و کادمیوم در محلول خاک شد و تجمع سرب و کادمیوم در کاه و کلش و تجمع سرب را در دانه گندم افزایش داد. یک مطالعه دیگر هم نشان داد تیمار EDTA جذب و تجمع روی و کادمیوم را در گیاه *Netieria zizahiades* افزایش داد و در پاسخ به تنش اکسیداتیو ناشی از تجمع فلز، فعالیت SOD، POD و CAT، در حد معنی‌داری در این گیاه بالا رفت تا تحمل گیاه به تنش فلزات سنگین را افزایش دهد [۳۴]. منصور و همکاران [۶] گزارش کردند که افزودن ۲۰ میلی‌گرم EDTA به هر کیلوگرم خاک، غلظت سرب در بخش هوایی و زیرزمینی تربچه را افزایش داد اما موجب کاهش رشد و بیوماس این اندام‌ها شد. یک نکته مهم در استفاده از کلات‌کننده‌های سنتزی این است که این ترکیبات ممکن است باعث جذب بیش از حد فلزات سنگین توسط گیاه و ایجاد آثار سمیت فلز در گیاه شوند.

با وجود اثرات مفید EDTA در تکنیک گیاه‌پالایی برای افزایش استخراج گیاهی فلزات سنگین از خاک آلوده، افزودن EDTA به خاک می‌تواند محدودیت‌هایی را داشته باشد [۱۵]. کاربرد مواد کلات‌کننده سنتزی مثل EDTA پرهزینه و گاهی برای ساختار خاک مضر می‌باشند. علاوه بر این، EDTA و کمپلکس‌های فلز-EDTA براحتی قابل تجزیه نبوده و ممکن است برای چند هفته یا ماه در خاک باقی بمانند که برای برخی گیاهان دارای اثر سمی هستند [۲۸ و ۳۵]. همچنین گزارش شده است که غلظت بالای EDTA اثرات سمی روی جمعیت میکروبی و فعالیت‌های آنزیمی خاک و همچنین بر گیاهان دارد [۱۲ و ۱۵]. از سوی دیگر با توجه به اینکه کلات‌کننده‌های سنتزی تحرک فلز سنگین در خاک را افزایش می‌دهند، ممکن است

موجب انتقال فلز به مناطق اطراف شوند یا مقدار قابل توجهی از فلزات سنگین جدا شده از ذرات خاک، شسته شده و به لایه‌های زیرین خاک رفته و خطرات زیست‌محیطی جدیدی را ایجاد کنند [۲۴].

گونه‌های مختلف گیاه همیشه بهار تند رشد بوده و دارای زیست‌توده نسبتاً مطلوبی هستند و توان خوبی در تحمل فلزات سنگین دارند. یک پژوهش قبلی نشان داد که گونه *Calendula tripterocarpa Rupr.* تا سطح ۱۰۰ و ۱۵۰ میلی‌گرم در کیلوگرم خاک را تحمل می‌کند و غلظت نیکل در بخش هوایی این گونه بیشتر از ریشه آن بود [۱۱]. بنابراین گونه مذکور ممکن است کاندید مناسبی برای برنامه‌های گیاه‌پالایی باشد. لذا در پژوهش حاضر تاثیر سطوح مختلف EDTA بر میزان تجمع نیکل، پاسخ‌های آنتی‌اکسیدانی و در نهایت تحمل نیکل بوسیله این گونه گیاهی مورد ارزیابی قرار گرفته است.

مواد و روشها

در این آزمایش نقش EDTA بر تجمع نیکل و القای پاسخ‌های آنتی‌اکسیدانی در طی تحمل تنش در گیاه همیشه بهار در یک آزمایش گلخانه‌ای در گلخانه تحقیقاتی دانشگاه شهرکرد بررسی شد. برای این منظور ابتدا خاک از یک محل بکر و به دور از آلاینده‌های فلزات سنگین بخصوص نیکل از سودجان در استان چهارمحال و بختیاری تهیه شد. بر طبق نتایج آنالیز خاک، بافت خاک لوم‌رسی و غیر شور با اسیدیته ۷/۸ و میزان نیکل آن معادل ۰/۹۹ میلی‌گرم بر کیلوگرم خاک و مقادیر سایر فلزات سنگین در آن بسیار کم بود.

گلدان‌ها با خاک مذکور و شن به نسبت ۴ به ۱ پر شد. سپس غلظت‌های مختلف نیکل (۰، ۱۰۰، ۱۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم خاک) با افزودن محلول نمک نترات نیکل ($\text{Ni(NO}_3)_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$, Merck) به خاک تیمار گردید و به مدت زمان ۲۰ روز در گلخانه با دوره‌های متناوب آبیاری و خشکی و بدون کشت گیاه نگهداری شد تا نیکل در خاک تثبیت شود. سپس طبق طرح آماری به خاک مقادیر مشخص (۰، ۰/۵، ۱ و ۲ گرم در کیلوگرم خاک) کلات‌کننده اتیلن‌دی‌آمین تترا استیک اسید (EDTA, Sigma-Aldrich) اضافه گردید و پس از ۱۵ روز کشت بذرها در خاک انجام شد.

بذرهای گونه *Calendula tripterocarpa Rupr.* از شرکت پاکان بذر اصفهان تهیه شد و با هیپوکلریت سدیم ۵٪ ضدعفونی شده و سپس با آب مقطر ۲ بار شسته و در داخل گلدان‌ها کاشته شدند. آبیاری با فواصل دو روزه انجام شد. گیاهان در گلخانه با میانگین دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد، دوره نوری ۱۴/۱۰ و رطوبت نسبی ۵۰-۶۰ درصد رشد کردند. پس از ۴۵ روز گیاهان برداشت و خشک شدند و شاخص رشد نسبی از فرمول زیر محاسبه شد [۳۲].

$100 \times (\text{وزن خشک ریشه یا بخش هوایی در گیاه شاهد} / \text{وزن خشک ریشه یا بخش هوایی گیاه تیمار شده}) = \text{شاخص رشد نسبی}$

سنجش مقدار عنصر نیکل

غلظت نیکل در ریشه و بخش هوایی (ساقه + برگ) با دستگاه جذب اتمی اندازه‌گیری گردید. ابتدا مطابق روش Sekabira و همکاران [۲۷] همانند آماده‌سازی عصاره برای سنجش سایر عناصر، محلول لازم برای سنجش نیکل به شرح زیر آماده شد. بخش‌های برداشت شده گیاهان دو مرتبه با آب دیونیزه شسته شدند، سپس نمونه‌ها در کاغذ آلومینیومی پیچیده و به مدت ۲۴ ساعت در آن خشک شدند. از هر نمونه ۱/۲ گرم با اسید نیتریک ۶۵ درصد مخلوط شد و حرارت داده شد تا زمانی که محتوای مایع، بخار شد. سپس برای تکمیل هضم پراکسید هیدروژن ۳۰ درصد به رسوب باقیمانده در ارلن‌ها اضافه گردید و مجدداً تا بخار شدن مایع حرارت داده شد. سپس با آب دیونیزه مخلوط به حجم رسانده شد. در پایان در محلول‌های حاصل، مقدار

عنصر نیکل با دستگاه جذب اتمی Perkin-Elmer مدل AAA400 (ساخت آمریکا) آنالیز مطابق با روش توصیف شده بوسیله ولی وند و همکاران [۳۲] سنجش گردید.

سنجش کلروفیل کل و کاروتنوئید

رنگدانه‌های فتوسنتزی به کمک استون ۸۰٪ استخراج و جذب عصاره حاصل در طول موج‌های ۶۴۵، ۶۶۳ و ۴۷۰ نانومتر خوانده شد. میزان کلروفیل کل از مجموع کلروفیل a ، b و کاروتنوئید طبق فرمول‌های پیشنهادی Lichtenthaler و Wellburn [۱۸] محاسبه شد.

سنجش پراکسیداسیون لیپیدی غشا

میزان غلظت مالون‌دی‌آلدئید (MDA) مطابق روش Heath و Packer [۱۰] با استفاده از تیوباربی‌توریک (TBA) اندازه‌گیری شد. جذب کمپلکس قرمز رنگ (MDA-TBA) با اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۳۲ نانومتر خوانده شد و جذب بقیه رنگیزه‌های غیر اختصاصی در ۶۰۰ نانومتر تعیین و از این مقدار کسر گردید. در نهایت غلظت MDA با استفاده از ضریب خاموشی معادل 155 mM Cm^{-1} محاسبه شد.

سنجش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان

برای سنجش فعالیت آنزیم‌ها، مطابق با روش توصیف شده بوسیله Pirooz و همکاران [۲۵] بافت برگ و ریشه در بافر استخراج، ساییده و سانتریفوژ شد و روشناور حاصل، برای سنجش فعالیت آنزیم‌ها استفاده شد. فعالیت آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز (SOD)، بر اساس تبدیل نیترو بلوترازولیوم به فورمازان در حضور نور و ظهور رنگ تخمین زده شد. یک واحد فعالیت SOD، معادل مقدار آنزیمیکه ۵۰ درصد احیای نوری نیترو بلوترازولیوم را ممانعت می‌کند، تعریف شد. یک واحد فعالیت کاتالاز (CAT) بر مبنای تغییرات جذب نوری محلول در طول موج ۲۴۰ نانومتر در طی یک دقیقه بر مبنای میزان مصرف پراکسید هیدروژن برآورد شد [۲۲]. میزان فعالیت ویژه آنزیم بر اساس واحد آنزیم بر گرم وزن تر محاسبه و بیان گردید.

طرح و آنالیز آماری

این آزمایش بصورت فاکتوریل با طرح کاملاً تصادفی با ۳ تکرار اجرا شد. فاکتورها شامل ۳ سطح نیکل (۰، ۱۰۰، ۱۵۰ میلی-گرم بر کیلوگرم خاک) و ۴ سطح EDTA (۰، ۰/۵، ۱ و ۲ گرم در کیلوگرم خاک) بود. آنالیز آماری داده‌ها توسط نرم‌افزار SAS و رسم نمودارها توسط برنامه Excel انجام شد. مقایسه اختلاف بین میانگین‌ها نیز توسط آزمون چند دامنه‌ای دانکن و در سطح احتمال $P < 0.05$ انجام گرفت.

نتایج

اثر غلظت‌های مختلف نیکل و EDTA بر شاخص تحمل و رنگیزه‌های فتوسنتزی

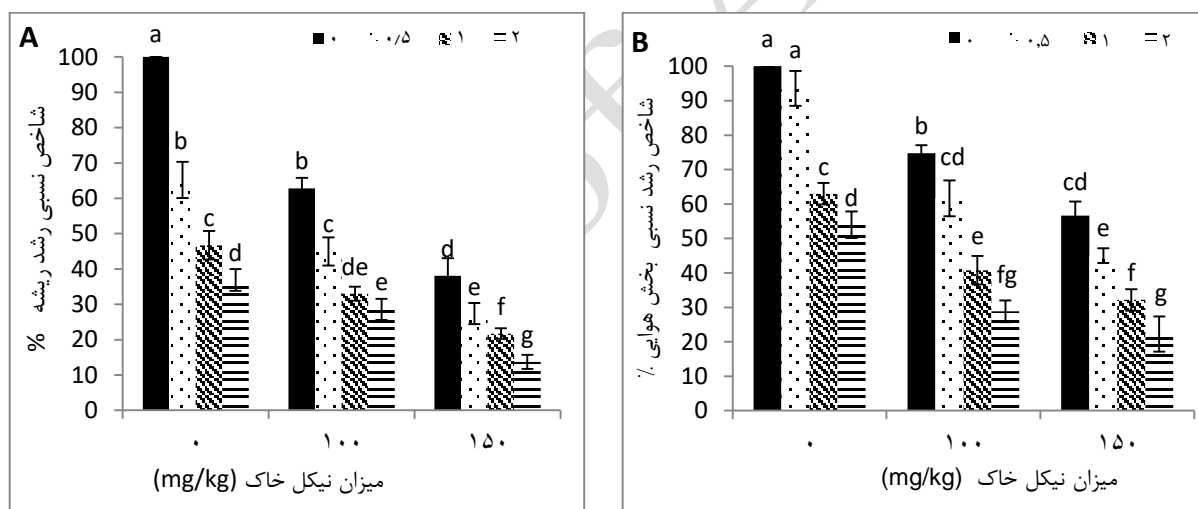
نتایج آنالیز واریانس (جدول ۱) نشان داد که اثر مستقل نیکل و EDTA و همچنین اثر متقابل این فاکتورها بر شاخص رشد نسبی ریشه و بخش هوایی، محتوای کلروفیل کل و کاروتنوئید برگ همیشه‌بهار در سطح احتمال ۱ یا ۵ درصد معنی‌دار بوده است.

جدول ۱- نتایج تجزیه واریانس (میانگین مربعات) داده‌های حاصل از اثر نیکل و EDTA بر شاخص رشد نسبی و رنگدانه‌های فتوسنتزی و غلظت نیکل در ریشه و بخش هوایی گیاه همیشه بهار

منابع تغییرات	درجه آزادی	شاخص رشد نسبی بخش هوایی	شاخص رشد نسبی ریشه	رشد محتوای کلروفیل کل	محتوای کاروتنوئید	غلظت نیکل بخش هوایی	غلظت نیکل ریشه
غلظت نیکل	۲	۵۴۱/۶۷**	۳۹۳/۶۷**	۶۵/۹**	۲۰/۸۴**	۸۶/۴۸**	۴۸/۸۳**
غلظت EDTA	۳	۱۰۷/۶**	۹۸/۶**	۱۱/۶**	۶/۲۵**	۸/۸۱**	۳/۸۱**
نیکل × EDTA	۶	۱۶/۹۵**	۱۴/۸۸**	۳/۵*	۰/۶۳*	۱/۷۵**	۰/۵۳*
خطا	۲۴	۳/۰۷	۲/۵۷	۱/۲	۰/۱۱	۰/۱	۰/۰۷

* و ** به ترتیب معنی‌دار در سطح احتمال ۵ و ۱ درصد

نتایج این تحقیق نشان داد که با کاربرد ۱۰۰ و ۱۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم نیکل خاک، شاخص رشد نسبی بخش هوایی و ریشه بطور معنی‌داری نسبت به شاهد کاهش یافت (شکل ۱). در شرایط بدون تنش و تحت تنش ۱۰۰ و ۱۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم نیکل خاک، افزایش غلظت EDTA، شاخص رشد نسبی بخش هوایی و ریشه را نسبت به شاهد هر گروه در حد معنی‌داری کاهش داد (شکل ۱).

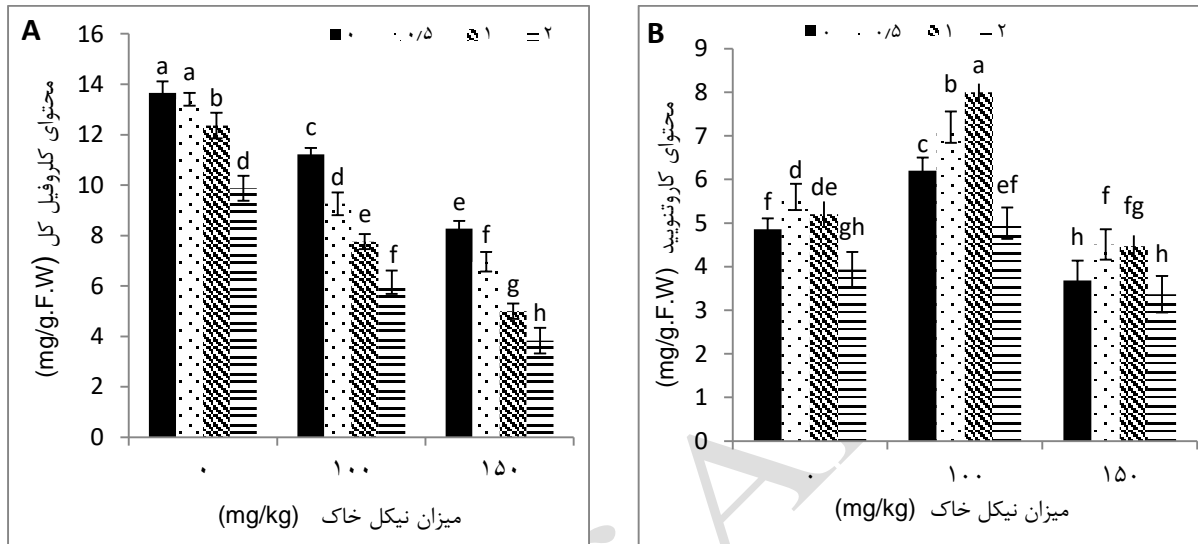


شکل ۱- تأثیر سطوح مختلف نیکل (۰، ۱۰۰، ۱۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم خاک) و EDTA (۰، ۰/۵، ۱، ۲ گرم بر کیلوگرم خاک) بر شاخص رشد نسبی ریشه (A) و بخش هوایی (B) گیاه همیشه بهار

مقادیر میانگین سه تکرار ± انحراف معیار هستند و حروف یکسان عدم اختلاف معنادار با استفاده از آزمون دانکن را نشان می‌دهند.

با توجه به نتایج شکل ۲ با افزودن ۱۰۰ و ۱۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم نیکل به خاک، محتوای کلروفیل کل کاهش معنی‌داری را نسبت به شاهد نشان داد. در شرایط بدون تنش، کاربرد همه غلظت‌های EDTA باعث کاهش محتوای کلروفیل کل نسبت به شاهد گردید که این کاهش در غلظت‌های ۱ و ۲ گرم بر کیلوگرم EDTA معنی‌دار و در غلظت ۰/۵ گرم بر کیلوگرم EDTA غیر معنی‌دار بود. تحت تنش ۱۰۰ و ۱۵۰ میلی‌گرم نیکل خاک، کاربرد همه غلظت‌های EDTA باعث کاهش معنی‌دار محتوای کلروفیل کل نسبت به شاهد هر گروه شد (شکل ۲-A).

محتوای کاروتنوئیدها در سطح ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم نیکل خاک افزایش اما در سطح ۱۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم نیکل خاک بطور معنی‌داری نسبت به شاهد کاهش یافت. در شرایط نرمال و نیز تحت تنش ۱۰۰ و ۱۵۰ میلی‌گرم نیکل خاک، کاربرد غلظت ۰/۵ و ۱ گرم بر کیلوگرم EDTA باعث افزایش معنی‌دار محتوای کاروتنوئید گیاه نسبت به شاهد هر گروه گردید. اما با کاربرد غلظت ۲ گرم بر کیلوگرم EDTA محتوای کاروتنوئید نسبت به شاهد هر گروه یا تفاوت معنی‌داری نداشت و یا کاهش معنی‌داری نشان داد (شکل ۲-B).



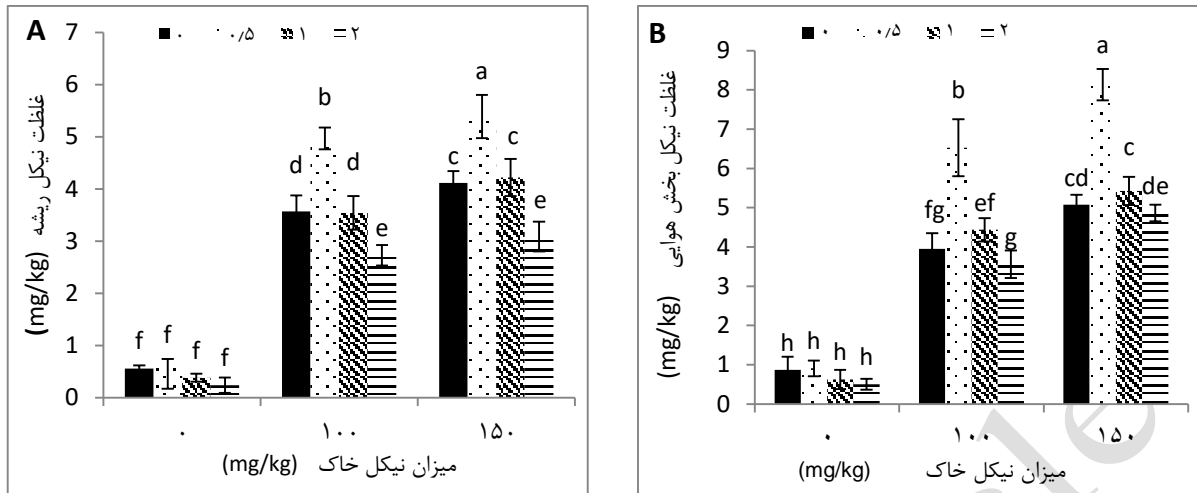
شکل ۲- تأثیر سطوح مختلف نیکل (۰، ۱۰۰، ۱۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم خاک) و EDTA (۰، ۰/۵، ۱، ۲ گرم بر کیلوگرم خاک) بر محتوای کلروفیل کل (A) و کاروتنوئیدها (B) در برگ گیاه همیشه بهار

مقادیر میانگین سه تکرار \pm انحراف معیار هستند و حروف یکسان عدم اختلاف معنادار با استفاده از آزمون دانکن را نشان می‌دهند.

اثر غلظت‌های مختلف نیکل و EDTA بر غلظت نیکل بخش هوایی و ریشه

نتایج آنالیز واریانس (جدول ۱) نشان داد که اثر مستقل نیکل و EDTA و همچنین اثر متقابل این فاکتورها بر غلظت نیکل در ریشه و بخش هوایی همیشه بهار در سطح احتمال ۱ درصد معنی‌دار بوده است.

با توجه به نتایج شکل ۳ کاربرد ۱۰۰ و ۱۵۰ میلی‌گرم نیکل خاک باعث افزایش معنی‌دار میزان نیکل بخش هوایی و ریشه همیشه بهار نسبت به شاهد گردید. در شرایط بدون تنش، افزایش غلظت EDTA تأثیر معنی‌داری بر میزان نیکل بخش هوایی و ریشه گیاه نداشت. در حضور غلظت‌های ۱۰۰ و ۱۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم نیکل خاک، میزان نیکل بخش هوایی و ریشه با کاربرد غلظت ۰/۵ گرم بر کیلوگرم EDTA افزایش اما با کاربرد غلظت ۲ گرم بر کیلوگرم EDTA نسبت به شاهد این گروه در ریشه بطور معنی‌داری کاهش یافت و در بخش هوایی تفاوت معنی‌داری نشان نداد (شکل ۳).



شکل ۳- تأثیر سطوح مختلف نیکل (۰، ۱۰۰، ۱۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم خاک) و EDTA (۰، ۰/۵، ۱، ۲ گرم بر کیلوگرم خاک) بر میزان نیکل (میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن خشک) ریشه (A) و بخش هوایی (B) همیشه بهار. مقادیر میانگین سه تکرار ± انحراف معیار هستند و حروف یکسان عدم اختلاف معنادار با استفاده از آزمون دانکن را نشان می‌دهند.

اثر غلظت‌های مختلف نیکل و EDTA بر میزان پراکسیداسیون لیپید در برگ و ریشه

با توجه به نتایج آنالیز واریانس، تاثیر مستقل و متقابل فاکتورهای نیکل و EDTA بر محتوای مالون‌دی‌آلدئید، فعالیت سوپراکسید دیسموتاز و کاتالاز در برگ و ریشه همیشه بهار در سطح احتمال ۱ درصد معنی‌دار بود (جدول ۲).

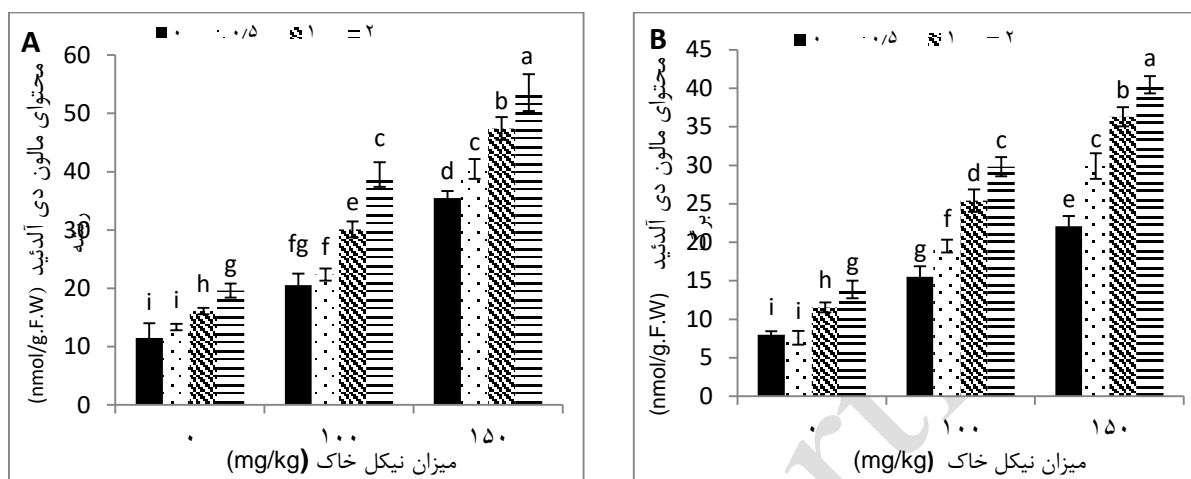
جدول ۲- نتایج تجزیه واریانس (میانگین مربعات) داده‌های حاصل از اثر نیکل و EDTA بر میزان مالون‌دی‌آلدئید و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی برگ و ریشه همیشه بهار

منابع تغییرات	درجه آزادی	مالون‌دی-آلدئید برگ	مالون‌دی-آلدئید ریشه	کاتالاز برگ	کاتالاز ریشه	سوپراکسید دیسموتاز برگ	سوپراکسید دیسموتاز ریشه
نیکل	۲	۱۴۵۰/۴۱**	۲۵۴۸/۵۳**	۴۹۹۹/۶۶**	۴۲۹۷/۳۳**	۴۶۶/۳۳**	۲۴۹۵/۶۷**
EDTA	۳	۲۹۱/۴۱**	۳۹۹/۴۲**	۱۸۰/۳۶**	۱۲۱۱/۱۴**	۱۵۰/۳۹**	۲۰۲/۸۳**
نیکل × EDTA	۶	۲۳/۸۷**	۲۴/۸۹**	۱۶۹/۶۶**	۵۹۳/۸۳**	۱۹/۲۶**	۲۱/۹۵**
خطا	۲۴	۱/۴۳	۲/۳۴	۲/۲۵	۲/۸۴	۰/۹۹	۱/۴۱

** معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد

بر اساس شکل ۴ با کاربرد ۱۰۰ و ۱۵۰ میلی‌گرم نیکل خاک، محتوای مالون‌دی‌آلدئید ریشه و برگ نسبت به شاهد بطور معنی‌داری افزایش یافت. با کاربرد ۱۵۰ میلی‌گرم نیکل نسبت به شرایط نرمال نیکل خاک محتوای مالون‌دی‌آلدئید ریشه و برگ گیاه به ترتیب ۶۵/۷۸ و ۶۸/۱۴ درصد افزایش نشان داد (شکل ۳). در گروه اول که گیاهان با نیکل تیمار نشدند، کاربرد غلظت ۰/۵ گرم بر کیلوگرم EDTA تاثیر معنی‌داری نداشت اما کاربرد غلظت‌های ۱ و ۲ گرم بر کیلوگرم EDTA باعث

افزایش معنی‌دار محتوای مالون‌دی‌آلدئید ریشه و برگ نسبت به شاهد گردید. در حضور ۱۰۰ و ۱۵۰ میلی‌گرم نیکل خاک، کاربرد همه غلظت‌های EDTA افزایش معنی‌داری در محتوای مالون‌دی‌آلدئید برگ و ریشه نسبت به شاهد هر گروه ایجاد کرد (شکل ۴).

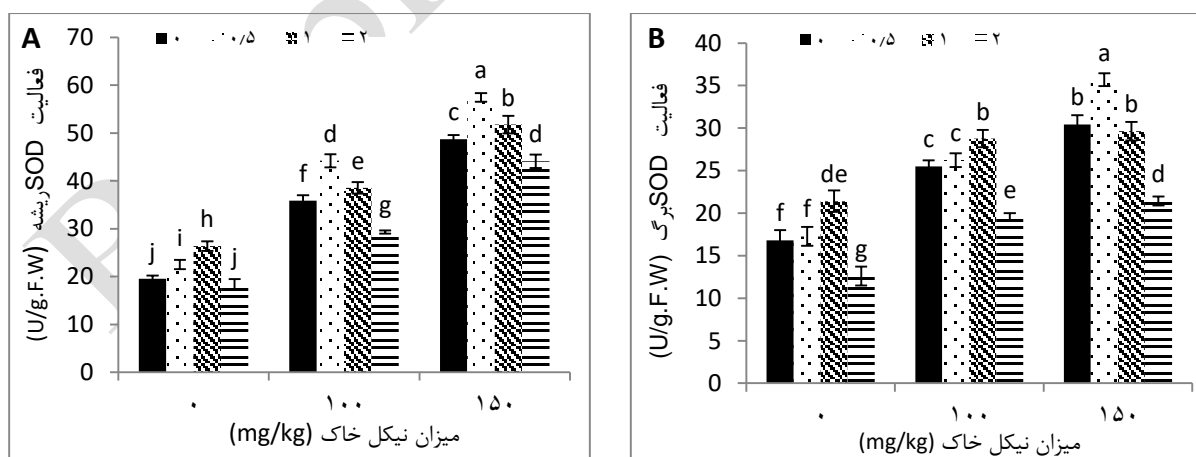


شکل ۴- تأثیر سطوح مختلف نیکل (۰، ۱۰۰، ۱۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم خاک) و EDTA (۰، ۰/۵، ۱، ۲ گرم بر کیلوگرم خاک) بر محتوای مالون‌دی‌آلدئید ریشه (A) و برگ (B) گیاه همیشه بهار

مقادیر میانگین سه تکرار \pm انحراف معیار هستند و حروف یکسان عدم اختلاف معنادار با استفاده از آزمون دانکن را نشان می‌دهند.

اثر غلظت‌های مختلف نیکل و EDTA بر فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در برگ و ریشه

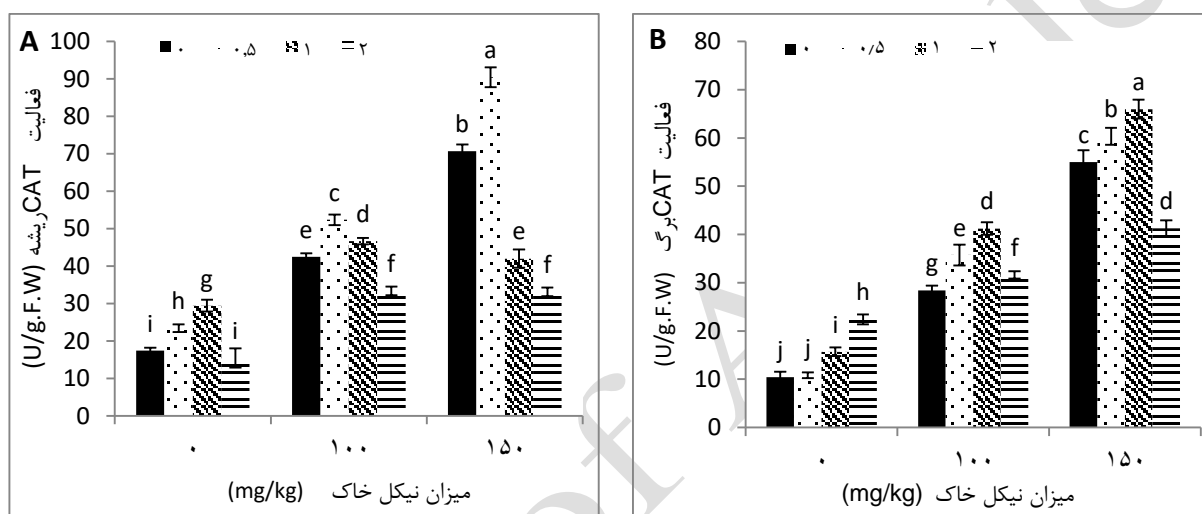
با توجه به نتایج مقایسه میانگین با کاربرد ۱۰۰ و ۱۵۰ میلی‌گرم نیکل خاک، میزان فعالیت آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز و کاتالاز بخش هوایی و ریشه همیشه بهار نسبت به شاهد به طور معنی‌داری افزایش یافت (شکل ۵).



شکل ۵- تأثیر سطوح مختلف نیکل (۰، ۱۰۰، ۱۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم خاک) و EDTA (۰، ۰/۵، ۱، ۲ گرم بر کیلوگرم خاک) بر فعالیت سوپراکسید دیسموتاز ریشه (A) و برگ (B) گیاه همیشه بهار

مقادیر میانگین سه تکرار \pm انحراف معیار هستند و حروف یکسان عدم اختلاف معنادار با استفاده از آزمون دانکن را نشان می‌دهند.

در همه سطوح نیکل، در اغلب موارد کاربرد غلظت ۰/۵ و ۱ گرم بر کیلوگرم EDTA باعث افزایش معنی‌دار فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز (شکل ۵) و کاتالاز (شکل ۶) ریشه و برگ نسبت به شاهد هر گروه گردید و در برخی موارد در این غلظت‌های EDTA فعالیت آنزیم‌ها تفاوت معنی‌داری با شاهد هر گروه نداشت. در سطوح ۱۰۰ و ۱۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم نیکل خاک، با کاربرد غلظت ۲ گرم بر کیلوگرم EDTA میزان فعالیت سوپراکسید دیسموتاز و کاتالاز ریشه و برگ نسبت به غلظت ۰/۵ و ۱ گرم بر کیلوگرم EDTA و حتی شاهد هر گروه کاهش معنی‌داری را نشان داد. ولی با کاربرد این غلظت EDTA در شرایط بدون تنش نیکل، فعالیت سوپراکسید دیسموتاز ریشه و کاتالاز ریشه و برگ نسبت به شاهد این گروه تفاوت معنی‌دار نداشت (شکل ۵ و ۶).



شکل ۶- تأثیر سطوح مختلف نیکل (۰، ۱۰۰، ۱۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم خاک) و EDTA (۰، ۰/۵، ۱، ۲ گرم بر کیلوگرم خاک) بر فعالیت کاتالاز ریشه (A) و برگ (B) گیاه همیشه بهار

مقادیر میانگین سه تکرار ± انحراف معیار هستند و حروف یکسان عدم اختلاف معنادار با استفاده از آزمون دانکن را نشان می‌دهند.

بحث و نتیجه‌گیری

نیکل در غلظت‌های کم بعنوان یک عنصر مفید به بهبود رشد گیاه کمک می‌کند اما در غلظت‌های بالا بعنوان یک فلز سنگین، رشد گیاه را کاهش می‌دهد [۲۹]. نتایج این تحقیق نشان داد که دو سطح ۱۰۰ و ۱۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم نیکل در خاک برای همیشه بهار تنش‌زا بودند. چون شاخص رشد نسبی ریشه و بخش هوایی بطور معنی‌داری در هر دو سطح نیکل کاهش یافت (شکل ۱). بطور مشابهی اثر نامطلوب نیکل بر شاخص رشد نسبی ریشه و بخش هوایی گیاه کدو [۳۲] نیز گزارش شده است. غلظت بالای نیکل از طریق تغییر ساختار ریشه، موجب کاهش جذب آب و همچنین از طریق رقابت با جذب سایر کاتیون‌های ضروری موجب کاهش برخی از عناصر مورد نیاز گیاه شده و همین امر با تأثیر منفی بر فرآیندهای تنفس و فتوسنتز موجب کاهش رشد گیاه می‌شود [۲۹، ۳۰، ۳۳]. کاهش رشد گیاه همیشه بهار مرتبط با کاهش محتوای کلروفیل (شکل ۲-A) تحت تنش نیکل بود. کاهش محتوای کلروفیل ممکن است نتیجه تنش اکسیداتیو ناشی از سمیت نیکل (شکل ۴) باشد. بطور مشابهی کاهش رشد و محتوای کلروفیل در کدو تحت تنش نیکل [۳۳] و در سویا تحت تنش کادمیوم [۳] نیز گزارش شده است. نیکل در غلظت‌های بالا بعنوان یک عنصر سمی، موجب تخریب زود هنگام کلروفیل بوسیله گونه‌های فعال اکسیژنی و افت کارایی فتوسنتز می‌شود و در نتیجه رشد گیاه را کاهش می‌دهد [۲۹]. بر طبق نتایج این تحقیق، در همه تیمارها (حتی

شاهد) غلظت نیکل در بخش هوایی بیشتر از ریشه بود که با یافته‌های مطالعه قبلی ما روی این گیاه مطابقت داشت [۱۱]. اگرچه تجمع بیشتر نیکل در بخش هوایی یک مزیت برای استفاده از گیاهان در برنامه‌های گیاه‌پالایی محسوب می‌شود، اما با توجه به معیارهای Brook و Bakers [۷]، این گونه همیشه‌بهار یک گیاه بیش‌اندوز نیکل نیست چون همواره غلظت نیکل در بخش هوایی کمتر از ۱۰۰۰ میکروگرم نیکل در گرم وزن خشک گیاه بود.

EDTA یک ترکیب کلات‌کننده بسیاری از فلزات و کاتیون‌ها است و در ابتدا بمنظور بهبود دسترسی گیاهان به برخی از عناصر ضروری به محیط کشت اضافه و نشان داده شد که کاربرد مقادیر کم آن در محیط رشد گیاه با بهبود دسترسی به آهن و سایر کاتیون‌های ضروری موجب تقویت رشد گیاه می‌شود. اما مطالعات بعدی آشکار کرد که این ترکیب در غلظت‌های بالا ایجاد سمیت می‌کند [۲۸]. در این تحقیق هم با کاربرد ۰/۵ گرم EDTA در کیلوگرم خاک در شرایط بدون تنش، شاخص رشد نسبی بخش هوایی (شکل ۱)، محتوای کلروفیل کل (شکل ۲-A) و محتوای مالون‌دی‌آلدئید (شکل ۴) در حد معنی‌داری تغییر نکرد که بیانگر آن است که این غلظت EDTA در گیاه همیشه‌بهار سمیت و تنش اکسیداتیو ایجاد نمی‌کند. در مقابل کاهش شاخص تحمل ریشه و بخش هوایی (شکل ۱) و محتوای کلروفیل کل (شکل ۲-A) و افزایش میزان پراکسیداسیون لیپیدی (شکل ۴) در سطوح ۱ و ۲ گرم EDTA در هر کیلوگرم خاک، حتی در شرایط بدون تنش نیکل، نشان می‌دهد غلظت‌های بالای EDTA اثر سمی بر گیاه همیشه‌بهار داشته است و موجب تنش اکسیداتیو در گیاه شده است. اثرات منفی مشابه برای کاربرد غلظت‌های بالای EDTA در شرایط بدون تنش توسط Nevgschtner و همکاران [۲۳] نیز گزارش شده است اما مکانیسم دقیق سمیت غلظت‌های بالای EDTA مشخص نیست.

در مطالعه حاضر با کاربرد همه سطوح EDTA در گیاهان تحت تنش ۱۰۰ و ۱۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم نیکل در خاک، شاخص رشد نسبی ریشه و بخش هوایی (شکل ۱) و محتوای کلروفیل کل (شکل ۲-A) این گونه همیشه‌بهار کاهش پیدا کرد. بر خلاف نتایج ما، Markovska و همکاران [۲۱] گزارش کردند که تیمار با EDTA علی‌رغم اینکه جذب و تجمع روی، سرب و کادمیوم در گیاه *Tribulus terrestris* L. را افزایش داد اما موجب افزایش وزن خشک و محتوای رنگدانه‌های فتوسنتزی در برگ گیاه شد. این اختلاف ممکن است ناشی از تفاوت غلظت EDTA یا تفاوت پاسخ گونه‌های گیاهی نسبت به این ترکیب کلات‌کننده فلز باشد. مشابه با نتایج ما، Liu و همکاران [۱۹] با بررسی اثر کلات‌کننده‌های سنتزی SDS، EDTA و EGTA روی تجمع و تحمل کادمیوم در همیشه‌بهار دریافتند که با این تیمارها تجمع کادمیوم در گیاه افزایش یافت اما کاربرد EDTA رشد گیاه را کاهش داد. مطالعات دیگر هم نشان داد سمیت EDTA باعث کاهش قابل توجه بیوماس در گونه‌های *Brassica juncea* و *Lolium perenne* [۱۲] و *Netieria zizahiades* [۳۴] تحت تنش فلزات سنگین شد. در پژوهش‌های فوق، محققان دریافتند با افزایش غلظت EDTA مقادیر جذب فلز سنگین در گیاه افزایش یافت و بنابراین تفسیر کردند که افزایش تجمع و سمیت فلز سنگین در گیاه منجر به کاهش رشد، محتوای کلروفیل و تحمل گیاه شد. کلات EDTA حلالیت فلز سنگین را در خاک و در نتیجه دسترسی و جذب آن در گیاه را افزایش می‌دهد و تنش اکسیداتیو ناشی از فلز سنگین موجب تخریب رنگدانه‌های فتوسنتزی و کاهش رشد گیاه می‌شود [۲۸]. به هر حال در مطالعه حاضر، نتایج آنالیز مقادیر نیکل در ریشه و شاخساره گیاه همیشه‌بهار نشان داد که تحت تنش نیکل، فقط با کاربرد مقدار ۰/۵ گرم EDTA در کیلوگرم خاک، غلظت نیکل در بافت‌های این گیاه در حد قابل توجهی افزایش یافت (شکل ۳). با توجه به اینکه کاربرد ۰/۵ گرم EDTA در کیلوگرم خاک در شرایط بدون تنش، محتوای مالون‌دی‌آلدئید را افزایش نداد (شکل ۴) و این غلظت EDTA به تنهایی سمیت و تنش اکسیداتیو ایجاد نکرد، بنابر این می‌توان نتیجه‌گیری کرد که در این غلظت EDTA، کاهش شاخص تحمل و کلروفیل بیشتر ناشی از اثر سمی تجمع نیکل در گیاه بوده و کمتر با سمیت خود EDTA مرتبط است.

بعبارت دیگر، ورود بیشتر نیکل به برگ در پاسخ به EDTA با ایجاد تنش اکسیداتیو، احتمالاً باعث تخریب کلروفیل و کاهش فتوسنتز و در نتیجه افت رشد و تحمل این گونه همیشه بهار شد.

در این تحقیق، محتوای کاروتنوئیدها در برگ همیشه بهار در ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم نیکل افزایش اما تحت تنش شدید (۱۵۰ میلی‌گرم نیکل بر کیلوگرم خاک) کاهش یافت (شکل ۲-ب). افزایش کاروتنوئیدها یک مکانیسم دفاعی برای تعدیل تنش اکسیداتیو و حفظ کلروفیل تحت تنش‌های غیرزیستی است. چون کاروتنوئیدها نه تنها رنگیزه‌های کمکی برای جمع‌آوری انرژی نورانی برای فتوسنتز هستند، بلکه از تشکیل گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) جلوگیری می‌کنند و به حفاظت کلروفیل و سیستم فتوسنتزی در برابر تنش اکسیداتیو در گیاه کمک می‌کنند. اما کاروتنوئیدها نیز تحت تنش اکسیداتیو شدید از بین می‌روند [۳۳ و ۱۱]. کاربرد غلظت ۰/۵ و ۱ گرم بر کیلوگرم EDTA باعث افزایش معنی‌دار کاروتنوئیدها در برگ گیاه همیشه بهار در همه سطوح نیکل خاک شد (شکل ۲-ب) که می‌توان آن را یک پاسخ برای تعدیل تنش اکسیداتیو ناشی از تجمع فلز نیکل القا شده بوسیله EDTA در برگ و در نتیجه حفظ کلروفیل در نظر گرفت. بطور مشابهی اثر مثبت تیمار با EDTA بر افزایش محتوای کاروتنوئیدها در گیاه آفتابگردان تحت تنش کادمیوم نیز گزارش شده است [۲۶]. به هر حال، در این مطالعه با کاربرد غلظت ۲ گرم EDTA در کیلوگرم خاک، محتوای کاروتنوئیدها در همه سطوح نیکل نسبت به شاهد هر گروه بطور معنی‌داری کاهش یافت (شکل ۲-ب) که این اثر، تخریب اکسیداتیو کلروفیل و افت رشد در این گیاهان را تشدید کرد. بطور مشابهی Tipu و همکاران [۳۱] هم گزارش کردند کاربرد ۰/۵ میلی‌مولار EDTA و ۴۰ میکرومولار نیکل به تنهایی یا در ترکیب (EDTA+Ni)، طول و وزن خشک ریشه و بخش هوایی و محتوای کلروفیل a و b و کاروتنوئیدها را در ذرت کاهش داد.

بر خلاف انتظار، در این تحقیق، کاربرد غلظت‌های ۱ و ۲ گرم EDTA در کیلوگرم خاک، غلظت نیکل در ریشه و بخش هوایی گیاه را نسبت به مقادیر آنها در غلظت ۰/۵ گرم در کیلوگرم کاهش داد (شکل ۳). فتاحی کیاسری و همکاران [۴] هم با بررسی اثر سطوح مختلف EDTA بر گیاه‌پالایی سرب در سه گیاه آفتابگردان، ذرت و پنبه گزارش کردند که کاربرد مقدار ۳ میلی‌مول EDTA نسبت به غلظت ۱/۵ میلی‌مول آن تأثیر کمتری در انباشت و انتقال سرب به بخش هوایی این گیاهان داشت. Kaur و همکاران [۱۳] گزارش کردند که کاربرد EDTA جذب و تجمع نیکل در گیاه عدسک آبی (*Lemna minor*) را کاهش داد و معتقدند این امر احتمالاً نتیجه عدم امکان جذب و انتقال کمپلکس EDTA - فلز توسط گیاه بوده است. اما این احتمال در پژوهش حاضر تا حدود زیادی منتفی است. چون کمپلکس EDTA - نیکل در غلظت ۰/۵ گرم در کیلوگرم EDTA توانسته وارد گیاه شود و تجمع نیکل در گیاه را افزایش بدهد. پژوهش‌های دیگر نشان داد سطوح بالای EDTA موجب حلالیت بیش از حد نیکل در خاک و آبشویی آن شده و در نتیجه فلز از دسترس گیاه خارج گردیده و میزان جذب و تجمع آن در گیاه کاهش می‌یابد [۹ و ۲۴]. رخدادهای چنین فرآیندی در پژوهش حاضر هم محتمل است اما با توجه به اینکه در این تحقیق مقدار نیکل در زه‌آب و میزان نیکل کل در خاک گلدان اندازه‌گیری نشده است، نمی‌توان با اطمینان درباره افزایش آبشویی نیکل نظر داد.

با کاربرد EDTA در سطح ۰/۵ گرم در کیلوگرم، ازدیاد تجمع نیکل در ریشه و برگ (شکل ۳) موجب افزایش پراکسیداسیون لیپیدی در این اندام‌ها (شکل ۴) شد و برای مدیریت این تنش اکسیداتیو، فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی SOD و CAT در ریشه و برگ گیاه همیشه بهار بطور معنی‌داری در این غلظت EDTA در گیاهان تحت تنش نیکل افزایش یافت (شکل ۵ و ۶). معمولاً گیاهان با افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان که خنثی‌کننده گونه‌های فعال اکسیژن هستند، تنش اکسیداتیو ناشی از سمیت فلزات سنگین را در سلول‌ها کاهش می‌دهند [۱۱، ۲۰، ۲۲، ۲۵، ۳۲، ۳۳]. مشابه با نتایج این تحقیق، Khan و همکاران

[۱۳] نیز گزارش کردند که کاربرد ۲/۵ میلی‌مولار EDTA در محلول هوگلند، تجمع Ni، Cr، Cd و Pb و نشت الکترولیتی را در گیاه اطلسی زیاد کرد و فعالیت آنزیم‌های CAT، GST، APX و SOD را افزایش داد، ولی بیوماس و محتوای کلروفیل و کاروتنوئید را کاهش داد. شیرخانی [۲] هم گزارش کرد کاربرد EDTA، غلظت کادمیوم را در سلمک اورشلیمی افزایش داد اما با تأثیر بر فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی، تنش ناشی از افزایش تجمع فلز را تعدیل کرد. به هرحال در سطوح ۱ و ۲ گرم EDTA در کیلوگرم خاک هم در شرایط بدون تنش و هم تحت تنش ۱۰۰ و ۱۵۰ میلی‌گرم در کیلوگرم نیکل، پراکسیداسیون لیپیدی در برگ و ریشه گیاه همیشه بهار به شدت افزایش یافت (شکل ۴). با توجه به اینکه در این تیمارها تجمع نیکل در این گیاهان کاهش یافته است (شکل ۳)، می‌توان این پاسخ را به سمیت سطوح بالای خود EDTA نسبت داد. اگرچه در پاسخ به این تنش اکسیداتیو در برخی موارد در سطح ۱ گرم EDTA در کیلوگرم خاک، فعالیت آنزیم‌های آنتی-اکسیدانی SOD و CAT در برگ و ریشه گیاه همیشه بهار بطور معنی‌داری افزایش یافت اما در اغلب موارد و بویژه با کاربرد غلظت ۲ گرم EDTA در کیلوگرم خاک، فعالیت این آنزیم‌ها در گیاهان تحت تنش نیکل کاهش یافته است (شکل ۵ و ۶). با توجه به اینکه با کاربرد این غلظت بالای EDTA، تجمع نیکل در این گیاهان کاهش یافته است. شاید چنین تصور شود که چون تجمع فلز کم شده است پس پاسخ‌های مقاومتی و از جمله فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی کاهش یافته است. اما با توجه به اینکه با کاربرد غلظت ۲ گرم بر کیلوگرم EDTA، محتوای مالون‌دی‌آلدئید در همه سطوح نیکل (حتی در شرایط بدون تنش) به شدت بالا بوده است این نتیجه‌گیری نادرست است. در مقابل می‌توان تفسیر کرد که در این غلظت، خود EDTA سمیت بالایی ایجاد کرده است بطوری که علیرغم کاهش تجمع فلز در گیاه، میزان پراکسیداسیون لیپیدی را افزایش داده است. احتمالاً شدت تنش اکسیداتیو ناشی از سمیت EDTA و تا حدی هم تجمع فلز به قدری زیاد بوده است که خود موجب تخریب و کاهش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی شده است. به همین دلیل، این غلظت EDTA بسیار نامطلوب بوده و شاخص رشد نسبی و میزان رنگیزه‌های فتوسنتزی را به شدت کاهش داد (شکل ۱ و ۲).

در مجموع نتایج این تحقیق نشان داد که با افزایش غلظت نیکل خاک، میزان نیکل در ریشه و بخش هوایی گیاه افزایش یافت و منجر به کاهش شاخص رشد نسبی و کاهش میزان کلروفیل شد. مقادیر بالای نیکل باعث ایجاد تنش اکسیداتیو شد که بصورت افزایش پراکسیداسیون لیپیدی نمایان شد. برای مقابله با این اثرات منفی، فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی سوپراکسید دیسموتاز و کاتالاز و میزان کاروتنوئیدها در گیاه افزایش یافت. کاربرد EDTA برای افزایش تجمع نیکل در این گیاه فقط در غلظت ۰/۵ گرم بر کیلوگرم تا حدی تجمع نیکل و تحمل تنش را از طریق تقویت فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی را افزایش داد؛ اما غلظت‌های ۱ و ۲ گرم در کیلوگرم EDTA علیرغم اینکه تجمع نیکل را در گیاه کاهش داد، شاخص رشد نسبی و میزان کلروفیل کل را در هر دو شرایط نرمال و تحت تنش نیکل بطور چشمگیری کاهش داد و موجب تخریب شدید لیپیدهای غشاهای سلول و کاهش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی شد که نشان می‌دهد غلظت‌های بالای EDTA خود اثرات سمی بر گیاه دارد. بنابراین استفاده از سطوح بالای EDTA اثر منفی بر تحمل و تجمع نیکل در این گونه همیشه بهار دارد و برای افزایش ظرفیت گیاه‌پالایی این گیاه توصیه نمی‌شود.

سپاسگزاری

بدینوسیله از دانشگاه شهرکرد برای پشتیبانی مالی و در اختیار گذاشتن گلخانه و سایر تجهیزات برای اجرای عملیات آزمایشگاهی تقدیر می‌شود.

منابع

۱. بنی‌شریف ع. عمواقایی ر. (۱۳۹۹). اثر پیش‌تیمار لیزر بر شاخص‌های جوانه‌زنی دانه، فعالیت آلفا‌امیلاز و رشد دانه‌رست خارمریم (*Silybum marianum* L) در شرایط نرمال و تحت تنش سرب. مجله پژوهش‌های گیاهی، جلد ۳۳، شماره ۲. صفحات ۳۳۹-۳۵۲. DOI: 20.1001.1.23832592.1399.33.2.6.8
۲. شیرخانی ز. (۱۴۰۱). اثر EDTA بر برخی خصوصیات فیزیولوژیکی سلمک اورشلیمی (*Chenopodium botrys* L.) تحت تنش کادمیوم. مجله پژوهش‌های گیاهی، جلد ۳۵، شماره ۲. صفحات ۲۴۹-۲۳۳. DOI: 20.1001.1.23832592.1401.35.2.15.1
۳. عمواقایی. ر. معرفت. ا. شبانی. ل. (۱۳۹۱). تأثیر متقابل سالیسیلیک‌اسید و کادمیوم بر رشد، رنگیزه‌های فتوسنتزی و تجمع برخی عناصر در بخش هوایی گیاهچه‌های سویا. مجله زیست گیاهی ایران، جلد ۴، شماره ۱۴. صفحات ۷۵-۸۸. DOI: 20.1001.1.20088264.1391.4.14.8.5.88
۴. فتاحی کیاسری ا، فتوت ا، آستارایی ع، حقنیاغ (۱۳۸۹) اثر اسیدسولفوریک و EDTA بر گیاه‌پالایی سرب در خاک توسط سه گیاه آفتابگردان، ذرت و پنبه. مجله علوم آب و خاک (علوم و فنون کشاورزی و منابع طبیعی سابق)، ۱۴(۵۱)، ۵۷-۶۸. SID: <https://sid.ir/paper/14874/fa>
۵. میرخانی ر (۱۴۰۰). تأثیر استفاده از EDTA بر قابلیت جذب سرب و کادمیم توسط گندم. مجله تحقیقات آب و خاک ایران، دوره ۵۲، شماره ۵، صفحات ۱۳۸۳-۱۳۸۴. DOR: 20.1001.1.2008479.1400.52.5.17.1
۶. منصورى ط، گلچین ا، فریدونی ج (۱۳۹۵). تأثیر EDTA و اسیدسولفوریک بر استخراج سرب از خاک آلوده توسط گیاه تربچه. نشریه آب و خاک (علوم و صنایع کشاورزی)، جلد ۳۰، شماره ۱، صفحات ۱۹۴-۲۰۹. DOI: 20.1001.1.20084757.1395.30.1.17.7
7. Baker JM, Brooks RR. (1989). Terrestrial higher plants which hyperaccumulate metallic elements – a review of their distribution, ecology and phytochemistry. *Biorecovery*. 1:81-126.
8. Chen C, Huang D, Liu J (2009). Functions and toxicity of nickel in plants: Recent advances and future prospects. *Clean* 37(4-5): 304-313.
9. Ebrahimi, M. (2015). Effect of EDTA treatment method on leaching of Pb and Cr by *Phragmites australis* (Cav.) Trin. Ex Steudel (common reed). *Caspian J. Env. Sci.* 13 (2). 153-166
10. Heath RL, Packer L (1968) Photoperoxidation in isolated chloroplasts. I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid and peroxidation. *Arch Biochem Biophys.* 125(1): 189-198. doi:10.1016/0003-9861(68)90654-1.
11. Heidari J, Amooaghaie R, Kiani S (2020) Impact of chitosan on nickel bioavailability in soil, the accumulation and tolerance of nickel in *Calendula tripterocarpa*. *Int J Phytoremed* 22: 1175-1184 doi: 10.1080/15226514.2020.1748564
12. Johnson A, Gunawardana B, Singhal N (2010). Amendments for enhancing copper uptake by *Brassica juncea* and *Lolium perenne* from solution. *Int J Phytoremed.* 11: 215-234
doi: 10.1080/15226510802429633
13. Kaur L, Gadgil K, Sharma S (2015) Comparative evaluation of salicylic acid and EDTA chelant induced phytoremediation of lead and nickel, using *lemna minor*. *Tropical Plant Res.* 2 (3): 267-270
14. Khan AHA, Butt TA, Mirza CR, Yousaf S, Nawaz I, Iqba M (2019) Combined application of selected heavy metals and EDTA reduced the growth of *Petunia hybrida* L. *Sci Rep.* 9: 4138 doi: 10.1038/s41598-019-40540-7
15. Krujatz F, (2012) Assessing the toxic effects of nickel, cadmium and EDTA on growth of the plant growth-promoting rhizobacterium *Pseudomonas Brassicacearum*. *Water Air Soil Pollut* 223: 1281-1293. doi: 10.1007/s11270-011-0944-0
16. Lambrechts T, Gustot Q, Couder E, Houben D, Iserentant A, Lutts S (2011)

- Comparison of EDTA-enhanced phytoextraction and phytostabilisation strategies with *Lolium perenne* on a heavy metal contaminated soil. *Chemosphere* 85: 1290–1298.
doi: [10.1016/j.chemosphere.2011.07.034](https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2011.07.034)
17. Leleyter L, Rousseau C, Biree L, Baraud F (2012) Comparison of EDTA, HCl and sequential extraction procedures, for selected metals (Cu, Mn, Pb, Zn), in soils, riverine and marine sediments. *J Geochem Explor* 116: 51–59. doi: [10.1016/j.jgeexplo.2012.03.006](https://doi.org/10.1016/j.jgeexplo.2012.03.006)
 18. Lichtenthaler HK, Wellburn AR (1983) Determinations of total carotenoids and chlorophylls *a* and *b* of leaf extracts in different solvents. *Biochemical Society Transactions* 11: 591–592. doi: [10.1042/bst0110591](https://doi.org/10.1042/bst0110591)
 19. Liu J, Zhou Q, Wang S (2010) Evaluation of chemical enhancement on phytoremediation effect of Cd-contaminated soils with *Calendula officinalis* L. *Int J Phytoremed.* 12: 503–515. doi: [10.1080/15226510903353112](https://doi.org/10.1080/15226510903353112)
 20. Marefat, E., Shabani, L. and Amooghaie, R. (2012) Interactive effect of cadmium and salicylic acid on proline and antioxidant enzyme activity in soybean. *Malaysian Applied Biol.* 41 (2): 25-30
 21. Markovska Y, Geneva M, Petrov P, Boychinova M, Lazarova I, Todorov I, Stancheva I (2013) EDTA reduces heavy metal impacts on *Tribulus terrestris* photosynthesis and antioxidants. *Russ. J Plant Physiol* 60: 623–632. doi: [10.1134/S1021443713050117](https://doi.org/10.1134/S1021443713050117)
 22. Nabaie M, Amooghaie R (2019) Nitric oxide is involved in the regulation of melatonin-induced antioxidant responses in *Catharanthus roseus* roots under cadmium stress. *Bot.* 97: 681–690.
doi: [10.1139/cjb-2019-0107](https://doi.org/10.1139/cjb-2019-0107)
 23. Neugschtner RW, Tlustos P, Komarek M, Szakova J, Jakoubkova L (2012) Chemically enhanced-phytoextraction of risk elements from a contaminated agricultural soil using *Zea may*, *Triticum aestivum*: performance and metal mobilization over a three year period. *Int J Phytoremed* 14: 754–771 doi: [10.1080/15226514.2011.619231](https://doi.org/10.1080/15226514.2011.619231)
 24. Quartacci MF, Irtelli B, Baker AJM, Navari-Izzo F (2007) The use of NTA and EDDS for enhanced phytoextraction of metals from multiply contaminated soil by *Brassica carinata*. *Chemosphere.* 68: 1920–1928. doi: [10.1016/j.chemosphere.2007.02.058](https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2007.02.058)
 25. Pirooz, P., Amooghaie, R., Ahadi, A. and Sharififar, F. (2021) Silicon- induced nitric oxide burst modulates systemic defensive responses of *Salvia officinalis* under copper toxicity. *Plant Physiol Biochem* 162: 752–761 doi: [10.1016/j.plaphy.2021.02.048](https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2021.02.048)
 26. Sadiq R, Maqbool N, Haseeb M (2017) Ameliorative effect of chelating agents on photosynthetic attributes of Cd stressed sunflower. *Agri Sci* 8: 149-160. doi: [10.4236/as.2017.82010](https://doi.org/10.4236/as.2017.82010)
 27. Sekabira K, Oryem-Origa H, Basamba TA, Mutumba G, Kakudidi E (2010) Assessment of heavy metal pollution in the urban stream sediments and its tributaries. *Int J Environ Sci Technol.* 7(3): 435–446. doi: [10.1007/BF03326153](https://doi.org/10.1007/BF03326153)
 28. Shahid M, Austruy A, Echevarria G, Arshad M, Sanaullah M, Aslam M, Nadeem M, Nasim W, Dumat C (2014) EDTA-enhanced phytoremediation of heavy metals: a review. *Soil Sediment Contamin* 23(4): 389–416. doi: [10.1080/15320383.2014.831029](https://doi.org/10.1080/15320383.2014.831029)
 29. Shahzad B, Tanveer M, Rehman A, Cheema SA, Fahad S, Rehman S, Sharma A (2018) Nickel; whether toxic or essential for plants and environment – a review. *Plant Physiol Biochem* 132: 641–651. doi: [10.1016/j.plaphy.2018.10.014](https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2018.10.014)
 30. Srekanth TVM, Nagajyothi PC, Lee KD, Prasad TN (2013) Occurrence, physiological responses and toxicity of nickel in plants. *Int J Environ Sci Technol* 10(5):1129–1140. doi: [10.1007/s13762-013-0130](https://doi.org/10.1007/s13762-013-0130)
 31. Tipu MI, Ashraf MY, Sarwar N, Akhtar M, Shaheen MR, Ali S, Damalas CA (2021) Growth and physiology of maize (*Zea mays* L.) in a nickel-contaminated soil and phytoremediation efficiency using EDTA. *J Plant Grow Regul* 40 (2): 774-786 doi: [10.1007/s13762-013-0245-9](https://doi.org/10.1007/s13762-013-0245-9)
 32. Valivand M, Amooghaie R, Ahadi AM (2019) Interplay between hydrogen sulfide and calcium/calmodulin enhances systemic

- acquired acclimation and antioxidative defense against nickel toxicity in zucchini. *Environ Exp Bot.* 158:40–50. doi:10.1016/j.envexpbot.2018.11.006.
33. Valivand M, Amooaghaie R (2021) Calcium signaling confers nickel tolerance in *Cucurbita pepo* L. *Int J Phytoremed* 23:362–373doi: 10.1080/15226514.2020.1814992
34. Xu W, Li W, He J, Balwant S, Xiong Z (2009) Effects of insoluble Zn, Cd, and EDTA on the growth, activities of antioxidant enzymes and uptake of Zn and Cd in *Vetiveria zizanioides*. *J Environ Sci.* 21: 186–192.doi: 10.1016/s1001-0742(08)62249-4
35. Zhao Z, Xi M, Jiang G, Liu X, Bai Z, Huang Y (2010) Effects of IDSA, EDDS and EDTA on heavy metals accumulation in hydroponically grown maize (*Zea mays*, L.). *J Hazard Mat.* 181: 455–459.doi: 10.1016/j.jhazmat.2010.05.032

Effect of EDTA on the tolerance and accumulation of nickel in *Calendula tripterocarpa*

J. Heidari¹, R. Amooaghaie^{1,2*}

¹ Plant Science Department, Faculty of Science, Shahrekord University, Shahrekord, Iran

² Biotechnology Research Institute, Shahrekord University, Shahrekord, Iran

Abstract

It has been demonstrated that chelators such as EDTA affect the tolerance and accumulation of metals in plants. Therefore, in a greenhouse experiment, the effect of different concentrations of EDTA (0, 0.5, 1, 2, 4 g/kg soil) were investigated on *Calendula tripterocarpa* Rupr. plants exposed to various concentrations of nickel (0, 100, 150 mg/kg) in soil and relative growth index of root and shoot, the content of photosynthetic pigments, lipid peroxidation and the activity of antioxidant catalase and superoxide dismutase enzymes was evaluated in roots and leaves. Results showed that increasing EDTA concentrations decreased relative growth index of root and shoot and the content of total chlorophyll and increased the content of malondialdehyde in leaves and roots under both Ni levels and non-stress conditions. Application of 0.5 g/kg EDTA increased carotenoid content in leaves, the activity of catalase and superoxide dismutase enzymes in leaves and roots and nickel concentration in roots and shoots. Interestingly, application of 1 and 2 g/kg EDTA, reduced nickel concentration in roots and shoots and the activity of catalase and superoxide dismutase and increased the content of malondialdehyde. In conclusion, Application of 0.5 g/kg EDTA enhanced phytoremediation ability of this species *Calendula*, but high concentrations of EDTA was toxic for plant growth and reduced ni accumulation and therefore, the application of high dose of this chelator is not recommended for enhancing the tolerance and accumulation of nickel in *Calendula tripterocarpa*.

Key words: Antioxidant enzyme, *Calendula tripterocarpa*, lipid peroxidation, photosynthetic pigments, Nickel, EDTA.