

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 عمدتاً از طریق ریشه و در مقادیر کم از طریق برگ‌ها جذب می‌شود و پس از ورود به سلول مانع فعالیت بسیاری از آنزیم‌ها و تأثیر بر ساختار و نفوذپذیری غشاء می‌شود. هدف از این پژوهش، بررسی اثر غلظت‌های مختلف سالیسیلیک اسید (SA) و آسکوربیک اسید (AsA) بر محتوای رنگیزه‌های فتوسنتزی و آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان گیاه ریحان تحت تنش سرب (Pb) است. بدین منظور آزمایشی به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار انجام شد. تیمارها ترکیبی از کاربرد سه غلظت سرب (۷۰۰ و ۳۵۰ و ۰ ppm) و دو غلظت SA (۰/۱ و ۰) و سه غلظت AsA (۲۰۰ و ۱۰۰ و ۰ ppm) بود. نتایج نشان داد که افزایش غلظت سرب باعث کاهش محتوای کلروفیل و کارتنوئیدها و افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان (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 آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان شد. به طور کلی، نتایج به دست آمده از این تحقیق نشان داد که کاربرد SA و AsA پارامترهای فیزیولوژیکی گیاه ریحان را بهبود می‌بخشد.

واژه‌های کلیدی: آسکوربیک اسید، آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان، سالیسیلیک اسید، سرب، گیاه ریحان

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

مقدمه

(۴۳). اولین پاسخ گیاهان به حضور فلزات سنگین در محیط تولید اکسیژن‌های واکنشگر (ROS) است که منجر به آسیب‌های اکسیداتیو مانند پراکسیداسیون لیپیدها و تخریب رنگیزه‌های فتوسنتزی می‌شود (۲۹).

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

زمین‌های زراعی در بسیاری از نقاط جهان به فلزات سنگینی مانند سرب، کادمیوم، مس، روی، کروم و آرسنیک آلوده شده‌اند؛ که این می‌تواند 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 نمی‌باشد، ولی هر دو آنها سرب را به راحتی جذب می‌کنند (۳۹). تجمع فلزات سنگین از جمله سرب در گیاهان سبب عوارضی همانند کاهش رشد ریشه و ساقه، کاهش فتوسنتز، اختلال در میتوز و شکست کروموزومی می‌شود

به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی در شرایط گلخانه ای انجام شد. بذره‌های 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 $-80^{\circ}C$ 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 و b و کاروتنوئیدها به ترتیب در طول موج ۶۴۷، ۶۶۴ و ۴۷۰ نانومتر توسط اسپکتروفتومتر (مدل JENWAY6305) قرائت شد. مقدار رنگیزه ها بر حسب میلی گرم بر گرم وزن تر گزارش گردید.

فعالتهای فیزیولوژیک گیاه نظیر کنترل تنفس، بسته شدن روزنه‌ها، جوانه‌زنی دانه، رسیدن میوه، گلیکولیز، گلدھی و تولید گرما ایفا می‌کند (۱۲). سالیسیلیک‌اسید باعث کاهش آثار ناشی از تنشهای زیستی و غیرزیستی مانند خشکی، شوری، گرما، سرما و فلزات سنگین می‌گردد. این ماده با اثر بر روی متابولیت‌هایی مانند آسکوربیک اسید (۶)، گلوکاتایون و نیز آنزیمهای آنتی‌اکسیدان مانند کاتالاز، سوپراکسیددیسموتاز، پلی‌فنل‌اکسیداز و پراکسیداز آثار ناشی از تنش می‌کاهد (۲۹).

از طرفی اسید آسکوربیک نیز یک آنتی‌اکسیدان مهم است که گیاه را از طریق سرکوب آسیب‌اکسیداتیو محافظت می‌کند (۴۲). آسکوربات‌ها همچنین در تنظیم تقسیم سلولی و فتوسنتز دخیل است. آسکوربات دارای ارزش تغذیه‌ای برای انسان و احتمالاً برای تحمل گیاهان در برابر تنش فتواکسیداتیو مهم است (۴۲ و ۹، ۸). گیاه ریحان (*Ocimum basilicum* L.) به عنوان سبزی خوراکی در حاشیه بسیاری از شهرها کشت می‌شود، بنابراین احتمال تجمع فلزات سنگین در آن وجود دارد. همچنین ریحان در طب سنتی نیز مصارف متعددی داشته و برگ‌های خشک آن معمولاً به عنوان طعم‌دهنده بسیاری از مواد غذایی استفاده می‌شود (۱۹). اگرچه در مطالعات متعدد به تأثیر سالیسیلیک‌اسید به عنوان تنظیم‌کننده رشد و آسکوربیک اسید به عنوان آنتی‌اکسیدان بر گیاهان در محیط‌های آلوده به فلزات سنگین پرداخته شده است اما گزارشی از کاربرد همزمان این دو ترکیب وجود ندارد. بنابراین در تحقیق حاضر اثر متقابل سالیسیلیک‌اسید و آسکوربیک اسید بر برخی شاخص‌های فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی گیاه ریحان در حضور فلز سرب بررسی می‌شود.

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

دقیقه جذب نمونه‌ها در طول موج ۵۶۰ توسط دستگاه اسپکتروفتومتر خوانده شد.

تجزیه و تحلیل آماری داده‌های جمع‌آوری شده این پژوهش با استفاده از نرم افزارهای آماری SPSS ver 19 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

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

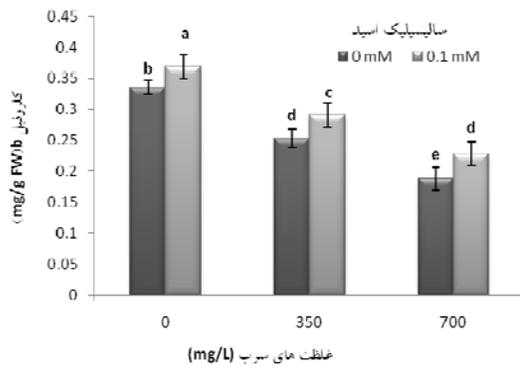
سنجش آنزیمی: استخراج عصاره آنزیمی: برای تهیه عصاره آنزیمی برای تعیین فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان از روش Sairam و همکاران (۲۰۰۲) استفاده شد.

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 (۱۰ میکرو 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 (مدل JENWAY6305) 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.

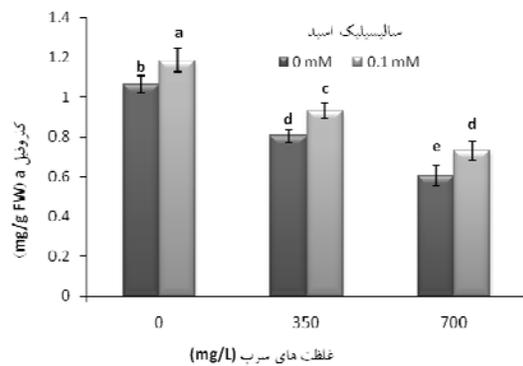
سنجش فعالیت آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز: فعالیت آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز با استفاده از روش Beauchamp و Fridovich (۱۹۷۱) سنجیده شد. سنجش فعالیت این آنزیم با استفاده از سنجش مهار احیای نوری نیتروبلوتترازولوم (NBT) در طول موج ۵۶۰ نانومتر انجام شد. بدین منظور ابتدا محلول بافر فسفات ۵۰ میلی مولار با $pH=7/5$ تهیه شد. سپس برای تهیه مخلوط واکنش، ترکیبات EDTA ۰/۱ مولار، NBT ۷۵ میکرو مولار، متیونین ۱۳ میلی مولار و ریو 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 نیند. پس از افزودن مقدار ۴۰ میکرو لیتر عصاره آنزیمی در حجم نهایی ۳ میلی لیتر، لوله‌ها تحت روشنایی لامپ فلورسنت (۴۰ وات) با فاصله ۵۰ سانتی متر قرار داده شدند تا واکنش آغاز گردد. پس از ۱۵

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

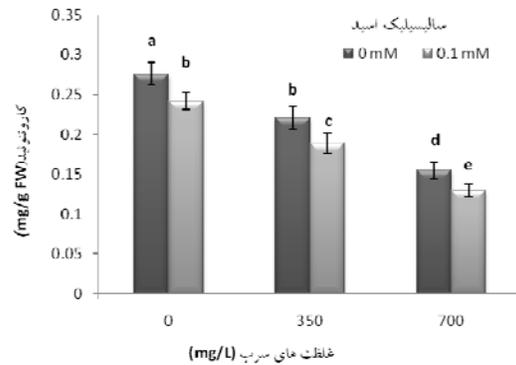
ب



الف



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.

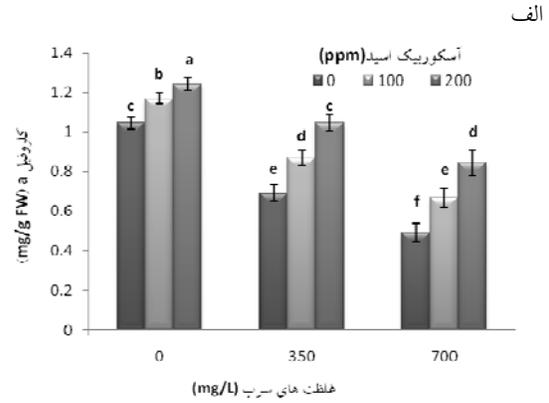
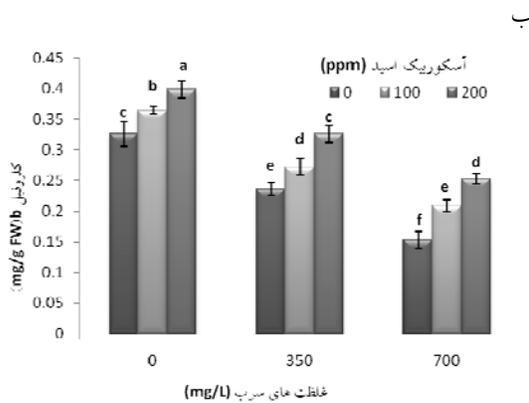
جدول ۱- تجزیه واریانس صفات فیزیولوژیک

میانگین مربعات						منابع تغییر
سوپراکسید دیسموتاز	کاتالاز	کاروتنوئید	کلروفیل b	کلروفیل a	درجه	
۲۵۴۷,۲۹۹**	۰,۲۳۷**	۰,۰۶۲**	۰,۱۰۱**	۱,۰۳۴**	۲	سرب
۴۰۹۱,۰۹۹**	۰,۰۵۳**	۰,۰۲۴**	۰,۰۳۸**	۰,۳۹۲**	۲	آسکوربیک اسید
۳۵۲۲,۲۳۴**	۰,۰۱۷**	۰,۰۰۸**	۰,۰۰۱۶**	۰,۱۶۶**	۱	سالیسیلیک اسید
۱۰۱,۲۶۶**	۰,۰۰۵**	۰,۰۰۱**	۰,۰۰۲**	۰,۰۱۶**	۴	آسکوربیک اسید و سرب
۱۰۰,۸۱۸**	۰,۰۰۲**	۰,۰۰۰۱۲**	۰,۰۰۰۱**	۰,۰۰۴**	۲	سالیسیلیک اسید و سرب
۱۸۶,۷۴۷**	۰,۰۰۰۰۵۱ ^{ns}	۰,۰۰۰۰۳**	۰,۰۰۱**	۰,۰۱۶**	۲	آسکوربیک اسید و سالیسیلیک اسید
۸,۵۷۱**	۰,۰۰۲۲۰۷ ^{ns}	۰,۰۰۰۰۲۱	۰,۰۰۰۰۳۴**	۰,۰۰۱ ^{ns}	۴	آسکوربیک اسید، سالیسیلیک اسید و سرب
۴,۳۱۶	۰,۰۰۷۱۶۵	۰,۰۰۰۰۰۱۳	۰,۰۰۰۰۳۶۶۷	۰,۰۰۰۲۸۰۷	۳۶	خطا
۱۸	۱۱	۱۸,۴۵	۱۶,۲۲	۱۴		CV

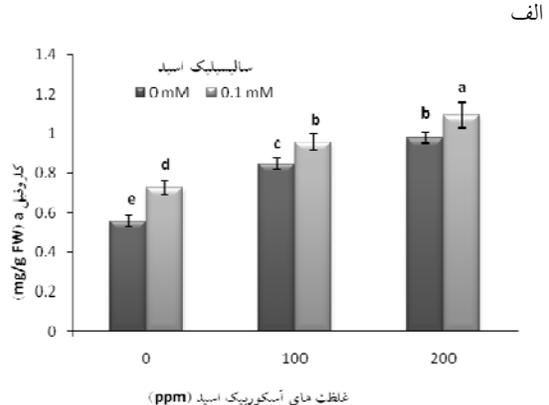
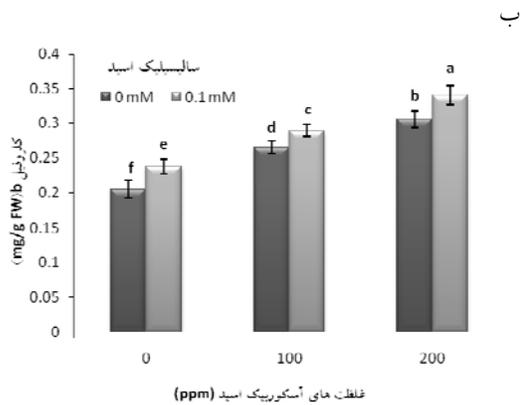
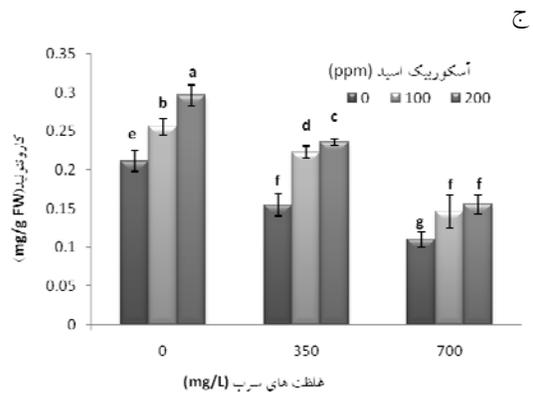
**،*،^{ns} به ترتیب معنی‌دار در سطح ۱٪ و ۵٪ و معنی‌دار نبودن

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 (جدول ۱).

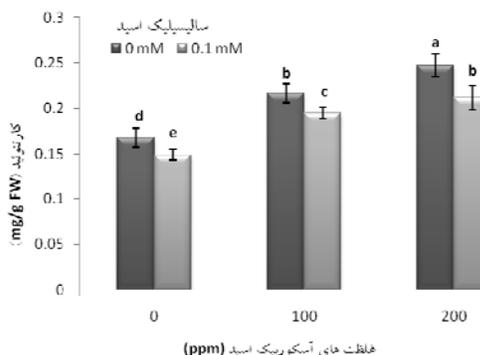
در این پژوهش، محلول‌پاشی سالیسیلیک اسید بر گیاهان بیمار شده با سرب باعث کاهش در فعالیت آنزیم کاتالاز شد (شکل ۴-الف). به‌طور مشابهی استفاده از آسکوربیک اسید نیز سبب کاهش فعالیت این آنزیم هم در گیاهان بیمار شده با سرب و هم در گیاهان شاهد شد (شکل ۴-



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.

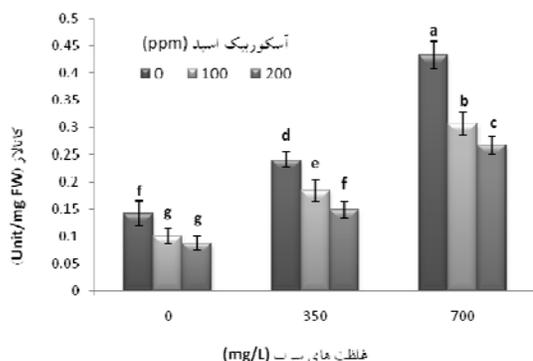


ج

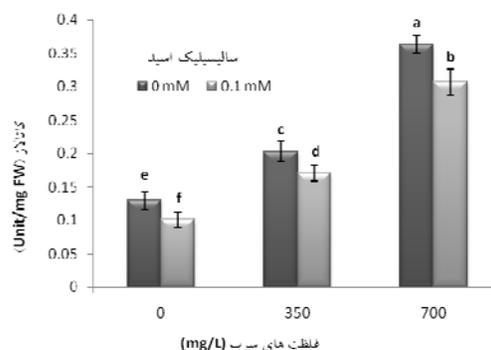


شکل ۳- تأثیر متقابل آسکوربیک اسید و سالیسیلیک اسید بر (الف) کلروفیل a، (ب) کلروفیل b و (ج) کارتنوئیدها. مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن می‌باشد و حروف غیرمشترک نشانه اختلاف معنی‌دار در سطح پنج درصد می‌باشد.

ب



الف



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.

رنگیزه های فتوستتزی: کاهش چشمگیر میزان رنگیزه های فتوستتزی (کلروفیل a, b و کارتنوئیدها) در گیاهان تحت تیمار سرب نمایانگر وسعت آسیب‌های اکسیداتیو است. این کاهش می‌تواند به دلیل بازدارندگی مراحل مختلف بیوستتزی رنگیزه ها توسط سرب باشد (۲۴). کاهش رنگ‌دانه‌های فتوستتزی تحت تنش سرب با نتایج Zengin و Munzuroglu (۲۰۰۵) و Prasad (۲۰۰۴) و Rady و Osman (۲۰۱۲) همسو است (۳۳، ۳۱، 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

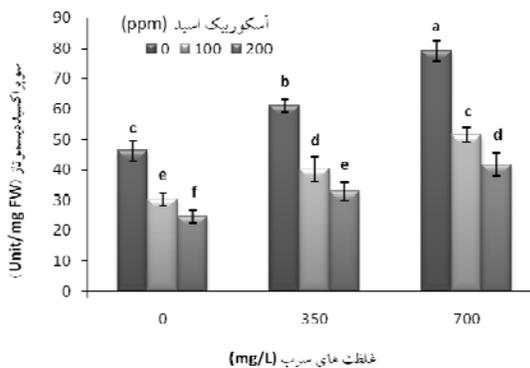
در این پژوهش اثرات ساده و متقابل کلیه فاکتورها بر فعالیت آنزیم سوپر اکسیددیسموتاز (SOD) در گیاه ریحان معنی‌دار بود (جدول ۱). طبق نتایج ما استفاده از آسکوربیک اسید و سالیسیلیک اسید در گیاهان تحت تنش سرب سبب کاهش فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز شد (شکل ۵). بعلاوه کاربرد هم‌زمان این دو ترکیب نیز بر گیاهان 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

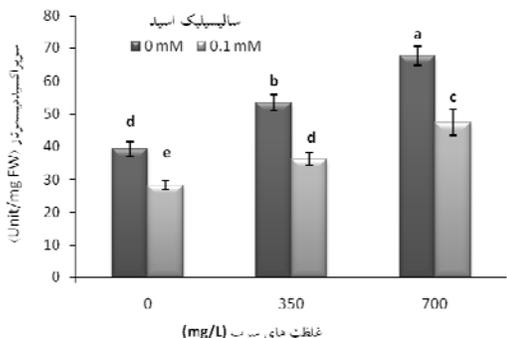
گیاهان ریحان و مرزنجوش سنتز کلروفیل کل را تحریک

می‌کند (۲۱).

الف

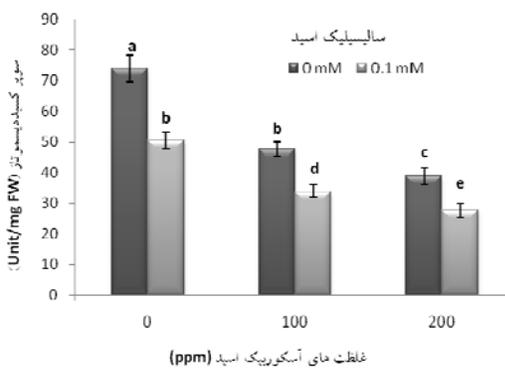


ب



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.

ج



هورمون‌های آبسزیزیک اسید (۳۸) و اتیلن (۴۵) بسیاری از روندهای فیزیولوژیکی و رشد گیاه را تنظیم می‌کند. از جمله با اثر بر روی آبسزیزیک اسید و تجمع این هورمون در گیاه باعث خوگیری گیاهان نسبت به تنش‌های محیطی می‌شود (۴۱). بنابراین کاهش مشاهده شده در مقدار کاروتنوئیدها در این پژوهش می‌تواند به دلیل تبدیل کاروتنوئیدها به آبسزیزیک 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 کاروتنوئیدها با تیمار آسکوربیک اسید مشاهده شد (۳). به‌طور مشابه، Shaddad و همکاران در سال ۱۹۹۰، Abdel- Wahed و همکاران در سال ۲۰۰۶

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 قابل توجهی 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 و ۶). سالیسیلیک اسید معمولاً با اثر بر روی

در ذرت، Hathout و همکاران در سال ۱۹۹۳ در گوجه‌فرنگی، Salem و همکاران در سال ۲۰۰۰ در چغندر قند، Hanna و همکاران در سال ۲۰۰۱ در گندم و El-Gabas در سال ۲۰۰۶ در گیاه آفتابگردان نشان دادند که آسکوربیک اسید کلروفیل‌های a و b و کلروفیل کل را افزایش داد و این را به تحریک بیوسنتز کلروفیل‌ها و تأخیر در پیری برگ توسط آسکوربیک اسید نسبت دادند (۴۰، ۳۴، ۲۳، ۱۵، ۸). یافته‌های این تحقیق مبنی بر افزایش 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 منعکس شده 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).

در ذرت، Hathout و همکاران در سال ۱۹۹۳ در گوجه‌فرنگی، Salem و همکاران در سال ۲۰۰۰ در چغندر قند، Hanna و همکاران در سال ۲۰۰۱ در گندم و El-Gabas در سال ۲۰۰۶ در گیاه آفتابگردان نشان دادند که آسکوربیک اسید کلروفیل‌های a و b و کلروفیل کل را افزایش داد و این را به تحریک بیوسنتز کلروفیل‌ها و تأخیر در پیری برگ توسط آسکوربیک اسید نسبت دادند (۴۰، ۳۴، ۲۳، ۱۵، ۸). یافته‌های این تحقیق مبنی بر افزایش 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 منعکس شده 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 افزایش بر فعالیت آنزیم کاتالاز داشته است که این نتیجه مشابه با نتایج بلادی و همکاران (۱۳۸۹) است (۱). به نظر می‌رسد که این‌گونه‌ی گیاهی در واقع 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 سالیسیلیک اسید در این پژوهش نیز با نتایج دولت‌آبادیان و همکاران (۱۳۸۷) و Chen و همکاران

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 سوپر اکسید 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

نتیجه‌گیری

به طور کلی داده‌های حاصل از تحقیق بیانگر آن است که با افزایش شدت تنش سرب محتوای رنگیزه‌های فتوسنتزی کاهش یافته و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی (کاتالاز و سوپراکسید 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 غلظت‌های دیگری که در این پژوهش به کار رفته است بهترین بازده را بر روی شاخص‌های بیوشیمیایی گیاه ریحان داشته‌اند.

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 درون سلولی افزایش یابد. این گونه‌ی فعال اکسیژن در اثر تنش‌های محیطی مختلف از جمله کم‌آبی، شوری و تشعشع بالا افزایش می‌یابد (۴۳).

منابع

۱. بلادی، م.، کاشانی، ع.، حبیبی، د. و پاک‌نژاد، ف. (۱۳۸۹) ارزیابی توزیع فلز سنگین سرب و مس و نقش دو آنزیم آنتی‌اکسیدان دریونجه (*Medicago sativa*) رقم همدانی. مجله زراعت و اصلاح نباتات، ۶(۴): ۷۳-۸۴.
 ۲. دولت‌آبادیان، آ.، ثانوی، ع. و اعتمادی، ف. (۱۳۷۸). اثر پیش‌تیمار سالیسیلیک اسید بر جوانه زنی بذر گندم (*Triticum aestivum* L.) در شرایط تنش شوری. مجله زیست‌شناسی ایران ۱۲ (۴): ۷۰۲-۶۹۲.
 ۳. دولت‌آبادیان، آ.، ثانوی، م. و شریفی، م. (۱۳۸۸). اثر تنش کم‌آبی و محلول پاشی اسید آسکوربیک بر میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان و برخی تغییرات بیوشیمیایی در برگ ذرت دانه ای (*Zea mays* L.). مجله زیست‌شناسی ایران. ۲۲(۳): ۴۰۷-۴۲۲.
 ۴. دولت‌آبادیان، آ.، ثانوی، م. و شریفی، م. (۱۳۸۸). اثر تغذیه برگ با آسکوربیک اسید بر فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان، تجمع
- 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
۵. پرولین و لیپید پراکسیداسیون کلزا (*Brassica napus* L.) در شرایط تنش شوری. علوم و فنون کشاورزی و منابع طبیعی. ۱۳ (۴۷): ۶۱۱-۶۲۲.
 ۶. سلاح‌ورزی، ی.، گلدانی، م.، نباتی، ج. و علیرضایی، م. (۱۳۹۰). تأثیر کاربرد برون‌زای آسکوربیک اسید بر برخی از تغییرات فیزیوشیمیایی مرزنجوش (*Origanum majorana* L.) تحت تنش شوری. مجله علوم باغبانی ایران، ۴۲(۲): ۱۶۷-۱۵۹.
 ۷. مظاهری تیرانی، م.، کلاتری، خ. و حبیبی، ن. (۱۳۸۷). مطالعه اثر متقابل اتیلن و سالیسیلیک اسید بر ابقاء تنش اکسیداتیو و مکانیسم‌های مقاومت به آن در گیاهان کلزا (*Brassica napus* L.). مجله زیست‌شناسی ایران. ۲۱(۳): ۴۲۱-۴۳۲.
 ۸. 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

- and Zn on *Ocimum basilicum* 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. *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 and Biology*, 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. *Acta Biologica Cracoviensia 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. *Acta Physiologiae Plantarum*, 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. Iqbal, 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

- 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 *Hypericum perforatum* L., *Acta Horticulturae*, 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 *Lupinus termis* and *Vicia faba* 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. Zheljzkov, V. and Nielsen, N.E., (1996). Growing clary sage (*Salvia sclarea* L.) in heavy metal polluted areas, *Acta Horticulturae*, 426:309-328.

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 experiment in a completely randomized design with three replications was conducted. Treatments were combination of 3 levels application of Pb (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/or together, 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