مطالعه تأثیر برون‌زای اسیدهای آلی و کلسیم بر بهبود شاخص‌های رشد و القاء اکسیداتیو در دو رقم گیاه کلزا (*Brassica napus* L.) تحت تنش آلومینیوم

حسین مظفری*[۱]، زهرا اسرار[۲]، حسن سالاری[۱]، حکیمه علومی[۱] و محمد مقتدر[۳]

[۱] **ایران، کرمان، دانشگاه تحصیلات تکمیلی صنعتی و فناوری پیشرفته کرمان، پژوهشگاه علوم و تکنولوژی پیشرفته و علوم محیطی، پژوهشکده علوم محیطی، گروه اکولوژی**

[۲] **ایران، کرمان، دانشگاه شهید باهنر کرمان، دانشکده علوم، بخش زیست‌شناسی**

[۳] **ایران، کرمان، دانشگاه تحصیلات تکمیلی صنعتی و فناوری پیشرفته کرمان، پژوهشگاه علوم و تکنولوژی پیشرفته و علوم محیطی، پژوهشکده علوم محیطی، گروه تنوع زیستی**

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۱۲/۲۷ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۴/۲۷

چکیده

سمیت آلومینیوم موجب بروز بیماری‌های عصبی، ریوی و کلیوی در انسان گردیده و میزان محصول و رشد گیاهان زراعی را کاهش می‌دهد. از عوامل بروز سمیت زیست‌محیطی آلومینیوم، می‌توان به افزایش نسبت بارندگی به تبخیر خاک، اسیدی‌شدن خاکها و فعالیت‌های صنعتی اشاره نمود. کلزا، سومین گیاه دانه روغنی دنیا، دارای ۴۰ تا ۴۵ درصد روغن و حداقل ۳۴ درصد پروتئین بوده و به دلیل افزایش سطح زیر کشت آن در دنیا، بررسی تأثیر سمیت آلومینیوم بر رشد و فیزیولوژی آن اهمیت دارد. در این پژوهش، میزان واکنش دو رقم کلزا (*Brassica napus*) شامل ارقام اکاپی و آپشن به سمیت ۸۰ میکرومولار سولفات-آلومینیوم و ایجاد مقاومت با لیگاندهایی شامل ۱ میلی‌مولار کلرید کلسیم و مخلوط ۲ میلی‌مولار از سه اسید آلی سیترات، مالات و اگزالات در محیط کشت هیدروپونیک بررسی شد. همچنین پارامترهای درصد جوانه‌زنی، میزان ترشح اسیدهای آلی ریشه، پارامترهای رشد، شاخص‌های آنتی‌اکسیدانی و آنزیمی سنجش گردید. نتایج نشان داد که یون کلسیم و اسیدهای آلی تأثیر معنی-داری در جهت کاهش اثرات سمی و اکسیداتیو آلومینیوم بر ارقام کلزا داشتند. بطوریکه با افزودن کلسیم به محلول غذایی حاوی تنش، اسیدهای آلی کمتری ترشح شده، که نشان از همبستگی بیشتر غشاء پلاسمائی و کاهش جذب آلومینیوم دارد. در این پژوهش، رقم اکاپی نسبت به آپشن پاسخ بهتری به لیگاندهای آزمایش جهت مقاومت به تنش آلومینیوم از خود نشان داد و از این نتیجه می‌توان جهت کاهش جذب فلزات سمی توسط گیاهان در خاک‌های آلوده و طراحی کودهای جدید استفاده نمود.

واژه‌های کلیدی: اسیدی شدن خاک، سمیت آلومینیوم، کلزا، کلسیم

* **نویسنده مسئول:** تلفن: ۰۹۱۳۱۹۷۱۸۷۳ ، پست الکترونیکی :Mozafari.hossein@gmail.com

مقدمه

اسیدی‌شدن خاک‌ها رشد بسیاری از موجودات زنده خاک را متوقف کرده و اثر نامطلوب آن شامل کمبود کلسیم، سمیت آلومینیوم و منگنز در گیاهان می‌باشد (۳، ۵ و۲۸). گونه‌های مختلف موجودات ازنظر تحمل به اسیدیته متفاوتند. میکروب‌های خاک احتمالاً بهتر از گیاهان می‌توانند اسیدیته را تحمل کنند (۸ و۳۰). اسیدی شدن محیط ریشه گیاهان، موجب عدم تعادل در جذب مواد غذایی شده و رشد گیاهی می‌گردد (۲و ۸). بطوریکه برخی از عناصر غذایی به میزان کمتر و برخی مانند آلومینیوم بسیار بیشتر از حد طبیعی جذب می‌گردند. بنابراین اسیدیته

محیط اطراف ریشه می‌تواند موجب سمیت ثانویه برخی عناصر گردد (۲۲). آلومینیوم ازجمله عناصر غیرسنگین مهمی است که در اسیدیته‌های کم، اثر سمی خود را بر گیاهان نشان می‌دهد. بنابراین در بیشتر خاک‌های اسیدی سمیت آلومینیوم نیز مشاهده می‌گردد. سمیت آلومینیوم در کشاورزی موجب کاهش رشد و محصول گیاهان شده و علاوه براین، تجمع آلومینیوم در گیاهان موجب انتقال و تجمع آن در بدن انسان می‌شود (۲، ۷ و ۲۸). بنابراین سمیت آلومینیوم در موجودات مختلف به‌خوبی اثبات شده است (۲۹). توانایی محلول‌های آبی مانند آب و خون جهت انتقال مواد در سوسپانسیون‌های حیاتی وابسته به شارژ الکتریکی ذرات کلوئید می‌باشد (۸، ۱۰ و ۲۲). تأثیر مخرب آلومینیوم بر پایداری سوسپانسیون، ۶۰۰۰ برابر بیشتر از یک کاتیون تک‌ظرفیتی می‌باشد. هنگامی که میزان این شارژ کاهش یابد، ذرات ریز معلق رسوب می‌دهند. این پدیده در گیاهان موجب اختلال تغذیه‌ای در گیاهان می‌شود (۱، ۳۰ و ۳۲). یکی از عوامل ایجاد سمیت زیست‌محیطی آلومینیوم، باران‌های اسیدی بوده که موجب آزاد سازی آن در خاک می‌شود. آلومینیوم و برخی عناصر سمی دیگر مانند سرب، جیوه، روی و کادمیوم در خاک-هایی با اسیدیته کمتر از ۵ آزاد شده و سمیت زیادی برای گیاه ایجاد می‌کند (۳۶ و ۳۷). این سمیت به‌صورت کاهش رشد ریشه و کاهش جذب کلسیم بروز می‌کند (۳۰).

عوامل سمیت آلومینیوم موجب نفوذ آن به خاک، آب، محصولات زراعی و انسان می‌گردند (۱۷، ۳۶، ۳۷ و ۵۹). عوامل ایجاد سمیت آلومینیوم شامل افزایش نسبت بارندگی به تبخیر و تعرق خاک، اسیدی شدن خاکها، فعالیت‌های صنعتی و کاربرد کودهای کشاورزی می‌باشند (۴۹). رشد و نمو گیاهان تحت تنش آلومینیوم کاهش می‌یابد. بعضی از علائم سمیت آلومینیوم مانند ترشح اسیدهای آلی ریشه‌ای، بعد از یک دوره کوتاه زمانی (در حد دقیقه یا ثانیه) آشکار شده و پاسخ طولانی مدت در ساعات و روزهای بعدی رخ می‌دهد. واکنش‌های بعدی به علت فعال شدن فرایندهای بیوشیمیایی و فیزیولوژیک ثانوی می‌باشند (۹، ۲۵ و ۵۰). علائم تنش آلومینیوم گیاهان تا حدی مشابه گالیم، ایندیم، لانتانید و اسکاندیم می‌باشد. یونهای فلزی تنش‌زا در مرحله اول موجب کاهش رشد ریشه می‌گردند. اگر چه گزارشاتی راجع به تاثیر مثبت آلومینیوم بر رشد و تحریک ریشه در گیاهان مقاوم به آلومینیوم نیز وجود دارد (۴). اولین علائم سمیت آلومینیوم و سایر فلزات سنگین در گیاهان در عرض چند ثانیه و در ۳۰ دقیقه اول ظاهر می‌شود (۴۳). این علائم شامل کاهش جذب کلسیم، مسدود شدن کانال‌های ورودی کلسیم، کاهش جذب منیزیم و نیترات، کاهش انتشار یون پتاسیم به خارج، تجمع کالوز، تراوش نمکهای مالیک اسید و سایر اسیدهای آلی، افزایش بیوسنتز کلاتهای گیاهی، نسخه‌برداری ژنهای شوک حرارتی و بیوسنتز پروتئین‌های شوک حرارتی می باشند (۴ و ۵۲). علائم متعدد در ریشه و اندام هوایی تحت تنش طولانی آلومینیوم یا فلزات سنگین در گیاهان ثبت شده است (۵۳ و ۵۷).

کاتیونهای آلومینیوم، به شدت توسط بارهای منفی گروههای کربوکسیلی مواد پکتیکی در مسیر آپوپلاستیک سلول‌های ریشه جذب می‌شوند (۴). با استفاده از میکروآنالیز اشعه ایکس، در گیاهانی مانند یولاف و گندم بعد از تیمار چند ساعته آلومینیوم، هیچ‌گونه آلومینیوم داخل سلولی شناسایی نشد. مطالعات کینتیکی جذب دو مرحله‌ای آلومینیوم در گندم نشان داده است (۴ و ۳۱). فاز اولیه، کوتاه، سریع و قابل اشباع و فاز بعدی کوتاه‌تر و خطی می‌باشد. فاز سریع اولیه به‌عنوان عامل تجمع دهنده آلومینیوم قابل تبادل در آپوپلاسم شناخته شده است (۵۵). فاز خطی جذب آلومینیوم ممکن است انتقال آلومینیوم در مسیر سیمپلاست را نشان دهد (۴و ۵۷). اخیراً لازوف و همکاران تجمع آلومینیوم سیمپلاستی را در نوک ریشه سویا تحت تنش کمتر از۳۰ دقیقه‌ای آلومینیوم، گزارش داده‌اند (۳۳). دو نوع مکانیسم مقاومت به سمیت یونهای فلزی را ایجاد می‌کنند. یکی اجتناب که شامل جلوگیری از

رسیدن یونهای سمی به جایگاه‌های اتصالشان است و دومی تحمل به یونهای فلزی که به فضای درون سلولی وارد می‌شوند. تحت شرایط خاص، یک مکانیسم مانند ترشح مالات از طریق ریشه در ژنوتیپهای مقاوم گندم ممکن است با درجه بالایی بروز کند (۴ و ۶۰). در میان ژنوتیپهای مختلف یک‌گونه و به همان نسبت در گونه‌های مختلف، مکانیسم‌های متفاوت فیزیولوژیک جهت مقاومت به فلزات ایجاد می‌شود (۴و ۵۸).

به هرحال در تحقیقات ترشح اسیدهای آلی مانند مالات از طریق ریشه در گندم موجب مقاومت بیشتر به سمیت یونهای فلزی شده است (۱۱ و ۵۱). بوولر در سال ۲۰۰۰ گزارش داد که کلسیم نیز نقش مهمی در بهبود مقاومت گیاه تحت تنش‌های محیطی ایفا می‌کند و موجب افزایش مقاومت گیاهان به تنش فلزات سنگین می شود که این واکنش از طریق همبستگی و پایداری غشا صورت می‌پذیرد (۱۲ و ۴۲).

کلزا سومین گیاه دانه روغنی دنیا است که دارای ۴۰ تا ۴۵ درصد روغن و حداقل ۳۴ درصد پروتئین می‌باشد و به دلائل مختلف شامل تولید روغن، تأثیر ریشه آن در بهبود مواد آلی و حاصلخیزی خاک، کاهش جمعیت آفات و کنترل علف‌های هرز، توجه بیشتری به کشت این گیاه در کشور شده است. دانه کلزا دارای ۲۵ تا ۵۵ درصد روغن، ۱۸ تا ۲۴ درصد پروتئین و ۱۲ تا ۲۰ درصد پوست است (۴و ۴۷).

در این پژوهش، ارزیابی میزان واکنش و مقاومت دو رقم گیاه کلزا (*Brassica napus*)، شامل آپشن و اکاپی، به سمیت آلومینیوم و بهبود مقاومت به این تنش با تیمارهای برون‌زای کلرید کلسیم و سه اسید آلی در دو مرحله جوانه‌زنی و رویشی گیاه ازلحاظ تغییر درصد جوانه‌زنی، شاخص‌های آنتی‌اکسیدانی و تغییر پارامترهای رشد در محیط کشت هیدروپونیک انجام گرفت. بنابراین مطالعه میزان تأثیر غلظت‌های اسیدهای آلی (مالیک، سیتریک و اگزالیک اسید) و کلسیم بر کاهش اثرات تنشی آلومینیوم در دو رقم کلزا در شرایط کنترل شده، از اهداف مهم این پژوهش می‌باشد.

مواد و روشها

ارقام کلزا مورد پژوهش: ارقام آپشن (Option) و اکاپی (Ocapi) جزء ارقام مهم کلزا بوده و در مناطق گرمسیری و نیمه‌گرمسیری جنوب شرق ایران کشت می‌گردند. بذر این ارقام از بخش دانه‌های روغنی مرکز تحقیقات کشاورزی کرمان تهیه گردید.

تیمارهای آزمایش: دراین پژوهش تیمارهای آزمایش شامل ۸ کد تیماری با استفاده از آزمایش فاکتوریل تعیین گردید (جدول ۱). این تیمارها برحسب نوع کد تیماری دارای ۸۰ میکرومولار سولفات آلومینیوم، ۲ میلی‌مولار از هرکدام اسیدهای آلی سیترات، مالات، اگزالات و همچنین ۱ میلی‌مولار کلرید کلسیم بود. اسیدهای آلی مورد استفاده به‌صورت محلول میکس (OA) استفاده شدند. این غلظت-ها پس از بهینه‌سازی در دو مرحله جوانه‌زنی و رویشی گیاه در قالب طرح کاملاً تصادفی در ۳ تکرار تیمار داده شدند (جدول ۱).

جدول ۱- محلول‌های مختلف تیمارها که شامل ترکیبی از ۸۰ میکرومولار سولفات‌آلومینیوم، ۲ میلی‌مولار از هرکدام اسیدهای آلی سیترات، مالات، اگزالات و همچنین ۱ میلی‌مولار کلرید کلسیم بودند

کد تیمار	۱(شاهد)	۲	۳	۴	۵	۶	۷	۸
ترکیب محلول تیمار:								
$[Al_2(SO_4)_3]$+mix of organic acids+$[CaCl_2]$	۰+۰+۰	۰+۰+۱	۰+OA+۰	۰+OA+۱	۸۰+۰+۰	۸۰+۰+۱	۸۰+OA+۰	۸۰+OA+۱

سترون سازی بذرها: جهت سترون سازی، بذرهای یکسان کلزا انتخاب شدند. بذرها با محلول هیپوکلریت سدیم ۰/۱ درصد به مدت ۲ دقیقه ضدعفونی و سپس سه مرتبه با آب مقطر دوبار تقطیر شسته شدند (۱۴).

رایط کشت بذرها: بذرها پس از ضدعفونی، به مدت سه ساعت در آب مقطر خیسانده شدند. سپس بذرها به پتری دیش‌های مرطوب شده با محلول‌های تیمار (pH=۶/۵) منتقل گردیدند. بذرها به مدت ۴ روز در تاریکی با دمای ۲۳ درجه سانتی‌گراد در ژرمیناتور نگهداری شدند (۱۶).

بررسی جوانه‌زنی بذر ارقام: بذرها به پتری دیش‌های استریل حاوی کاغذ صافی واتمن شماره ۱ (جهت حفظ رطوبت محیط) منتقل گردیدند. در هر پتری دیش ۱۰۰ عدد بذر در ردیف‌های ۱۰ تایی قرار داده شد. پتری دیش‌ها در ژرمیناتور شرکت گروک تهران، با دمای ۲۳ درجه سانتی‌گراد و رطوبت ۶۰ –۶۵ درصد نگهداری شدند. برای هر تیمار سه ظرف پتری دیش (سه تکرار) در نظر گرفته شد و تیمارها به حجم ۳ تا ۴ میلی‌لیتر به هریک اضافه گردید. پس از یک هفته، درصد جوانه‌زنی کل محاسبه گردید (۲۱).

کشت هیدرو پونیک (آب‌کشت) گیاه: جهت این کشت، از لوله‌های فالکون مخروطی ۵۰ میلی‌لیتری استفاده شد که دارای یک شبکه توری در سطح دهانه بودند. در دهانه هر لوله ۳ گیاهک کلزا قرار داده شد. لوله‌ها حاوی محلول غذایی پایه هوگلند بودند که برحسب نوع کد تیمار، میزان مشخصی تیمار به آن اضافه شد (جدول ۱ و جدول ۶ ضمائم مقاله) (۱۸). برای تأثیر بهتر تیمارها، اسیدیته محلول غذایی با HCL ۱ مولار به ۴/۵ رسانده شد. محلولها هر دو روز یکبار تعویض شدند. گیاهان در شرایط ۱۶ ساعت نور با دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و ۸ ساعت تاریکی با دمای ۲۳ درجه سانتی‌گراد با شدت نور ۱۲۰ میکرومول بر مترمربع بر ثانیه قرارگرفتند. پس از ۱۰ روز رشد، محلول غذایی حاوی هر کد تیماری اضافه گردید. مدت زمان تیمار گیاهان ۲۴ ساعت بود.

سنجش میزان رشد طولی و وزن تر ریشه: پس از تیمار گیاهان و خارج نمودن ریشه از داخل محلول غذایی، بلافاصله ریشه‌ها جهت تثبیت و کاهش تخریب بافتی با محلول ۰/۵ میلی‌مولار کلرید کلسیم شسته شده و سپس طول هر ریشه با خط کش اندازه‌گیری گردید. وزن تر ریشه با ترازوی الکترونیکی (با دقت ۰/۰۰۰۱ گرم) در هر لوله تعیین گردید (۶).

سنجش میزان اسیدهای ترشح شده توسط دستگاه HPLC: پس از تیمار گیاهان از محلول غذایی حاوی اسیدهای آلی ترشح شده، جهت تعیین غلظت اسیدهای آلی ترشح شده توسط ریشه استفاده گردید. محلول‌های بدست آمده با کاغذ فیلتر غشائی ۰/۴۵ میکرون (membrane filter) استات سلولز صاف گردیدند. محلول‌ها با حرارت ملایم ۴۰ درجه سانتی‌گراد تغلیظ شدند. از این محلول‌ها جهت تزریق در دستگاه HPLC استفاده گردید. دستگاه مورد استفاده ساخت شرکت Agilent بوده و ستون مورد استفاده از نوع ProntoSIL و به ابعاد (Dimension) ۳×۲۵۰ میلی‌متر بود (۶۶).

سنجش پراکسید هیدروژن (H_2O_2) در برگ: سنجش میزان تجمع پراکسید هیدروژن در برگ با استفاده از روش ولیکووا (۲۰۰۰) و همکاران به‌صورت رنگ سنجی انجام پذیرفت (۶۵). ۵۰۰ میلی‌گرم از بافت برگی در حمام یخ با تری کلرواستیک اسید ۰/۱ درصد سائیده شد. عصاره با سانتریفوژ یخچال دار به مدت ۳۰ دقیقه و با سرعت ۵۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ گردید. سپس ۰/۵ میلی‌لیتر از محلول رویی به ۰/۵ میلی‌لیتر بافر فسفات پتاسیم ۱۰ میلی مولار (pH =۷) و یک میلی‌لیتر یدید پتاسیم یک مولار اضافه گردید و جذب محلول‌ها در طول‌موج ۳۹۰ نانومتر خوانده شد. مقدار پراکسید هیدروژن در هر نمونه با

استفاده از ضریب خاموشی ۰/۲۸ $M^{-1}cm^{-1}$ محاسبه شد و برحسب میکرومول بر گرم وزن تر گزارش گردید.

سنجش میزان پراکسیداسیون لیپیدهای برگ: جهت مطالعه میزان پراکسیداسیون اسیدهای چرب غیراشباع غشائی در برگ تحت اثر تیمارها، غلظت مالون‌دآلدئید و سایر آلدئیدها به روشهای ذیل اندازه‌گیری گردید (۲۴و ۲۶).

تعیین غلظت مالون دآلدئید برگ: اندازه‌گیری مالون دآلدئید (MDA) به روش هیت و پکر (۱۹۶۹) انجام شد. شدت جذب محلول با استفاده از اسپکتروفتومتر مدل Varian Cary50 (ساخت استرالیا) در طول‌موج ۵۳۲ نانومتر خوانده شد. ماده‌ی مورد نظر برای جذب در این طول‌موج، کمپلکس قرمز MDA-TBA است. جذب عوامل مزاحم در ۶۰۰ نانومتر تعیین گردید و ازاین مقدار کسر گردید. برای محاسبه غلظت MDA از ضریب خاموشی معادل ۱۵۵ $mM^{-1}cm^{-1}$ استفاده شد و نتایج حاصل از اندازه‌گیری بر حسب نانومول بر گرم وزن‌تر محاسبه گردید.

غلظت سایر آلدئیدها (پروپانال، بوتانال، هگزانال، هپتانال و پروپانال) در برگ: سنجش میزان سایر آلدئیدها با روش(۱۹۹۲) میر و همکاران انجام شد. جذب عوامل مزاحم در ۶۰۰ نانومتر خوانده شد و از این مقدار کسر گردید. برای محاسبه غلظت این آلدئیدها از ضریب خاموشی معادل ۰/۴۵۷× 10^5 $mM^{-1}cm^{-1}$ استفاده شد. نتایج بر حسب نانومول بر گرم وزن تر محاسبه گردید (۲۴و ۲۶).

سنجش پروتئین کل در برگ: پروتئین‌های برگی در دمای بین صفر تا ۴ درجه سانتی‌گراد در بافر استخراج حاوی بافر فسفات ۵۰ میلی مولار با pH =۷/۲ ، اتیلن دی آمین تترااستیک اسید (EDTA) ۱ میلی مولار، فنیل متان سولفونیل فلورید (PMSF) ۱ میلی مولار و پلی وینیل پیرولیدون (PVP) ۱ درصد استخراج شدند و عصاره پروتئینی با استفاده از سانتریفیوژ یخچال‌دار به مدت ۳۰ دقیقه و با سرعت ۵۰۰۰ دور در دقیقه بدست آمد. جهت تعیین پروتئین کل هر نمونه از روش برادفورد (۱۹۷۶) استفاده شد. غلظت نهایی پروتئین با استفاده از منحنی استاندارد آلبومین محاسبه و بر حسب میلی‌گرم برگرم وزن تر گزارش گردید (۱۱).

فعالیت آنزیم کاتالاز (EC 1.11.1.6)(CAT) برگ: سنجش فعالیت آنزیم کاتالاز با استفاده از محاسبه سرعت تجزیه وکاهش جذب H_2O_2 در ۲۴۰ نانومتر و با روش دهیندسا و همکاران (۱۹۸۱) انجام شد. فعالیت آنزیم به‌صورت واحد آنزیمی (Enzyme unit) بر حسب مقدار پروتئین کل (میلی‌گرم) موجود در ۱۰۰ میکرولیتر عصاره پروتئینی حاصل از روش قبل در یک دقیقه محاسبه گردید. یک واحد آنزیمی کاتالاز مقدار آنزیمی است که ۱ میلی‌مولار H_2O_2 را در یک دقیقه تجزیه می‌کند (۲۷).

فعالیت آنزیم گایاکل پراکسیداز (EC 1.11.1.7)(GPX) برگ: سنجش فعالیت آنزیم پراکسیداز با استفاده از گایاکل و اندازه‌گیری میزان جذب تتراگایاکل (Tetraguiacol) تشکیل شده از گایاکل درنتیجه فعالیت پراکسیداز، در ۴۷۰ نانومتر با روش پلیوا (۱۹۹۱) انجام گرفت (۳۸و ۴۷).

فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز (APX) (EC1.11.1.1) برگ: سنجش فعالیت آنزیم آسکوربات پرکسیداز با استفاده از تغییرات جذب در دقیقه میزان آسکوربات برجای مانده پس از ۲ دقیقه محاسبه شد که از روش ناکانو و اسدا (۱۹۸۱) استفاده گردید. یک واحد آنزیمی آسکوربات‌پراکسیداز، مقدار آنزیمی است که یک میلی‌مولار آسکوربات را در یک دقیقه اکسید می‌کند (۴۳ و ۴۶).

فعالیت آنزیم پلی فنل اکسیداز (EC1.14.18.1)(PPO) برگ: کاهش جذب پیروگالول در ۴۲۰ نانومتر، پس از ۵

دقیقه در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد نسبت به زمان شروع واکنش، با روش کار و میشرا (۱۹۸۱) ثبت و محاسبه گردید. با استفاده از ضریب خاموشی پیروگالول ($mMol^{-1}$ cm^{-1} ۶/۲) و فرمول $A= \varepsilon bc$، مقدار برجای مانده پیروگالول در مخلوط واکنش به دست آمد. یک واحد آنزیمی پلی فنل اکسیداز شامل مقدار پیروگالولی است که در مدت ۱ دقیقه به پورپوروگالین تبدیل می‌شود. فعالیت آنزیمی برحسب واحد آنزیم در مقدار پروتئین کل (میلی‌گرم) موجود در ۱۰۰ میکرولیتر عصاره محاسبه گردید (۴۸ و ۳۹).

سنجش تجمع آلومینیوم، کلسیم و پتاسیم در اندام‌هوایی: سنجش تجمع عناصر آلومینیوم، کلسیم، پتاسیم با دستگاه طیف‌سنج نشراتمی پلاسمایی جفت شده القایی-ICP) (OESمدل 730-ES ساخت شرکت Varianاسترالیا -ICP Inductively Coupled Plasma atomic emission) OES spectroscopy) صورت گرفت. سنجش تجمع عناصر در دو مرحله انجام شد، ابتدا هضم اسیدی نمونه‌های گیاهی خشک و سپس ساخت استانداردهای لازم به‌صورت مخلوط (Mix) انجام شد. هضم اسیدی نمونه‌ها پس از خشک‌کردن در آون، با مخلوط اسیدی غلیظ حاوی اسید نیتریک ۶۵ درصد و اسید کلریدریک ۳۵/۵ درصد در مدت ۲۴ ساعت به‌خوبی صورت گرفت. درنهایت محلول‌ها حرارت داده شده، صاف شده و به حجم مشخص رسانده شدند و به دستگاه ICP تزریق شد (۱۳). استانداردهای عناصر نیز جهت تزریق به دستگاه به‌صورت مخلوط (Mix) تهیه شد. برای ساخت محلول استاندارد عناصر مورد نظر (K, Al, Ca) از نمکهای خشک KCl، $CaCl_2$ و $AlCl_3$ حل شده در HNO3 رقیق استفاده گردید. پس از رسم منحنی استاندارد، غلظت نهایی هر عنصر در نمونه‌ها بدست آمد (۱۳).

تجزیه آماری داده‌ها: داده‌ها با نرم‌افزارSPSS 18.0 با سه تکرار به روش آنالیز واریانس یکطرفه (One way-ANOVA) مورد تجزیه آماری قرارگرفتند. مقایسه میانگین داده‌ها با آزمون چند دامنه‌ای دانکن با خطای ۵ درصد انجام گردید. نمودارهای مربوطه نیز با استفاده از نرم‌افزار Excel 2010 رسم شد.

نتایج

جوانه‌زنی بذر ارقام کلزا: نتایج درصد جوانه‌زنی نشان داد که تنش آلومینیوم موجب کاهش معنی‌دار (در سطح ۵ درصد) درصد جوانه‌زنی در بذرهای تیمار شده با آلومینیوم در هر دو رقم کلزا نسبت به نمونه‌های شاهد گردید. تیمارهای کلسیم و مخلوط اسیدهای آلی موجب بهبود این پارامتر در بذرهای تحت سمیت آلومینیوم شدند. در رقم آپشن تأثیر تیمارها مشاهده نگردید و فقط در رقم اکاپی فرایند جوانه‌زنی دانه و خروج ریشه‌چه نسبت به تنش آلومینیوم مقاومت نشان دادند (جدول ۲).

رشد طولی اندام هوایی و ریشه: تنش آلومینیوم موجب کاهش معنی‌دار رشد طولی اندام هوایی در هر دو رقم نسبت به شاهد گردید و کاربرد اسیدهای آلی و کلسیم به‌طور جداگانه و توام با آلومینیوم، موجب بهبود این شاخص گردید. کاهش رشد طولی اندام هوایی رقم اکاپی تحت تنش آلومینیوم، با کاربرد جداگانه کلسیم و اسیدهای آلی بهبود یافت، همچنین اثر متقابل این دو لیگاند در این شرایط در رقم اخیر مشاهده شد. اما کاهش معنی‌دار رشد طولی ریشه تحت تیمار آلومینیوم تنها در هر دو رقم، برخلاف اندام هوایی مشاهده گردید و افزودن اسیدهای آلی به محیط غذایی دارای تأثیر بیشتری نسبت به سایر تیمارها در رقم اکاپی در جهت افزایش رشد طولی ریشه بود (جدول ۳).

تغییرات وزن تر اندام هوایی و ریشه تحت تأثیر تیمارها: تأثیر دو لیگاند کلسیم و اسیدهای آلی موجب شده است که تحت تنش آلومینیوم، کلسیم به تنهایی موجب بهبود وزن تر اندام هوایی در رقم اکاپی شود. اما در رقم دیگر

تحت همین شرایط تأثیر کلسیم بدون اسید آلی چندان قابل‌توجه نبود، تأثیر توأم بین کلسیم و اسیدهای آلی در دو رقم کلزا به‌خوبی مشهود بود (جدول ۳). البته تحت شرایط تنش آلومینیوم در رقم آپشن، کاربرد جداگانه کلسیم و اسیدهای آلی توانست میزان وزن تر اندام هوایی را بهبود داده که در این شرایط همانطور که قبلاً ذکر شد اثر متقابل بین کلسیم و اسیدهای آلی نیز معنی‌دار بود. در مورد وزن تر ریشه تأثیر بهبود بخش متقابل اسیدهای آلی و کلسیم در شرایط تنش در هر دو رقم در سطح ۵ درصد معنی‌دار بود (جدول ۳).

جدول ۲- تأثیر غلظت‌های ۰ و ۸۰ میکرومولارآلومینیوم، اسیدهای آلی (۲ میلی مولار اگزالات، مالات و سیترات) و کلسیم (۱ میلی مولار) بر تغییر میانگین پارامترهای درصد جوانه‌زنی بذر، طول اندام هوایی و ریشه، وزن تر اندام هوایی در دو رقم کلزا (آپشن و اکاپی) در سطح معنی‌دار ۵ درصد. حروف متفاوت لاتین بیانگر اختلاف معنی‌دار در آزمون چند دامنه‌ای دانکن در روش آنالیز واریانس می‌باشند. اعداد به‌صورت میانگین ± انحراف معیار می‌باشند

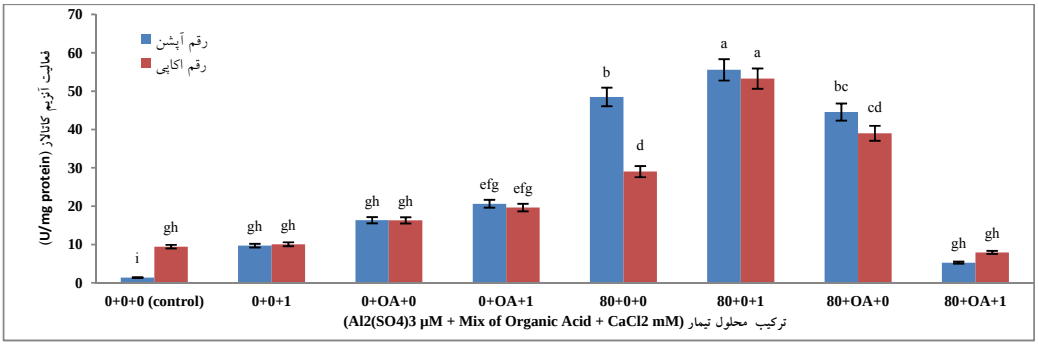
ترکیب محلول تیمار ($Al_2(SO_4)_3$ µM + Mix of Organic Acid + $CaCl_2$ mM)	درصد جوانه‌زنی بذر (%)		طول اندام هوایی (cm/plant)		طول ریشه (cm/plant)		وزن تر اندام هوایی (gr/plant)	
	رقم آپشن	رقم اکاپی	رقم آپشن	رقم اکاپی	رقم آپشن	رقم اکاپی	رقم آپشن	رقم اکاپی
0+0+0 (control)	85±2.05^{ab}	79±3.14^{ab}	5.4±0.12^{ab}	4.8±0.24^{ab}	9.4±0.31^{a}	8.5±0.41^{ab}	3.4±0.05^{a}	3.5±0.12^{ab}
0+0+1	80±2.11^{ab}	75±2.11^{b}	4.5±0.15^{ab}	4.2±0.14^{b}	9.8±0.41^{a}	10.2±0.02^{a}	2.8±0.04^{bc}	2.2±0.10^{a}
0+OA+0	83±1.11^{ab}	70±1.05^{bc}	5.4±0.22^{ab}	4.8±0.13^{bc}	7.65±0.25^{c}	8.01±0.03^{bc}	2.65±0.09^{c}	2.01±0.08^{bc}
0+OA+1	75±3.14^{cd}	78±0.05^{bc}	4.5±0.23^{cd}	4.2±0.08^{bc}	7.54±0.14^{cd}	6.53±0.11^{f}	2.54±0.07^{de}	2.47±0.09^{e}
80+0+0	49±2.11^{e}	25±1.11^{f}	5.4±0.28^{e}	4.8±0.05^{f}	4.9±0.19^{gh}	3.85±0.25^{h}	1.01±0.11^{gh}	1.15±0.07^{h}
80+0+1	79±2.35^{b}	74±2.55^{bc}	4.5±0.08^{b}	4.2±0.27^{bc}	8.44±0.26^{b}	8.21±0.40^{bc}	2.44±0.09^{b}	2.21±0.09^{bc}
80+OA+0	82±2.11^{ab}	87±1.05^{ab}	5.4±0.09^{ab}	4.8±0.11^{ab}	7.33±0.18^{de}	6.87±0.31^{ef}	2.33±0.03^{de}	2.81±0.12^{cd}
80+OA+1	87±3.53^{ab}	90±3.48^{a}	4.5±0.07^{ab}	4.2±0.09^{a}	9.12±0.40^{ab}	8.54±0.42^{ab}	2.82±0.02^{cd}	2.54±0.13^{cd}

تجمع پراکسید هیدروژن (H_2O_2) و پراکسیداسیون لیپیدهای غشایی: تنش آلومینیوم تجمع آب اکسیژنه و پراکسیداسیون لیپیدها را در اندام هوایی با الگویی مشابه نسبت به شاهد افزایش داد (جدول ۴). میزان افزایش تجمع آب اکسیژنه در اندام هوایی رقم‌های آپشن و اکاپی تحت تنش به ترتیب ۵/۸ و ۶ برابر شاهد بود. همچنین تأثیر مقادیر اضافی آلومینیوم برافزایش آب اکسیژنه ریشه در رقم اکاپی مشهودتر بود و تأثیر لیگاندها در جهت کاهش تجمع آب اکسیژنه در ریشه بیشتر بود. به طوریکه تحت تنش آلومینیوم، اثر متقابل کلسیم و اسیدهای آلی موجب کاهش ۵/۱۶ برابری آب اکسیژنه نسبت به شرایط تنش آلومینیوم گردید (جدول ۳). تنش آلومینیوم موجب افزایش معنی‌دار مالون‌دآلدئید و سایر آلدئیدها در هر دو رقم کلزا به ویژه رقم اکاپی مورد مطالعه گردید. بنابراین سطح سمی آلومینیوم اعمال شده بر گیاهان کلزا موجب القاء تنش اکسیداتیو و تولید رادیکالهای فعال شده است (جدول ۳).

جدول ۳- تأثیر غلظت‌های ۰ و ۸۰ میکرومولارآلومینیوم، اسیدهای آلی (۲ میلی مولار اگزالات، مالات و سیترات) و کلسیم (۱ میلی مولار) بر تغییر میانگین پارامترهای وزن‌تر ریشه، تجمع مالون دآلدئید و سایر آلدئیدهای برگ، تجمع آب اکسیژنه برگ در دو رقم کلزا (آپشن و اکاپی) در سطح معنی‌دار ۵ درصد. حروف متفاوت لاتین بیانگر اختلاف معنی‌دار در آزمون چند دامنه‌ای دانکن در روش آنالیز واریانس می‌باشند. اعداد به‌صورت میانگین ± انحراف معیار می‌باشند

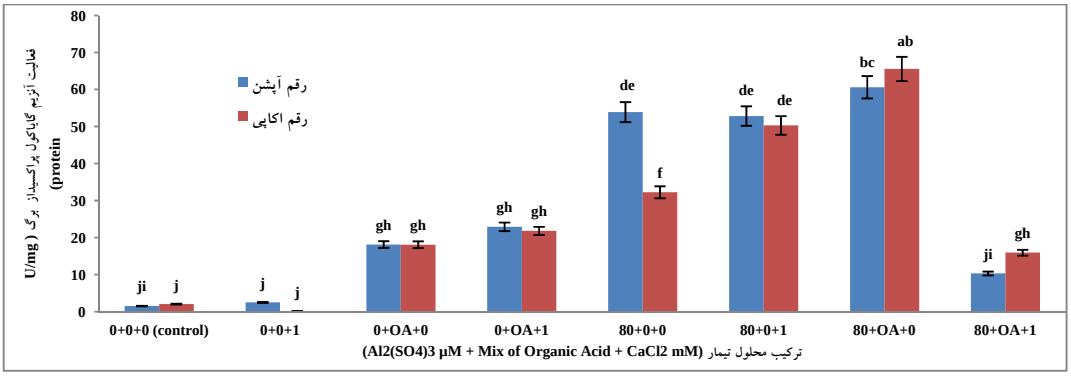
ترکیب محلول تیمار ($Al_2(SO_4)_3$ µM + Mix of Organic Acid + $CaCl_2$ mM)	وزن‌تر ریشه (gr/plant)		تجمع مالون دآلدئید برگ (nM/gr FW)		تجمع سایر آلدئیدها برگ (nM/gr FW)		تجمع آب اکسیژنه برگ (M/ gr µFW)	
	رقم آپشن	رقم اکاپی	رقم آپشن	رقم اکاپی	رقم آپشن	رقم اکاپی	رقم آپشن	رقم اکاپی
0+0+0 (control)	2.4±0.05^{b}	2.5±0.11^{ab}	0.015±0.0^{fg}	0.20±0.00^{j}	0.15±0.02^{j}	1.05±0.05^{fg}	10.4±0.58^{h}	9.5±1.2^{h}
0+0+1	2.8±0.01^{a}	3.2±0.02^{a}	0.11±0.0^{hi}	0.11±0.01^{hi}	1.08±0.01^{hi}	1.12±0.04^{hi}	10.8±0.66^{h}	11.2±0.91^{h}
0+OA+0	1.65±0.02^{cd}	1.01±0.03^{gh}	0.18±0.0^{gh}	0.18±0.00^{gh}	1.82±0.01^{gh}	1.81±0.00^{gh}	18.15±0.87^{gh}	18.11±1.15^{gh}
0+OA+1	1.54±0.01^{cd}	1.47±0.03^{de}	0.23±0.0^{gh}	0.32±0.01^{f}	2.29±0.10^{gh}	2.18±0.01^{gh}	22.94±1.2^{gh}	31.83±2.81^{f}
80+0+0	1.01±0.01^{gh}	1.15±0.04^{ef}	1.14±0.01^{a}	1.02±0.00^{ab}	10.4±0.52^{a}	10.2±0.59^{ab}	113.9±1.01^{a}	122.35±4.75^{ab}
80+0+1	1.44±0.02^{de}	1.21±0.01^{ef}	0.73±0.0^{b}	0.80±0.00^{bc}	7.28±0.34^{b}	7.03±0.31^{bc}	92.84±5.8^{b}	90.31±2.68^{bc}
80+OA+0	1.33±0.03^{bc}	2.13±0.03^{de}	0.61±0.01^{de}	0.66±0.00^{de}	6.06±0.36^{de}	6.56±0.24^{de}	60.63±3.4^{de}	65.57±2.7^{de}
80+OA+1	2.82±0.01^{ab}	2.54±0.02^{ab}	0.10±0.0^{gh}	0.20±0.00^{hi}	1.03±0.05^{hi}	2.99±0.14^{gh}	10.3±4.3^{hi}	9.94±1.67^{gh}

فعالیت آنزیم کاتالاز (CAT): بطور کلی روند تأثیر تنش بر میزان فعالیت کاتالاز برگ افزایشی بود و نشان دهنده القا تنش اکسیداتیو در دو رقم کلزا توسط آلومینیوم می‌باشد. در رقم اکاپی و آپشن تنش آلومینیوم به ترتیب موجب افزایش ۲۵ و ۴۵ برابری فعالیت این آنزیم نسبت به شاهد در اندام هوایی گردیدند، در حالیکه تیمار آلومینیوم توام با لیگاندها در این ارقام تأثیر معنی‌داری بر کاهش فعالیت آن داشت (نمودار ۱).



نمودار ۱- تأثیر غلظت‌های ۰ و ۸۰ میکرومولارآلومینیوم، اسیدهای آلی (۲ میلی مولار اگزالات، مالات و سیترات) و کلسیم (۱ میلی مولار) بر فعالیت کاتالاز برگ در دو رقم کلزا (آپشن و اکاپی) در سطح معنی‌دار ۵ درصد. حروف متفاوت لاتین روی نمودار بیانگر اختلاف معنی‌دار در آزمون چند دامنه‌ای دانکن در روش آنالیز واریانس می‌باشند. علامت error bar بیانگر SE می‌باشد

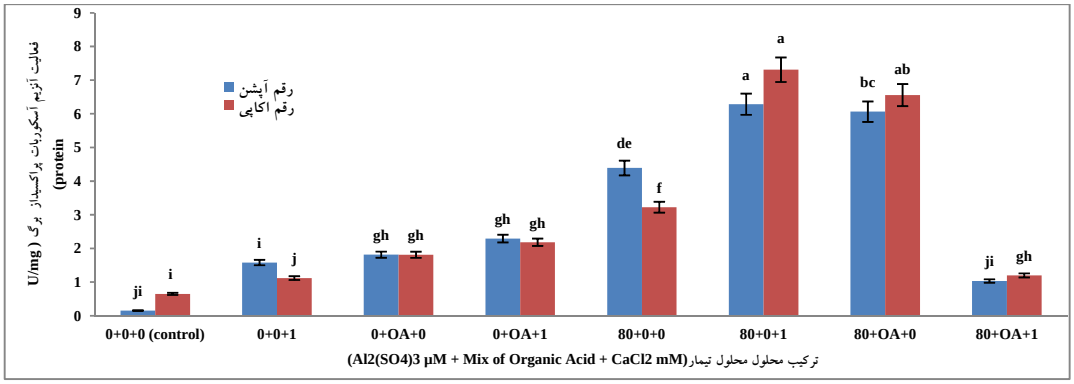
فعالیت آنزیم گایاکل پراکسیداز (GPX): تیمارهای آزمایش دارای تأثیر متفاوتی بر فعالیت آنزیم گایاکل پراکسیداز بودند. هرچند که تغییرات افزایشی در فعالیت این آنزیم آنتی‌اکسیدانی مانند آنزیم کاتالاز در شرایط تنش قابل‌توجه بود. اما ارقام اکاپی و آپشن تحت تنش افزایش فعالیت گایاکل پراکسیداز به ترتیب ۵۰ و ۳۵ برابر نسبت به شاهد نشان دادند. در هر دو رقم کلزا تحت تیمار حاوی هر سه ماده آلومینیوم، اسید آلی و کلسیم، فعالیت این آنزیم به‌خوبی کاهش یافت (نمودار ۲).



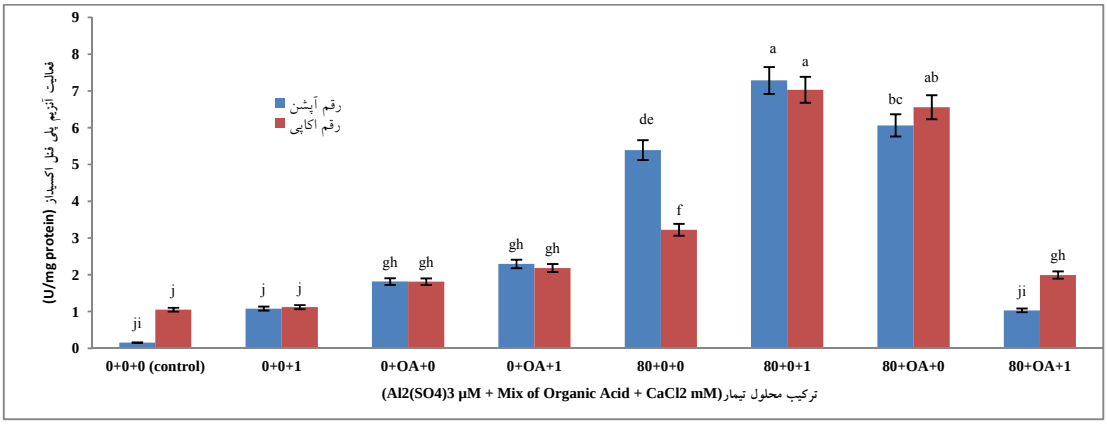
نمودار ۲- تأثیر غلظت‌های ۰ و ۸۰ میکرومولارآلومینیوم، اسیدهای آلی (۲ میلی مولار اگزالات، مالات و سیترات) و کلسیم (۱ میلی مولار) بر فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز در دو رقم کلزا (آپشن و اکاپی) در سطح معنی‌دار ۵ درصد. حروف متفاوت لاتین روی نمودار بیانگر اختلاف معنی‌دار در آزمون چند دامنه‌ای دانکن در روش آنالیز واریانس می‌باشند

فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز (APX): سنجش فعالیت آنزیم آسکوربات‌پراکسیداز نشان داد که نوع رقم ازنظر آماری یک فاکتور تأثیرگذار بوده و پاسخ ارقام به تیمارهای تنش‌زا و مقاومت‌زا به‌طور معنی‌داری متفاوت بود. هرچند که در مورد اغلب پارامترهای سنجش شده دیگر نیز عامل رقم تأثیر معنی‌دار بر آزمایش داشت. در

رقم اکاپی تأثیر سمیت آلومینیوم بر فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز در اندام هوایی نسبت به شاهد افزایشی بود. بطوریکه تحت تنش آلومینیوم، فعالیت آن بصورت ۷ برابر افزایش در رقم اکاپی و ۶ برابر افزایش در رقم آپشن نسبت به شاهد ثبت گردید که لیگاندها آن را کاهش دادند. این موضوع تا حدی در مورد آنزیم پلی فنل اکسیداز نیز صدق می‌کند. (نمودارهای ۳ و ۴).



نمودار ۳- تأثیر غلظت‌های ۰ و ۸۰ میکرومولارآلومینیوم، اسیدهای آلی (۲ میلی مولار اگزالات، مالات و سیترات) و کلسیم (۱ میلی مولار) بر فعالیت آنزیم اسکوربات پراکسیداز برگ در دو رقم کلزا (آپشن و اکاپی) در سطح معنی‌دار ۵ درصد، حروف متفاوت لاتین روی نمودار بیانگر اختلاف معنی‌دار در آزمون چند دامنه‌ای دانکن در روش آنالیز واریانس می‌باشند



نمودار ۴- تأثیر غلظت‌های ۰ و ۸۰ میکرومولارآلومینیوم، اسیدهای آلی (۲ میلی مولار اگزالات، مالات و سیترات) و کلسیم (۱ میلی مولار) بر فعالیت آنزیم پلی فنل اکسیداز برگ در دو رقم کلزا (آپشن و اکاپی) در سطح معنی‌دار ۵ درصد، حروف متفاوت لاتین روی نمودار بیانگر اختلاف معنی‌دار در آزمون چند دامنه‌ای دانکن در روش آنالیز واریانس می‌باشند

بررسی تجمع آلومینیوم، کلسیم و پتاسیم در اندام هوایی سنجش شده با ICP: نتایج نشان داد که تنش آلومینیوم موجب تجمع آلومینیوم در اندام هوایی ارقام کلزا گردید. در رقم اکاپی میزان آلومینیوم اندام هوایی به ۴ درصد وزن خشک تحت تنش آلومینیوم رسید. تحت شرایط تنش هم میزان تجمع آلومینیوم در اندام هوایی به ۳/۵ درصد وزن خشک در رقم آپشن رسید (جدول ۴). کاربرد لیگاندها موجب کاهش تجمع آلومینیوم اندام هوایی در دو رقم گردید و دراین میان اثر متقابل دو لیگاند تأثیرگذارتر از حالات جداگانه کاربرد آنها می‌باشد. این لیگاندها میزان کلسیم و پتاسیم اندام هوایی را نیز بهبود بخشیدند. تنش آلومینیوم موجب کاهش جذب و تجمع کلسیم گردید. در رقم آپشن تحت تنش، کاهش ۲/۵ برابری نسبت به شاهد مشاهده گردید و میزان پتاسیم رقم اکاپی نیز تحت سمیت

آلومینیوم، ۲ برابر کاهش یافت. کاربرد لیگاندها در رقم آپشن موجب افزایش میزان پتاسیم تجمع در حد گیاهان شاهد گردید. در برخی تیمارهای حاوی لیگاندها میزان پتاسیم تا حدی بیش از گیاهان شاهد بود (جدول ۴).

جدول ۴- تأثیر غلظت‌های ۰ و ۸۰ میکرومولارآلومینیوم، اسیدهای آلی (۲ میلی مولار اگزالات، مالات و سیترات) و کلسیم (۱ میلی مولار) بر تغییر میانگین تجمع سه عنصر آلومینیوم، کلسیم و پتاسیم در اندام هوایی دو رقم کلزا (آپشن و اکاپی) در سطح معنی‌دار ۵ درصد. حروف متفاوت لاتین بیانگر اختلاف معنی‌دار در آزمون چند دامنه‌ای دانکن در روش آنالیز واریانس می‌باشند. اعداد به‌صورت میانگین ± انحراف معیار می‌باشند

ترکیب محلول تیمار ($Al2(SO_4)_3$ µM + Mix of Organic Acid + $CaCl_2$ mM)	تجمع آلومینیوم (%DW)		تجمع کلسیم (%DW)		تجمع پتاسیم (%DW)	
	رقم آپشن	رقم اکاپی	رقم آپشن	رقم اکاپی	رقم آپشن	رقم اکاپی
0+0+0 (control)	0^{e}	0^{e}	3.07 ± 0.15^{e}	3.125 ± 0.02^{f}	4.07 ± 0.06^{ab}	4.13 ± 0.08^{ab}
0+0+1	0^{e}	0^{e}	4.9 ± 0.14^{a}	5.1 ± 0.06^{a}	3.9 ± 0.11^{b}	3.1 ± 0.12^{de}
0+OA+0	0^{e}	0^{e}	4.83 ± 0.13^{ab}	4.01 ± 0.11^{d}	3.83 ± 0.02^{cd}	3.01 ± 0.13^{de}
0+OA+1	0^{e}	0^{e}	3.77 ± 0.11^{bc}	3.27 ± 0.14^{ef}	3.77 ± 0.05^{cd}	3.27 ± 0.09^{e}
80+0+0	3.45 ± 0.11^{a}	3.925 ± 0.12^{ab}	$2.45\pm0.^{12}$	1.93 ± 0.05^{g}	1.45 ± 0.08^{f}	1.93 ± 0.04^{f}
80+0+1	2.722 ± 0.13^{b}	3.6105 ± 0.11^{ab}	4.72 ± 0.14^{ab}	4.61 ± 0.10^{bc}	2.72 ± 0.11^{e}	2.61 ± 0.03^{ef}
80+OA+0	1.665 ± 0.11^{c}	1.435 ± 0.02^{c}	3.66 ± 0.10^{cd}	3.44 ± 0.06^{ef}	1.67 ± 0.03^{f}	1.44 ± 0.05^{g}
80+OA+1	0.56 ± 0.12^{d}	0.27 ± 0.01^{d}	4.56 ± 0.16^{b}	4.27 ± 0.09^{d}	4.56 ± 0.09^{ab}	4.27 ± 0.10^{ab}

تغییرات میزان اسیدهای آلی: داده‌ها نشان داد که تنش آلومینیوم تأثیر معنی‌داری در جهت افزایش ترشح اسیدهای آلی مورد نظر دارد. در رقم اکاپی میزان سیترات و اگزالات تحت تنش آلومینیوم بیشتر از میزان این اسیدهای آلی در شاهد بطور حد معنی‌دار بود. در هر دو رقم کلزا، افزایش میزان سیترات قابل‌توجه بوده و به حد ۲۵ میکرومول بر هر گرم وزن خشک ریشه در هر ساعت رسید. میزان اگزالات نیز در هر دو رقم به‌طور نسبی نسبت به شرایط بدون تنش افزایش نشان داد. رقم اکاپی دارای ترشح اسید آلی بیشتر در واکنش به آلومینیوم ریشه بود (جدول ۵).

جدول ۵- تأثیر غلظت‌های ۰ و ۸۰ میکرومولارآلومینیوم، اسیدهای آلی (۲ میلی مولار اگزالات، مالات و سیترات) و کلسیم (۱ میلی مولار) بر تغییر افزایشی میانگین سه اسید آلی ترشح شده مالات، سیترات و اگزالات در دو رقم کلزا (آپشن و اکاپی) در سطح معنی‌دار ۵ درصد. حروف متفاوت لاتین بیانگر اختلاف معنی‌دار در آزمون چند دامنه‌ای دانکن در روش آنالیز واریانس می‌باشند. اعداد به‌صورت میانگین ± انحراف معیار می‌باشند

ترکیب محلول تیمار ($Al2(SO_4)_3$ µM + Mix of Organic Acid + $CaCl_2$ mM)	غلظت اگزالات (µM/grDW)		غلظت مالات (µM/grDW)		غلظت سیترات (µM/grDW)	
	رقم آپشن	رقم اکاپی	رقم آپشن	رقم اکاپی	رقم آپشن	رقم اکاپی
0+0+0 (control)	0^{e}	0^{e}	0^{f}	0^{e}	0^{f}	0^{g}
0+0+1	5.13 ± 0.14^{d}	3.11 ± 0.152^{d}	1.35 ± 0.16^{de}	1.72 ± 0.02^{d}	14.88 ± 0.41^{e}	13.12 ± 0.21^{f}
0+OA+0	5.32 ± 0.14^{d}	3.21 ± 0.12^{d}	1.44 ± 0.17^{de}	1.91 ± 0.01^{cd}	14.92 ± 0.45^{e}	14.28 ± 0.24^{e}
0+OA+1	5.46 ± 0.28^{cd}	3.34 ± 0.11^{cd}	1.54 ± 0.15^{de}	2.30 ± 0.00^{c}	15.77 ± 0.48^{d}	16.54 ± 0.61^{cd}
80+0+0	6.51 ± 0.33^{bc}	4.05 ± 0.25^{c}	2.56 ± 0.17^{cd}	2.45 ± 0.01^{bc}	16.26 ± 0.61^{bc}	17.82 ± 0.34^{c}
80+0+1	6.98 ± 0.15^{bc}	4.15 ± 0.35^{c}	2.66 ± 0.22^{c}	2.52 ± 0.05^{bc}	17.59 ± 0.51^{bc}	17.90 ± 0.25^{c}
80+OA+0	7.11 ± 0.41^{ab}	5.11 ± 0.14^{b}	3.28 ± 0.24^{ab}	2.71 ± 0.06^{b}	18.11 ± 0.71^{b}	19.13 ± 0.21^{b}
80+OA+1	7.20 ± 0.44^{a}	5.81 ± 0.81^{ab}	3.30 ± 0.14^{a}	3.16 ± 0.02^{a}	24.68 ± 0.91^{a}	25.50 ± 0.11^{a}

بحث و نتیجه‌گیری

دراین پژوهش میزان رشد و اغلب پارامترهای اکسیداتیو ارقام کلزا بطور معنی‌داری تحت تأثیر تیمارها و تنش آلومینیوم قرارگرفت. تغییر پارامترها نیز در بین دو رقم کلزا و تیمارها، ازلحاظ آماری چشمگیری بود. بطوریکه در تنش بدون لیگاندها در هر دو رقم، در مقایسه با شاهد کاهش معنی‌دار رشد و افزایش شاخص‌های تنش اکسیداتیو (آنزیمی و غیرآنزیمی) مشاهده گردید. افزودن لیگاندها به محیط کشت دارای تأثیر بیشتری نسبت به سایر تیمارها جهت افزایش رشد طولی ریشه بود (جداول ۲و ۳).

تنش آلومینیوم موجب افزایش تجمع رادیکالهای مختلف اکسیژن (ROS= Reactive Oxygen Species) در سلول گیاهی می‌گردد (۱و ۱۵). تنش اکسیداتیو زمانی رخ می‌دهد که تعادل بین تولید و تجزیه گونه فعال اکسیژن به هم خورد و تولید این رادیکال‌ها بیش از تجزیه آن باشد (۳۸و

۴۰). رادیکالهای ROS دارای توانایی تخریب لیپیدهای غشائی، پروتئین‌ها و نوکلئیک اسیدها در سلول هستند و موجب تغییرات ساختاری نامناسب دراین ترکیبات آلی سلول می‌گردند و عملکرد حیاتی آنها را از بین می‌برند (۱۴و ۴۰). داده‌های این تحقیق نیز منطبق براین موضوع است که در سنجش آب اکسیژنه و تجمع MDA، پراکسیداسیون غشاء به‌خوبی دیده می‌شود (جدول ۴).

میزان تجمع آب اکسیژنه یکی از شاخص‌های مهم پراکسیداسیون لیپیدهای غشایی و تنش اکسیداتیو در سلول می‌باشد (۴۳). پراکسیداسیون غشاء موجب کاهش عملکرد انتخابی غشاء سلولی در هنگام تبادلات سلولی می شود. پراکسیداسیون لیپیدهای غشائی مهمترین عامل سلولی بازدارندگی رشد گیاهان تحت تنش فلزات سنگین مانند نیکل و آلومینیوم می‌باشد (۵۵ و ۵۹). تحت تنش آلومینیوم، میزان فعالیت آنزیم‌های کاتالاز، آسکوربات پراکسیداز، گایاکول پراکسیداز، پلی فنل اکسیداز و سوپراکسید دیسموتازها در گیاه افزایش می‌یابد (۴۵). دلیل این امر تجمع آلومینیوم در بخش‌های مختلف گیاه بوده که حتی بر سیستم ریشه‌ای گیاه نیز تأثیر دارد و باعث تولید H_2O_2 در سیستم ریشه‌ای تحت تنش آلومینیوم می‌شود (۴۳و ۴۵). فعالیت آنزیم سوپراکسیددسموتاز موجب تبدیل رادیکال‌های آنیون سوپراکسید اکسیژن (O_2^{-}) به H_2O_2 و مولکول اکسیژن می‌گردد و عملکرد آنزیم‌های کاتالاز و پراکسیدازها نیز موجب تجزیه آب اکسیژنه و کاهش اثرات سمی آن می‌گردد. در برخی گیاهان مانند گندم تجمع آب اکسیژنه حاصل از تنش ثانویه اکسیداتیو القا شده توسط سمیت آلومینیوم و نیکل با غلظت ۲۰۰ میکرومولار، موجب کاهش رشد و عملکرد گیاه می‌شود (۲۵و ۶۴). به عبارت دیگر کاهش رشد گندم تحت تنش فلز سنگین بیشتر به دلیل تجمع آب اکسیژنه می‌باشد و برخلاف تصور به دلیل وجود رادیکالهای پرانرژی و پراکسیداسیون غشاء سلولی نمی‌باشد (۱۶). آنزیم گلوتاتیون پراکسیداز (GSH-Peroxidase) نیز واکنش تبدیل هیدروپراکسیدهای آلی مانند هیدروپراکسیدهای حاصل از پراکسیداسیون چربی‌ها و همچنین پراکسیدهیدروژن را به الکل و آب کاتالیز می‌کند (۲۷و ۳۹). آنزیم‌های آسکوربات پراکسیداز و گلوتاتیون ردوکتاز نیز تحت تنش اکسیداتیو القاء شده با فلزات سنگین قرار می‌گیرند. این دو آنزیم مهم سیکل گلوتاتیون که بیشتر در سیتوپلاسم و کلروپلاست قرار دارند جزئی از سیستم جارو کننده رادیکال‌ها می‌باشند. این دو آنزیم موجب کاهش غلظت رادیکال‌ها می‌گردند (۶۲و ۶۵). پراکسیداسیون لیپیدهای غشاء در ریشه گندم در گیاهان تحت تیمار ۲۰ میکرومولار نیکل مشاهده شده است (۶ و ۳۴).

در این پژوهش نیز، تنش آلومینیوم تأثیر خود را بر فعالیت آنزیم‌های پراکسیداز گذاشته و به نظر می‌رسد که تیمار توام اسیدهای آلی و کلسیم در مرحله رویشی گیاهان تحت تنش موجب کاهش چشمگیر فعالیت آنزیم مذکور شده است. اما تیمارهای جداگانه لیگاندها موجب کاهش چندان فعالیت آنزیم تحت تنش نشد، که این موضوع در هر دو رقم کلزا نمایان بود. باید توجه نمود که در اندام هوایی رقم آپشن تحت شرایط تنش و غیرتنش، اسیدهای آلی جداگانه موجب افزایش چند برابری فعالیت آنزیم نسبت به شاهد گردید. در رقم اکاپی هم، تیمارتوام دو لیگاند موجب کاهش معنی‌دار سطح فعالیت ارتقاء یافته این آنزیم نسبت به شرایط تنش در اندام هوایی گردید. در حالیکه تیمار جداگانه لیگاندها موجب کاهش فعالیت گردید (نمودار ۴).

افزایش در فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی در برگ و ریشه تحت تنش آلومینیوم مشاهده شده که منجر به افزایش بیشتر فعالیت آنتی‌اکسیدانی و تخریب کمتر تنش اکسیداتیو حاصل از تنش آلومینیوم می‌شود. ولی بااین‌وجود در غلظت‌های بالای آلومینیوم (۸۰ تا ۱۵۰ میکرومولار) پراکسیداسیون لیپید و آسیب به غشاء رخ داده است (۵۶و ۵۷). گزارش شده است که، تنش ۱۰ میکرومولار نیکل موجب کاهش معنی‌داری در رشد ریشه (رشد طولی و

وزن‌تر) نخودفرنگی ۹ روزه می‌شود (۲۶و ۳۲). مشاهده شده است که در ریشه با افزایش مقادیر نیکل، فعالیت آسکوربات پراکسیداز کاهش می‌یابد. در گیاهان حساس به نیکل، کاهش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی ریشه بیشتر رخ می‌دهد، که می‌تواند به‌دلیل تأثیر مستقیم غلظتهای سمی یون نیکل بر ریشه باشد و در نتیجه ممکن است موجب بازدارندگی جذب عناصر تغذیه‌ای نیز می‌شود (۱۹و ۲۸).

کلسیم با تأثیر بر همبستگی غشاء سلولی موجب مقاومت گیاهان به سمیت آلومینیوم و جلوگیری از ورود آن می‌گردد. کلسیم اساساً آنزیم‌های متصل شده به غشاء را فعال می‌کند. به طوریکه این فعالیت، توسط ساختمان غشاء تنظیم می‌شود. همچنین کلسیم از فعالیت بعضی آنزیم‌های سیتوپلاسمی جلوگیری می‌کند (۱۵و ۴۶). شواهد نشان می‌دهد که پروتئین کالمودونین نقش اساسی در تنظیم کلسیم داخل سلولی و آنزیم‌ها در گیاهان دارد (۳۴). کالمودونین در سلول‌ها قادر است که آنزیم‌هایی مانند فسفولیپاز را فعال کند. همچنین این نکته پذیرفته شده است که کالمودونین در انتقال کلسیم به واکوئل‌ها نقش اساسی دارد (۲۳و ۴۹).

اگر کلسیم را از غشاء توسط مواد شلات کننده مانند (EGTA) خارج شود، نفوذ پذیری غشاء به مواد آلی (مخصوصاً ترکیبات با وزن مولکولی کم مانند پرولین) و معدنی افزایش می‌یابد و در نهایت آسیب‌های زیادی به سلول وارد می‌شود (۳۵). کمبود کلسیم آشکارا به نفوذپذیری غشاء لطمه می‌زند و بدین ترتیب غشاء نمی‌تواند مواد را در داخل خود حفظ کند. با پیشرفت شدت کمبود یون Ca^{2+}، ساختمان کلی غشاء تجزیه می‌شود (۳۴و ۳۵). کلسیم از طریق اثرمتقابل با فسفات‌ها، گروه‌های کربوکسیل فسفولیپیدها و پروتئین‌ها موجود در غشاء، باعث پایداری غشاء می‌شود (۳۵ و ۵۴). در دیواره سلولی پکتین توسط آنزیم پلی گالاکتروناز شکسته می‌شود. کلسیم از فعالیت این آنزیم به‌شدت جلوگیری کرده و مانع از تجزیه پکتین می‌شود. در فقدان کلسیم فعالیت این آنزیم افزایش‌یافته و موجب تخریب دیواره سلولی می‌شود، که نتیجه آن نرم شدن بافت گیاهی است. وجود کلسیم طبق همین مکانیسم، گیاه را به سمیت فلزاتی همچون آلومینیوم و حملات قارچ‌ها (ورود ریسه قارچ به داخل سلول گیاهی) مقاوم می‌کند (۴۱و ۶۴). نتایج این پژوهش نیز در زمینه تجمع کلسیم اندام هوایی تحت تیمارهای تنش و لیگاندها، با این موضوع تطبیق دارد (نمودار ۴)

نتیجه‌گیری کلی: باتوجه به نتایج این پژوهش، دو رقم کلزای مورد استفاده تحت تأثیر معنی‌دار تیمارهای قرارگرفته و در بسیاری از پارامترهای رشد و اکسیداتیو مانند پراکسیداسیون لیپیدهای غشایی به‌ویژه در رقم اکاپی پاسخ چشمگیرتری نسبت به رقم آپشن از خود نشان داد. کاربرد توام کلسیم و محلول اسیدهای آلی کاملاً بر کاهش اثرات تنش‌زای سمیت آلومینیوم در هر دو رقم به ویژه رقم اکاپی ازلحاظ تخفیف تنش اکسیداتیو تأثیرگذار بود. در حالیکه پاسخ جداگانه دو رقم کلزا به این دو الیسیتور معدنی و آلی چندان چشمگیر نبود، هرچند ازنظر آماری در سطح ۵ درصد معنی‌دار بود. بنابراین پیشنهاد می‌گردد بررسی سایر ارقام کلزا یا سایر گیاهان زراعی دراین تحقیق می‌تواند به کاربرد لیگاندهای مرتبط کمک کند. همچنین این نوع تحقیقات در سطح وسیع مزرعه یا مناطق آلوده صنعتی حتی به‌صورت محلول‌پاشی جهت کاربرد صنعتی و کشاورزی اجرا شود. باتوجه به نتایج این تحقیق، فعالیت ژنی و محصولات ژنها را در گیاهان زراعی مانند کلزا و گوجه‌فرنگی مورد پژوهش قرارداد و یا کودهای جدید جهت این امر طراحی نمود.

سپاسگزاری

این مقاله بخشی از یک طرح پژوهشی با شماره قرارداد ۷/۴۹۲۶ مربوط به پژوهشگاه علوم و تکنولوژی‌پیشرفته و علوم محیطی، دانشگاه تحصیلات تکمیلی‌صنعتی و فناوری

پیشرفته کرمان می‌باشد. نویسندگان مقاله مراتب تشکر و قدردانی خود را از مسئولین پژوهشگاه و دانشگاه اعلام می‌دارند.

ضمیمه

جدول ۶- ترکیب شیمیایی محلول هوگلند که جهت کشت هیدروپونیک ارقام کلزا و ساخت تیمارهای آزمایش در این پژوهش مورد استفاده قرارگرفت. این محلول غذایی با استفاده از آب مقطر دیونایز تهیه گردید.

KNO_3	$Ca(NO_3)_2$	$MgSO_4$	KH_2PO_4	Fe-EDTA	H_3BO_3	$MnCl_2$	$ZnSO_4$	Na_2MoO_4	$CuSO_4$
0.5 mM	0.4 mM	0.2 mM	0.1 mM	10 µM	10 µM	2 µM	2 µM	0.1 µM	0.2 µM

منابع

۱. ارمنگل، کنراد و کرکبی، ارنست. ۱۳۷۲. اصول تغذیه گیاه. ترجمه علی اکبر سالار دینی و مسعود مجتهدی. صفحه ۱۰۹.

۲. تایز و زایگر. فیزیولوژی گیاهی. محمد کافی و اسکندر زند. ۱۳۷۹. انتشارات جهاد دانشگاهی مشهد.جلد ۲: صفحه ۱۱۹.

۳. حسن زاد، شهناز؛ روناک دقیق (مترجم). ۱۳۷۸. منابع آلودگی خاک، نشریه: استاندارد، صفحه ۱۶۳.

۴. خاکساریان، فرهاد. ۱۳۸۰. آلودگی خاک ها واثرات زیست محیطی مصرف بی رویه کودهای شیمیایی،نشریه: دهاتی، صفحه ۱۸.

۵. کردوانی؛ پرویز.۱۳۷۶.حفاظت خاک، انتشارات دانشگاه تهران؛ صفحات (۱۷۸-۱۷۷) و(۱۸۰-۱۷۹) و(۱۹۱-۱۸۹) و (۱۹۶-۱۹۴) .

۶. مظفری، حسین. ۱۳۸۳. اثر کلسیم در مقاومت گیاه *Descurainia Sophia* به تنش شوری. پایان نامه کارشناسی ارشد، دانشگاه شهید باهنر کرمان.

7. Altmann, P., Cunningham, J., Dhanasha, U., Ballard, M. & Thompson, J. 1999. Disturbance of cerebral function in people exposed to drinking water contaminated with aluminium sulphate: retrospective study of the Camelford water incidence. *Brit. Me. J.,* 319, PP: 807-811.

8. Ana Luisa, G. 2016. Aluminium Stress in Crop Plants. In book: Recent Advances in Plant Stress Physiology, Edition: 1, Chapter: 12, Publisher: DAYA Publishing House, New Dehi, Editors: P. Yadav, S. Kumar, V. Jain, PP:237-263

9. Andersen, M.K., Raulund-Rasmussen K., Strobel B.W. and H.C.B. Hansen. 2002. Heavy metal distribution and fractionation in pairs SAS Institute. *J. Soil Sci.,* 53(3), PP: 491–502.

10. Andersen, M.K., Refsgaard, A., Raulund-Rasmussen, K., Strobel, B. W., and Hansen, H. C. B. 2002. Content, Distribution, and Solubility of Cadmium in Arable and Forest Soils. *Soil Sci Soc. Americ.,* 66, PP:1829–1835.

11. Aniol, A.1990. Genetics of tolerance to aluminum in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Soil.,* 123: 223–227.

12. Basu, U., Godbold, D., Taylor, G J .1994. Aluminum resistance in *Triticum aestivum* associated with enhanced exudation of malate. *J. Plant Physiol.*, 144, PP: 747–753.

13. Bergkvist, B. 1987. Soil solution chemistry and metal budgets of spruce forest ecosystems in S. Sweden. *Water Air Soil Pollut.*, 33, PP:131–154.

14. Bertsch, P.M. & Bloom, P.R. 1996. Methods of soil analysis: Part3 Chemical ethods. ASA and SSSA, Madison, WI. Book series., 5, PP: 517-550.

15. Bose, J., Babourina, O. and Rengel, Z. 2011. Role of magnesium in alleviation of aluminium toxicity in plant. *J. Exp. Bot.,* 62, PP: 2251-2264.

16. Bowler, C., & Fluhr, R. The role of calcium and activated oxygens as signals for controlling cross-tolerance. *Trends. plant sci.,* 5(6):1360 - 1385. 2000.

17. Bray, R. H. 1934. A chemical study of soil development in the Peorian loess region of Illinois. *Am. Soil Survey. Assoc. Bull.,* 15, PP:58-60.

18. Castilhos, G., Farias, J.G., Schneider, A.B., Oliveira, P.H., Nicoloso, F.T., Schetinger, M.R.C. and Delatorre, C.A., 2011. Aluminum-stress response in oat genotypes with monogenic tolerance. *Environ. Experim Bot.*, 74: 114-121.

19. Chen, Q., Wu, K.H., Wang, P., Yi, J., Li, K.Z., Yu, Y.X. and Chen, L.M. 2013. Overexpression of *MsALMT1*, from the aluminum-sensitive *Medicago sativa*, enhances malate exudation and aluminum resistance in tobacco. *Plant Mol Bio.,* 31, PP:769-774.

20. Chen, Z.C., Yamaji, N., Motoyama, R., Nagamura, Y. and Ma, J.F., 2012. Upregulation of a magnesium transporter gene *OSMGT1* is required for conferring aluminum tolerance in rice. *Plant Physiol.,* 159, PP: 1624-1633.

21. Chlopecka, A., Bacon J.R., Wilson M.J. and J. Kay. 1996. Forms of cadmium, lead, and zinc in contaminated soils from southwest Poland. *J. Environ. qual*., 25, PP: 69–79.

22. Christensen, T.H. 1989. Cadmium soil sorption at low concentrations: VIII. Correlation with soil parameters. *Water Air Soil Pollut.,* 44, PP: 71–82.

23. Conyers, M., Moroni S. and Wratten N. 2002. Resistance of rapeseed (*Brassica napus* L.) to aluminium apparent in nutrient solution but not in soil. Proceedings of the Australian Agronomy Conference, *Aus. Soc Agro*., 2, PP: 13-16.

24. Cram, A.G. and Whelan, V.P.H. 1986. Lead Dust inside Air-Conditioned Buildings. *Environ. Health*., 94(11), PP: 293-294.

25. Curtis Wayne, R., Ping, W. & Arthure, H. 1995. Role of calcium and differentation in enhanced sesquiterpene elicitation from calcium alginate-immobilized plant tissue. *Enz. Microb. tech*., 17: 554-557.

26. Das, P., Samantaray S. and Rout G.R. 1997. Studies on cadmium toxicity in plants. *Environ Pollut.,* 98, PP: 29-36.

27. de la Fuente, J.M, Ramirez-Rodriguez, V., Cabrera-Ponce J.L., Herrera-Estrella, L. 1997. Aluminum tolerance in transgenic plants by alteration of citrate synthesis. *Science*., 276, PP: 1566–1568.

28. Degenhardt J, Larsen PB, Howell SH, Kochian LV .1998. Aluminum resistance in the Arabidopsis mutant *alr*-104 is caused by an aluminum-induced increase in rhizosphere pH. *Plant Physio.,* 117, PP: 19-27.

29. Delhaize E., Ryan P. R. 1995. Update on environmental stress: aluminum toxicity and tolerance in plants. *Plant Physiol.,* 107, PP: 315–321.

30. Delhaize, E., James R. A., Ryan P. R., 2012 . Aluminium tolerance of root hairs underlies genotypic differences in rhizosheath size of wheat (*Triticum aestivum*) grown on acid soil, *New Phytol,* 195 (3), PP: 609-616.

31. Delhaize, E., Craig, S., Beaton, C. D., Bennet, R. J, Jagadish, V., Randall, P. J .1993a. Aluminum tolerance inwheat (*Triticum aestivum* L.). Uptake and distribution of aluminum in root apices. *Plant Physiol.,* 103, PP: 685-693.

32. Delhaize, E., Ryan, P.R., Hebb, D.M., Yamamoto, Y., Sasaki, T. and Matsumoto, H., 2004. Engineering high-level aluminum tolerance in barley with the *ALMT1* gene. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 101, PP: 15249-15254.

33. Delhaize, E., Taylor, P., Hocking, P.J., Simpson, R.J., Ryan, P.R. and Richardson, A.E., 2009. Transgenic barley (*Hordeum vulgare* L.) expressing the wheat aluminiumresistance gene (*TaALMT1*) shows enhanced phosphorus nutrition and grain production when grown on an acid soil. *Plant Biotechnol. J.*, 7, PP: 391-400.

34. Delhaize, E., Zhou, M. and Ryan, P.R., 2013. The barley MATE gene, HvAACT1, increases citrate efflux and Al3+ tolerance when expressed in wheat and barley. *Ann. Bot.,* 112(3), PP: 603-612.

35. Dobermann, A. & Fairhurst, T. 2000. Aluminum Toxicity. Nutrient disorders & nutrient management. Handbook series. Potash & Phosphate Institute (PPI), Potash & Phosphate Institute of Canada (PPIC) and International Rice Research Institute (IRRI). P:191.

36. Donald, J.M., Golub, M.S., Gershwin, M.E. &Keen, C. L. 1989. Neurobehavioral effects in offspring of mcie given excess aluminum in diet during gestation and lactation. *Neurotoxicol. Teratol.,* 11(4), PP: 345-351.

37. Driscoll, W. R., Cummings, J. J. & Zorn, W. (1997). Aluminum toxicity in preterm infants. *N. Eng. J. Med.,* 337(15): 1090-1091.

38. Egli, M., Fitze P. and Oswald M. 1999. Changes in heavy metal contents in an acidic forest soil affected by depletion of soil organic matter within the time span 1969–93. *Environ Pollut.,* 105, PP:367–379.

39. Gallardo, M., Carmen Gomez-Jimenez, M. del & Matilla, A. Involvment of calcium in ACC-oxidase activity from *Cicer arietinum* seed embryo nic axes. *Phytochemistery*. 50: 373-376. 1998.

40. Garcia-Oliveira, A.L., Benito, C., Prieto, P., Menezes, R.A., Rodrigues-Pousada, C., Guedes-Pinto, H. and Martins-Lopes, P., 2013. Molecular characterization of *TaSTOP1* homoeologues and their response to aluminium and proton (H+) toxicity in bread wheat (*Triticum aestivum* L.). *BMC Plant Biol*., 13, PP: 134.

41. Garcia-Oliveira, A.L., Martins-Lopes, P., Tolrá, R., Poschenrieder, C., Tarquis, M., Guedes-Pinto, H. and Benito, C., 2014. Molecular characterization of the citrate transporter gene *TaMATE1* and expression analysis of upstream genes involved in organic acid transport under Al stress in bread wheat (*Triticum aestivum* L.). *Physiol. Plant.*, 152(3), PP:441-452.

42. Gennady, E. & Kelvin J. A. 2000. Calcium and oxidative stress: from cell signaling to cell death. *Molecular Immunology*., 38, PP: 713-721.

43. Goh, C. & Lee, Y. 1999. Aluminum uptake and aluminum-induced rapid root growth inhibition of rice seedlings. *J. Plant Biol.,* 42(2), **PP**: 151-158.

44. Gruber, B.D., Delhaize, E., Richardson, A.E., Roessner, U., James, R.A., Howitt, S.M. and Ryan, P.R., 2011. Characterisation of *HvALMT1* function in transgenic barley plants. *Func. Plant Biol.*, 38, PP: 163-175.

45. Guo, T. , Zhang G., Zhou, M., Wu, F. & Chen J. 2004. Effects of aluminum and cadmium toxicity on growth and antioxidant enzyme activities of two barley genotypes with different Al resistance. *Springer Science+Business Media B.V.,* 258(1), PP: 241-248.

46. Holmgren, G. G.S., Meyer M. W., Chaney R. L. and Daniels R. B. 1993. Cadmium, lead, zinc, copper, and nickel in agricultural soils of the United States of America. *J. Environ qual*., 22, PP:335-348.

47. Huang, B., Liu, Y., Xue, X. and Chang, L. 2002. Comparison of aluminium tolerance in the brassicas and related species. *Plant Breed.,* 121, PP: 360-362.

48. Jianwei, W. Huang, jon E. Shaff, david, L. Grunes, and Leon V. Kochian. 1992. Aluminum effects on calcium fluxes at the root apex of aluminum- tolerant and aluminum-sensitive wheat cultivars. *Plant Physiol.,* 98, PP: 230-237.

49. Tolrà, R., Vogel-Mikuš, K., Hajiboland, R., Kump, P., Pongrac, P., Kaulich, B., Gianoncelli, A., Babin, V., Barceló, J., Regvar, M. and Poschenrieder, M., 2011. Localization of aluminium in tea (*Camellia sinensis*) leaves using low energy X-ray fluorescence spectro-microscopy. *J. Plant Res*., 124(1), PP: 165-172.

50. Tolrà, R., Barceló, J. and Poschenrieder, M. 2009. Constitutive and aluminium induced patterns of phenolic compounds in two maize varieties differing in aluminium tolerance. *J. Inorg. Biochem.*, 103(11), PP: 1486-1490.

51. Tovkach, A., Ryan, P.R., Richardson, A.E., Lewis, D.C., Rathjen, T.M., Ramesh, S., Tyerman, S.D. and Delhaize, E., 2013. Transposon-mediated alteration of *TaMATE1B* expression in wheat confers constitutive citrate efflux from root apices. *Plant Physiol.*, 161(2), PP: 880-892.

52. Trejo-Tellez, L.I., Stenzel, R., Gomez-Merino, F.C. and Schmitt, J.M., 2010. Transgenic tobacco plants overexpressing *pyruvate phosphate dikinase* increase exudation of organic acids and decrease accumulation of aluminum in the roots. *Plant Soil*, 326, PP: 187-198.

53. Vitorello, V.A., Capaldi, F.R.C. and Stefanuto, V.A., 2005. Recent advances in aluminum toxicity and resistance in higher plants. *Braz. J. Plant Physiol.*, 17, PP: 129-143.

54. Wang, Y., Xu, H., Kou, J., Shi, L., Zhang, C. and Xu, F., 2013. Dual effects of transgenic *Brassica napus* overexpressing *CS* gene on tolerances to aluminum toxicity and phosphorus deficiency. *Plant Soil*, 362, PP: 231-246.

55. Xia, J., Yamaji, N., Kasai, T. and Ma, J.F., 2010. Plasma membrane-localized transporter for aluminum in rice. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 107, PP: 18381-18385.

56. Yamaji, N., Huang, C.F., Nagao, S., Yano, M., Sato, Y., Nagamura, Y. and Ma, J.F., 2009. A zinc finger transcription factor *ART1* regulates multiple genes implicated in aluminum tolerance in rice. *Plant Cell.*, 21, PP: 3339-3349.

57. Yamamoto, Y., Kobayashi, Y. and Matsumoto, H., 2001. Lipid peroxidation is an early symptom triggered by aluminum, but not the primary cause of elongation inhibition in pea roots. *Plant Physiol.*, 125, PP: 199-208.

58. Yang, H., Knapp, J., Koirala, P., Rajagopal, D., Peer, W.A., Silbart, L.K., Murphy, A. and Gaxiola, R.A., 2007. Enhanced phosphorus nutrition in monocots and dicots over-expressing a phosphorus-responsive type I H+-pyrophosphatase. *Plant Biotechnol. J.*, 5, PP: 735-745.

59. Yokosho, K., Yamaji, N. and Ma, J.F., 2010. Isolation and characterisation of two MATE genes in rye. *Funct. Plant Biol.*, 37, PP: 296-303.

60. Yokosho, K., Yamaji, N. and Ma, J.F., 2011. An Al-inducible MATE gene is involved in external detoxification of Al in rice. *Plant J.*, 68, PP: 1061-1069.

The Study of organic acids and Calcium effect on the improvement of indices of growth and oxidative induction in two cultivars of Canola (*Brassica napus* L.) under Aluminum stress

Mozafari H.,[1] Asrar Z.,[2] Salari H.,[1] Oloomi H.[1] and Moghtader M.[3]

[1] Dept. of Ecology, Institute of Science and High Technology and Environmental Sciences, Graduate University of Advanced Technology, Kerman, I.R. of Iran

[2] Dept. of Biology, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, I.R. of Iran

[3] Dept. of Biodiversity, Institute of Science and High Technology and Environmental Sciences, Graduate University of Advanced Technology, Kerman, I.R. of Iran

Abstract

Aluminum toxicity causes neural, pulmonary and renal diseases in humans and reduces crops yield and growth. The factors causing the environmental toxicity of Aluminum include the increase in the ratio of rainfall to soil evaporation, soils acidification and industrial activities. Canola, the third largest oilseed in the world, has 40% to 45% oil and at least 34% protein, and due to the increase in its crop area in the world, the study of the effect of Aluminum toxicity on its growth and physiology is important. In this research, the reaction of two cultivars of rapeseed (*Brassica napus*), including Ocapi and Option cultivars to 80µm Sulfate Aluminum toxicity, and resistance by ligands containing 1mM of Calcium Chloride and 2mM mixture of three organic acids Citrate, Malate and Oxalate were evaluated in a hydroponic culture medium. The parameters of germination percentage, root organic acid secretion, growth parameters, anti-oxidant and enzyme indices were also measured. The results showed that Calcium ion and organic acids had a significant effect on the reduction of toxic and oxidative Aluminum effects on Canola cultivars. As a result of the addition of Calcium to a nutrient-containing nutrient solution, less organic acids are secreted, indicating a greater correlation between plasma membrane and reduced Aluminum absorption. In this study, the Ocapi variety was more responsive to the alternative than the test ligands for resistance to Aluminum stress, and this can be used to reduce the absorption of toxic metals by plants in contaminated soils and the design of new fertilizers.

Key words: Acidification of soil, Aluminum toxicity, *Brassica napus*, Calcium, Canola.