اثرات برهمکنش مس، آسکوربات و جیبرلین برروی جوانه‌زنی، محتوای یونی، پرولین، قند محلول و نشاسته در دو رقم گیاه کلزا

حسین لاری یزدی[۱]، *مه لقا قربانلی[۲]، میترا روشنی[۱]

۱- گروه زیست‌شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی بروجرد
۲- گروه زیست شناسی،دانشگاه آزاد اسلامی گرگان

چکیده

مس یکی از فلزات سنگین است که اثرات سمی آن در گیاهان گوناگون ازجنبه‌های مختلف فیزیولوژی، بیوشیمی، مولکولی، سلولی، ژنتیکی در حال بررسی است.در این پژوهش اثرسمی مس روی برخی فعالیتهای فیزیولوژیک گیاه *Brassica napus* L. در دو رقم هایولا ٤٠١ و RGS مورد بررسی قرار گرفت.دانه رست های کلزا در محیط کشت هیدروپونیک کشت داده شدند وتحت تیمارهای مختلف مس (۵ و۱۵و۲۵ میکرومولار)، مس به همراه آسکوربات (۰/۵ میلی مولار)، مس به همراه جیبرلین (۰/۰۵ میلی مولار) و مس به همراه آسکوربات وجیبرلین با همان غلظتها، در سه تکرار قرار گرفتند. در هر دو رقم، فاکتورهای درصد جوانه زنی، قند نامحلول، یون پتاسیم در اندام هوایی و ریشه تحت تیمارهای مس کاهش نشان دادند؛ بر عکس، در هر دو رقم افزایش معنی دار مقدار قند محلول و پرولین مشاهده شد.. محاسبات آماری به روش SPSS ویرایش ١٤ انجام شد، یافته ها با P<۰/۰ ۵ معنی دار بودند و نتایج نشان داد که زیادی مس اثر مهار کننده روی رشد و برخی فعالیتهای فیزیولوژیک گیاه دارد

واژه‌های کلیدی: کلزا، مس، جیبرلین، آسکوربات، جوانه‌زنی، محتوای یونی، پرولین، قند محلول و نامحلول

مقدمه

مس یکی از فراوان‌ترین عناصر کم مصرف است. این فلز به طور وسیعی در حالت خالص فلزی و آلیاژی کاربرد دارد. این عنصر برای تقریباً همه ارگانیسم‌ها یک عنصر ضروری کم مصرف است، ولی ممکن است به مقدار زیاد در آب، رسوب و زیواگان[1] یافت شود. بیشترین اثر سمی آن به خاطر تماس با عنصر است. همه ارگانیسم‌ها با مقدار زیاد آن آسیب می‌بینند مقدار چند ppm از آن تعداد زیادی از ماهی‌ها را از بین می‌برند (Lopes and Lee, 1997) و در حیوانات پیشرفته‌تر تخریب مغز یک مشخصه اثر مس است. مقادیر

[1]- Biota

*e.mail:ghorbanli@yahoo.com

زیاد مس در بیماران دارای سرطان ریه دیده شده است و ورود مس از طریق غیرطبیعی به اکوسیستم به وسیله صنایع منسوجات، وسایل آرایشی و غیره صورت می‌گیرد. (Satake and Mido, 1997).

عناصر سنگین می‌توانند با رقابت با سایر عناصر مورد نیاز گیاه در جذب آنها و تغذیه معدنی گیاه ایجاد اختلال نمایند. (Stearn *et al.*, 2005) و از طرف دیگر فلزات جذب شده با اتصال به بخش‌های حساس مولکول‌های زیستی و با مهار آنها متابولیسم طبیعی سلول را مختل می‌سازند. (Pandey and Sharma, 2002)

قرار گرفتن در معرض مس زیاد محیط، غلظت مس در گیاه*Brassica pekinensis Rupr* را افزایش داده و به تبع آن فعالیت نیتریت ردوکتاز در ریشه و ساقه کاهش می‌یابد و محتوای کلی کلروفیل و همچنین طول ریشه و برگ‌ها و توده‌ی زنده گیاهی کاهش می‌یابند (Chao Liu *et al*. 2006).

اعمال آثار سمی غلظت‌های بالای مس تا حدودی از طریق اثر بر متابولیسم نیتروژن است (Xiong *et al.* 2006). در گیاهان *Mentha longifolia* L. و *Cimum basilicum* مس با غلظت بالا طول گیاه و محصول آن را کاهش می دهد، منجر به نشانه‌های مسمومیت گیاه می شود و تأخیر رشدی ایجاد می نماید. (Craket *et al.*, 2006).

آسکوربات که در غلظت‌های میلی‌مولار در برگها یافته می‌شود نقش مهمی در تحمل گیاه به استرس‌ها بازی می‌کند؛ که این نقش را در قالب جزئی از سیستم آنتی اکسیدان ایفا می‌نماید. این فاکتور در تنظیم فتوسنتز، توسعه رشد سلولی، دراز شدن ریشه و انتقال ورای غشایی الکترون نقش دارد. پژوهشهای اخیر نشان داده‌اند که محتوای آسکوربات گیاه بروز ژنهای دفاعی گیاه را تنظیم می‌نماید. (Guo *et al.*, 2005).

هورمون جیبرلین با تحریک تقسیم سلولی و یا طویل شدن سلولها یا هر دو مکانسیم با هم موجب رشد بویژه در اندام‌های هوایی گیاهان مختلف می‌شوند (قربانلی، ۱۳۸۳).کلزا (کانولای یک ساله) متعلق به خانواده Cruciferae با نام علمی *Brassica napus* L. یکی از مهمترین دانه‌های روغنی مورد مصرف در جهان است و به دلیل داشتن خاصیت غذایی مناسب (داشتن کمترین میزان اسیدهای چرب اشباع)، این فرآوردهٔ کشاورزی در اکثر کشورهای جهان مورد توجه قرار گرفته است؛ از اینرو کارشناسان درصددند از یک طرف راههایی را در جهت تقلیل جذب فلزات سنگین از جمله مس توسط ریشه گیاهان زراعی بیابند، زیرا عناصر فلزی سنگین می‌توانند وارد زنجیره غذایی انسان شوند و از طرف دیگر گیاهانی را شناسایی کنند که جذب زیاد فلزات سنگین را انجام داده و نسبت به آن مقاومند و می‌توانند موجب تصفیه آبها و خاکها شوند.

هدف از انجام این پژوهش از یک طرف تعیین اختلاف در پاسخ این گیاه به افزایش مس در مرحله جوانه‌زنی و رشد و از طرف دیگر بررسی برخی خصوصیات فیزیولوژیکی دخیل در مقاومت به تنش این گیاه از جمله، کاهش یونهای Na^+ و K^+، غلظت پرولین، قندهای محلول و نشاسته در سطوح مختلف افزایش مس می‌باشد و یافتن پاسخ این سؤال که آیا کاربرد همزمان آسکوربات با جیبرلین می‌تواند اثرات مثبتی در رفع بازدارندگی رشد و متابولیسم برای گیاه داشته باشد؟

در نهایت استفاده از این ویژگی‌ها و مکانیسم‌های مقاومتی در اصلاح و به نژادی که نیاز مبرم کشاورزی پیشرفته است به پژوهش ما جنبه کاربردی داده و از طرفی معرفی ارقام مقاوم‌تر کلزا نسبت به تنش مس اهمیت اقتصادی فراوانی دارد.

مواد و روشها

برای بررسی اثرات برهم کنش مس، آسکوربات و جیبرلین روی جوانه‌زنی، دانه‌ها در پتری دیشهای ۸ سانتی-

متری در تاریکی و در دمای ۲۰ درجه سانتیگراد قرار داده شدند، آزمایشات اولیه آشکار نموده بود که این شرایط برای جوانه‌زنی این گیاه مناسب می‌باشد (Yang *et al*., 1996).

سه تکرار (سه پتری دیش) ۲۵ دانه‌ای برای هر پنج گروه تیمار:

۱- سولفات مس با غلظت ۵ میکرومولار، ۲- سولفات مس با غلظت ۵ میکرومولار و جیبرلین با غلظت ۰/۰۵ میلی مولار، ۳- سولفات مس با غلظت فوق و آسکوربات با غلظت ۰/۵ میلی مولار، ٤- سولفات مس با غلظت فوق و جیبرلین با غلظت ۰/۰۵ میلی‌مولار و آسکوربات با غلظت ۰/۵ میلی‌مولار به صورت توأم و ۵- تیمارهای ۱ تا ٤ با غلظتهای سولفات مس ۱۵ میکرومولار و ۲۵ میکرومولار به کاربرده شد و به هر پتری دیش ۵ میلی لیتر از محلولهای مورد نظر افزوده شد.

مطالعات جوانه‌زنی ۷ روز دنبال شد و تعداد دانه‌های جوانه زده به صورت روزانه یادداشت شد. اساس جوانه‌زنی خروج ریشه اولیه از بذرها بود.

برای بررسی اثرات برهم کنش مس، آسکوربات و جیبرلین برروی دانه‌رست‌های این گیاه؛ پس از تهیه بذر از جهاد کشاورزی استان لرستان به کشت آنها اقدام شد. به این منظور به هر رقم کلزا (هایولا ٤۰۱ و RGS)، ۲ سبد با منافذ تقریبی ۲×٤ mm اختصاص داده شد و تا زمان رسیدن به مرحله دو برگی از ظروف حاوی آب مصرفی به عنوان محلول غذایی استفاده شد. سبدهای حاوی بذرهای کشت شده در شرایط آزمایشگاه به مدت ۲٤ ساعت در تاریکی قرار داده شدند و بعد از اتمام این مدت زمان به روشنایی منتقل گردیدند و هر روز با تعویض آب، آبیاری آنها هم صورت گرفت. بعد از گذشت یک هفته گیاهان یکنواخت از نظر اندازه انتخاب شدند و از سبدها بعد از شستشوی ریشه آنها با آب مقطر به ظروف تیره (٦۵۰ میلی لیتر) حاوی محلول هوگلندنیم قدرت (محیط هیدروپونیک) انتقال یافتند. بعد از مدت زمان ۲٤ ساعت، تحت تیمارهای:

۱- سولفات مس با غلظت ۵ میکرومولار
۲- سولفات مس با غلظت ۵ میکرومولار و جیبرلین با غلظت ۰/۰۵ میلی‌مولار
۳- سولفات مس با غلظت فوق و آسکوربات با غلظت ۰/۵ میلی‌مولار
٤- سولفات مس با غلظت فوق و جیبرلین با غلظت ۰/۰۵ میلی‌مولار و آسکوربات با غلظت ۰/۵ میلی‌مولار به صورت توأم
۵- تیمارهای ۱ تا ٤ با غلظتهای سولفات مس ۱۵ میکرومولار و ۲۵ میکرومولار و ۲۵ میکرومولار قرار گرفتند.

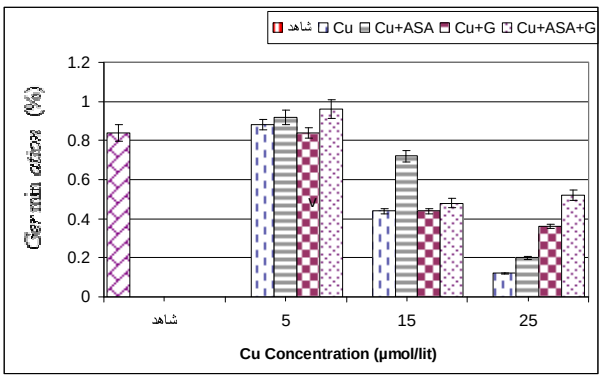
برای جلوگیری از خفگی ریشه‌ها و رساندن اکسیژن کافی برای رشد ریشه‌ها، هر روز به مدت ۲ ساعت از طریق پمپ هوا، محیط هیدروپونیک حامل گیاهان مورد مطالعه، هوادهی می‌شدند. گیاهان برای مدت ۲۰ روز در اتاقی با شرایط نوری مناسب و در دما و رطوبت آزمایشگاه رشد کردند.

طول دوره روشنایی و تاریکی به ترتیب ۱٦ و ۸ ساعت بود و pH در تمام محلول‌های غذایی تهیه شده در حدود ٦/۵ تنظیم گردید، برای تمامی تیمارها سه تکرار در نظر گرفته شد.

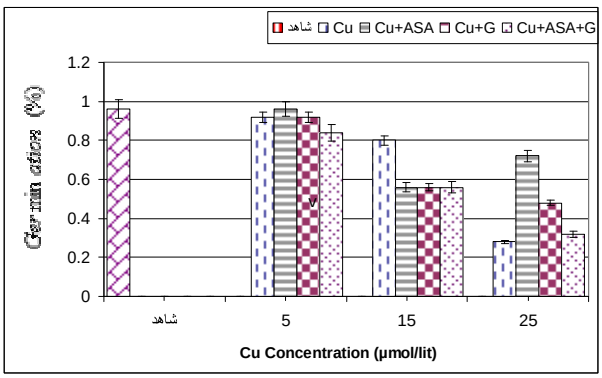
بعد از ۲۰ روز برگ و ریشه گیاهان جدا شده و به مدت ٤۸ ساعت در دمای ۷۰ درجه سانتیگراد در آون خشک گردید سپس محتوای پرولین با استفاده از روش Bates *et al* (1973)، محتوای قندهای محلول و نشاسته از روش فنل اسید سولفوریک Kochert (1973) ومحتوای یون K^+ در دو بخش هوایی و زیرزمینی مورد بررسی قرار گرفت. در هر کدام از موارد ذکر شده ابتدا یک منحنی استاندارد تهیه کرده و سپس با قرار دادن جذب خوانده شده و معلوم در معادله ؛میزان تغییرات مد نظر مشخص گردید. نتایج بدست آمده با استفاده از نرم افزار spss، آزمون دانکن و آنالیز واریانس تجزیه و تحلیل شد.

نتایج

آنالیز واریانس نتایج به دست آمده از این پژوهش نشان داد که جوانه‌زنی دانه‌های *Brassica napus* به صورت معنی-داری با افزایش غلظت سولفات مس بازداشته می‌شود. در حالیکه در تیمار مس به همراه جیبرلین نیز وضعیت به همین ترتیب است؛ در تیمار مس به همراه آسکوربات نسبت به تیمارهای مس جوانه‌زنی افزایش پیدا می‌کند؛ در تیمار مس به همراه جیبرلین و آسکوربات نیز جوانه‌زنی نسبت به شاهد کاهش نشان داد. اثر سوء استرس مس بر جوانه‌زنی رقم RGS نسبت به هایولا ٤٠١ چشمگیرتر می‌باشد. (شکلهای ١ و٢).

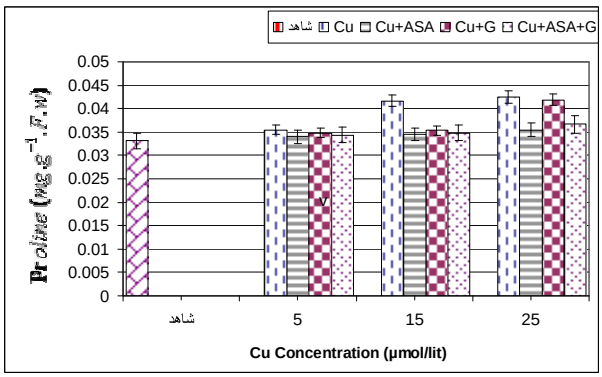


شکل ١: اثرات بر هم کنش مس، آسکوربات و جیبرلین بر میزان درصد جوانه زنی بذرهای گیاه کلزا، رقم هایولا ٤٠١

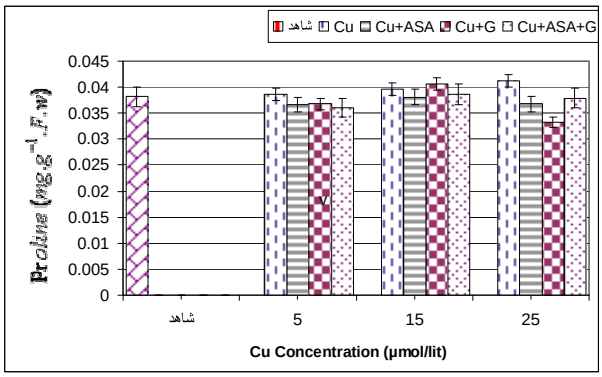


شکل ٢: اثرات بر هم کنش مس، آسکوربات و جیبرلین بر میزان درصد جوانه زنی بذرهای گیاه کلزا، رقم RGS

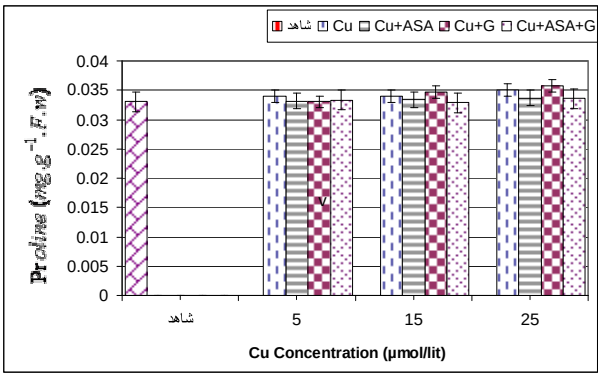
همزمان با افزایش غلظت سولفات مس، افزایش معنی‌داری در میزان پرولین برگ و ریشه هر دو رقم هایولا ٤٠١ و RGS دیده شد. ($P < ٠/٠٥$) البته این افزایش در ریشه نسبت به برگ چشمگیرتر بود و در رقم هایولا ٤٠١ نیز نسبت به RGS بیشتر بود. تحت تیمارهای سولفات مس به همراه آسکوربات میزان پرولین در برگ و ریشه هر دو رقم نسبت به تیمارهای مس کاهش یافت. با تیمارهای سولفات مس به همراه جیبرلین دوباره میزان پرولین افزایش یافت ($P<٠/٠٥$)؛ در تیمارهای سولفات مس به صورت توأم با آسکوربات و جیبرلین نیز در برگ و ریشه افزایش پرولین دیده می‌شود البته نه به اندازه تیمار قبلی (شکل‌های ٣ الی ٦).



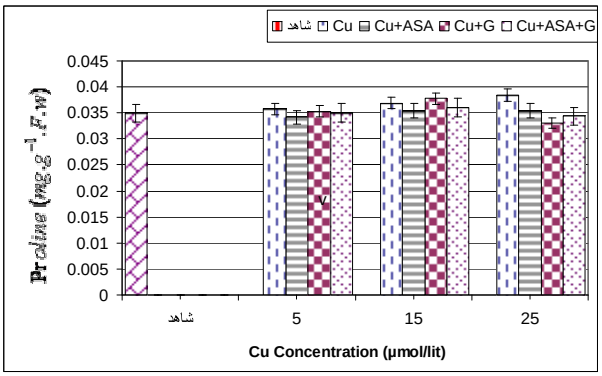
شکل ٣: اثرات بر هم کنش مس، آسکوربات و جیبرلین بر میانگین مقدار پرولین در برگ، رقم هایولا ٤٠١



شکل ٤: اثرات بر هم کنش مس، آسکوربات و جیبرلین بر میانگین مقدار پرولین در برگ، رقم RGS

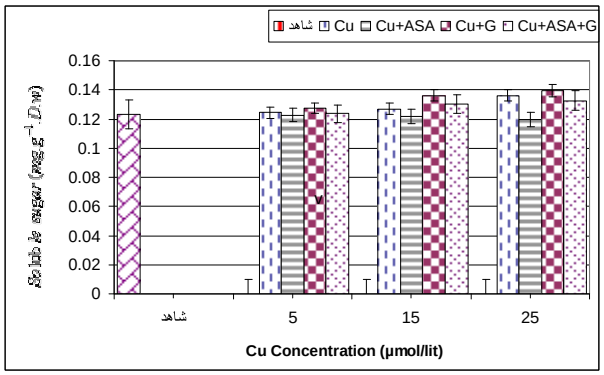


شکل ۵: اثرات بر هم کنش مس، آسکوربات و جیبرلین بر میانگین مقدار پرولین در ریشه، رقم هایولا ۴۰۱

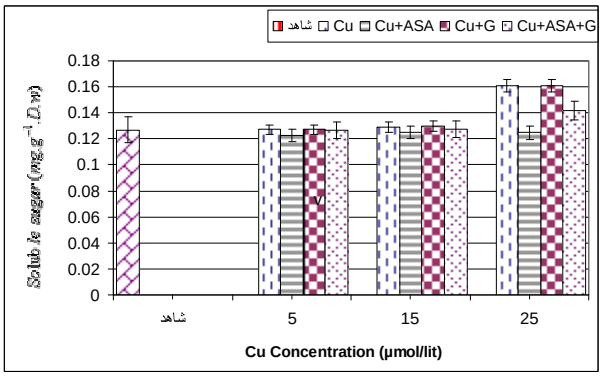


شکل ٦: اثرات بر هم کنش مس، آسکوربات و جیبرلین بر میانگین مقدار پرولین در ریشه، رقم RGS

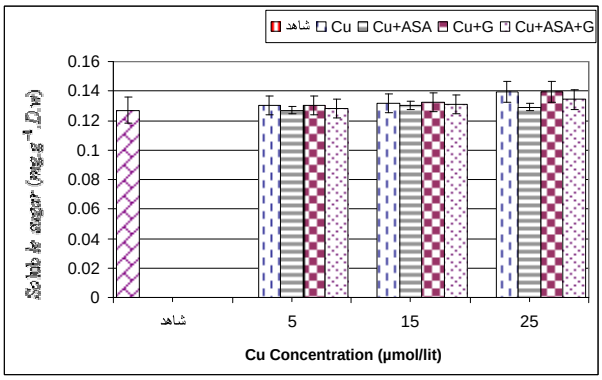
قندهای محلول در برگ و ریشه هر دو رقم با افزایش غلظت سولفات مس در محیط غذایی هوگلند افزایش یافت. ($P < ۰/۰۵$) این افزایش در ریشه و در رقم هایولا ۴۰۱ بیشتر بود. تحت تیمارهای سولفات مس به همراه آسکوربات میزان قند محلول نیز نسبت به شاهد افزایش معنی‌دار نشان داد ؛ البته این افزایش نسبت به تیمارهای مس خفیف تر بود. با تیمارهای سولفات مس به همراه جیبرلین میزان قند افزایش می‌یافت ($P < ۰/۰۵$)؛ در تیمارهای سولفات مس توأم با آسکوربات و جیبرلین افزایش قند محلول در ریشه و برگ دیده می‌شد البته باز تیمار قبلی نمی‌رسید. (شکل‌های ۷ الی ۱۰)



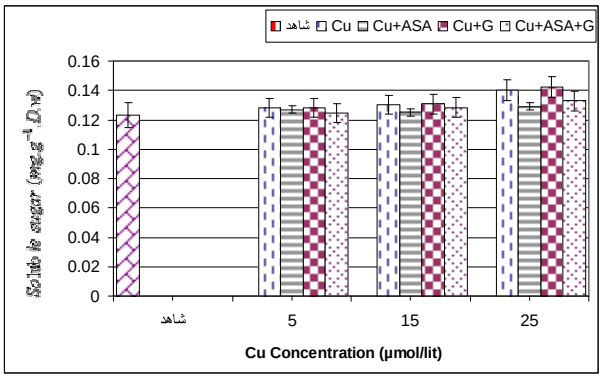
شکل ۷: اثرات برهم کنش مس، آسکوربات و جیبرلین بر میانگین مقدار قندهای محلول در برگ، رقم هایولا۴۰۱



شکل ۸: اثرات برهم کنش مس، آسکوربات و جیبرلین بر میانگین مقدار قندهای محلول در برگ، رقم RGS

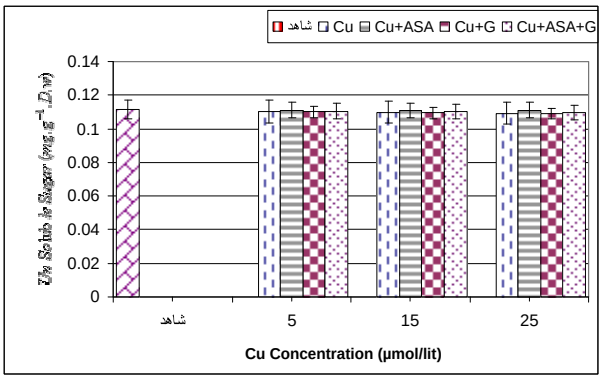


شکل ۹: اثرات برهم کنش مس، آسکوربات و جیبرلین بر میانگین مقدار قندهای محلول در ریشه، رقم هایولا۴۰۱

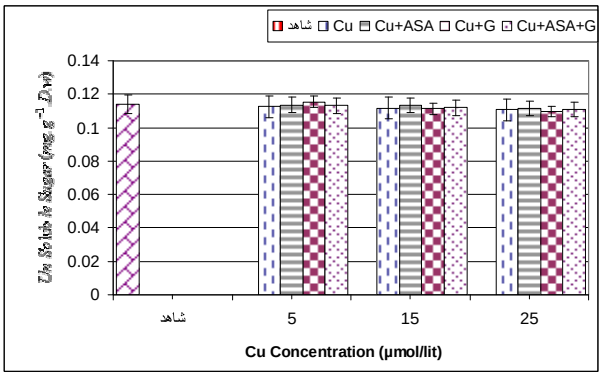


شکل ۱۰: اثرات برهم کنش مس، آسکوربات و جیبرلین بر میانگین مقدار قندهای محلول در ریشه، رقم RGS

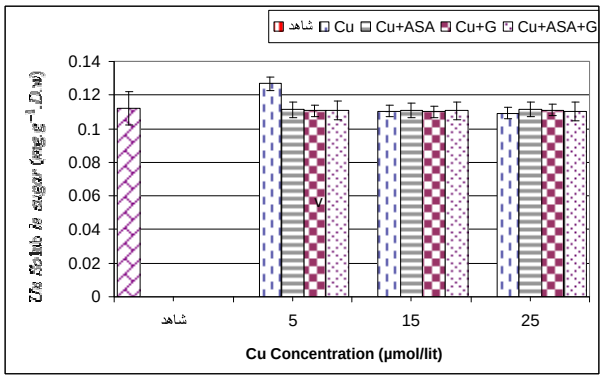
قندهای نامحلول (نشاسته) تحت تیمارهای فوق‌الذکر به صورت عکس کاهش و افزایش پیدا می‌کنند که البته کاهش میزان نشاسته در RGS نسبت به هایولا ۴۰۱ بیشتر بود. (شکلهای ۱۱ الی ۱۴).



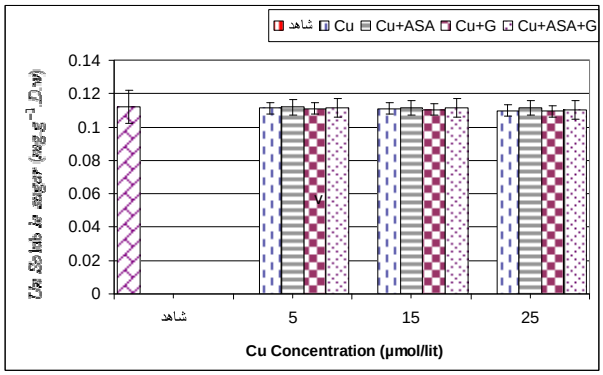
شکل ۱۱: اثرات برهم کنش مس، آسکوربات و جیبرلین بر میانگین مقدار قندهای نامحلول در برگ، رقم هایولا۴۰۱



شکل ۱۲: اثرات برهم کنش مس، آسکوربات و جیبرلین بر میانگین مقدار قندهای نامحلول در برگ، رقم RGS

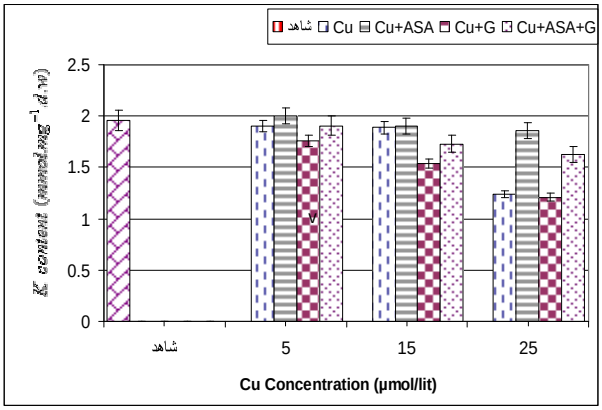


شکل ۱۳: اثرات برهم کنش مس، آسکوربات و جیبرلین بر میانگین مقدار قندهای نامحلول در ریشه، رقم RGS

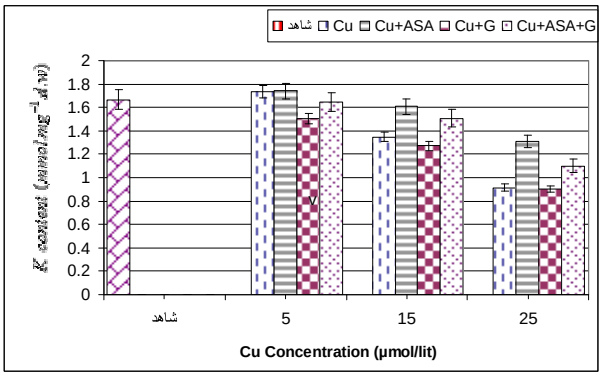


شکل ۱۴: اثرات برهم کنش مس، آسکوربات و جیبرلین بر میانگین مقدار قندهای نامحلول در ریشه، رقم هایولا۴۰۱

نتایج این بررسی‌ها آشکار کرد که افزایش غلظت سولفات مس به صورت معنی‌داری محتوای Na^+ و K^+ در بخش هوایی و ریشه در غلظتهای مختلف مس در مقایسه با شاهد کاهش یافت که این کاهش در هر دو رقم در ریشه در مقایسه با ساقه بیشتر بود. این کاهش بر اثر تیمار همراه با آسکوربات تعدیل می‌شود ولی تحت تیمار مس به همراه جیبرلین و نیز تیمار آسکوربات توأم با جیبرلین دوباره در هر دو رقم و در بخش هوایی و زیرزمینی کاهش دیده می‌شود. (شکل ۱۵ و ۱۶)



شکل ۱۵: اثرات بر هم کنش مس، آسکوربات و جیبرلین بر میانگین مقدار یون پتاسیم در ریشه، رقم هایولا ۴۰۱



شکل ۱۶: اثرات بر هم کنش مس، آسکوربات و جیبرلین بر میانگین مقدار یون پتاسیم در ریشه، رقم RGS

بحث

نتایج بدست آمده از این تحقیق نشان دهنده اثرات سوء مس بر جوانه‌زنی دانه‌های گیاهان دو رقم هایولا ۴۰۱ و RGS می‌باشد اثرات مهارکنندگی مس بر جوانه‌زنی دانه‌ها در غلظت‌های پایین مس (۵ و ۱۵ میکرومولار) کمتر از غلظت بالای مس (۲۵ میکرومولار) می‌باشد. نتایج مشابهی درباره اثرات بازدارندگی مس بر جوانه‌زنی دانه‌های گیاهان مختلف بدست آمده است. به عنوان مثال اثر مهارکنندگی مس را بر جوانه‌زنی گیاهان *Celosia argentea* L. و *Amaranthus dubius mart. ex thell* گزارش کرده‌اند (Fanimokun and Adedji, 1984).

Hsu and Chouc (۱۹۹۲) جوانه‌زنی گونه‌های *Miscanthus* را تحت تأثیر فلزات سنگین مورد بررسی قرار دادند و از اثرات مهم فلزات سنگین بر دانه‌ها پس از غوطه‌ور شدن در محلول‌های حاوی فلزات حاوی فلزات سنگین، نشت پتاسیم از سلول را عنوان کردند. همچنین Ayas and kadioglu (۱۹۹۷) اثرات فلزات سنگین را بر جوانه‌زنی دانه‌های *Lens esculenta* L. مورد بررسی قرار دادند. نتایج حاصل از تحقیقات این محققان نشاندهنده‌ی اثر فلزات سنگین بر متابولیسم پروتئین‌ها در ضمن جوانه‌زنی بود. به طوری که تحت تأثیر فلزات سنگین، در بخشهای مختلف رویان مانند لپه‌ها و ریشه چه، پروتئین‌های جدید تشکیل می‌شد و افزایش تولید برخی پروتئین‌ها درآندوسپرم نیز مشاهده شد. به طوری که فعالیت و تعداد باندهای پروتئینی تشکیل شده با درصد جوانه‌زنی و رشد اولیه دانه‌رست‌ها، ارتباط داشت. همین محققان، در سال ۱۹۹۶ کاهش جوانه‌زنی در دانه‌های *Lens esculenta* ؛ تحت تأثیر فلزات سنگین را به تغییر تعداد ایزوآنزیم‌های آمیلاز تحت تیمار فلزات سنگین در بخش‌های مختلف رویان و نیز تولید ایزوپراکسیدازهای جدید نسبت داده‌اند.

فلزات سنگین اثرات مهارکنندگی خود را بر جوانه‌زنی دانه‌ها به روش‌های گوناگون اعمال می‌کنند، برخی فلزات سنگین با مهار هیدرولیز نشاسته آندوسپرم از جوانه‌زنی و رشد اولیه دانه‌رستها جلوگیری می‌کنند و برخی دیگر با آسیب رساندن به رویان از جوانه‌زنی دانه جلوگیری می‌کنند (Mishra and Choudhuri, 1997).

گیاهان تحت استرس غیرزیستی، رادیکال آزاد اکسیژن را جمع‌آوری کرده و به موجب آن بدلیل پروکسیداسیون لیپید، غشاها را از بین می‌برند. در مطالعاتی که توسط Shalata و همکاران، (۲۰۰۱) انجام شد؛ مشخص گردید که آسکوربات باعث کاهش پراکسیداسیون لیپیدی غشاء در شرایط تنشی می‌شود.

Guo و همکاران (۲۰۰۵)، توقف اعمال شده به خاطر فلز سنگین آلومینیوم را روی دراز شدگی ریشه توسط تیمار L- گالاکتونو- γ - لاکتون و آسکوربات نشان دادند. در مطالعات دیگری که توسط Palanca و همکاران (۲۰۰۰) انجام شد؛ بیان کردند که برای جوانه‌زنی، گیاه باید توان سنتز آسکوربات را پیدا کند. که در تحقیق حاضر نتایج حاصله از افزایش میزان جوانه‌زنی تحت تیمار مس به همراه آسکوربات با نتایج فوق همخوانی دارد. و اما در تیمار سولفات مس به همراه جیبرلین و سولفات مس به همراه جیبرلین و آسکوربات در مقایسه با شاهد میزان درصد جوانه‌زنی به طور معنی‌دار کاهش می‌یابد.

برخی از محققین معتقدند جیبرلین‌ها باعث افزایش در فعالیت RNA پلیمراز شده و در نتیجه میزان رونویسی از بخشهایی از DNA را افزایش می‌دهند. بنابراین جیبرلین ممکن است به طور مستقیم یا غیر مستقیم میزان رونویسی بعضی ژنها را افزایش داده و در نتیجه باعث شود تا بسیاری از آنزیم‌های پاسخگو برای جوانه‌زنی در حد مطلوبی تولید شود. به هر حال جیبرلین‌ها با القای تغییرات در مراحل رونویسی و یا ترجمه برخی از ژنها موجب تغییرات کمی و کیفی در سنتز برخی از پروتئین‌ها می‌شوند و در نهایت سنتز آنزیم‌های هیدرولیز کننده مولکول‌های ذخیره‌ای دانه، نظیر α - آمیلاز، را تحریک می‌نمایند. این آنزیم‌ها واکنش‌های ضروری جهت تولید انرژی و ترکیبات ساختمانی لازم برای رشد و ظهور جنین را کاتالیز می‌نمایند و به این ترتیب پدیده جوانه‌زنی را القا می‌نمایند (Harberd and peng, 2002).

Bewleyand Black (1994) تأثیر تیمار با جیبرلین را در شکست خوب دانه‌های کرفس بسیار خوب ارزیابی نموده - اند و Naidu و همکاران (2000) نیز گزارش کرده‌اند که تأثیر مثبت جیبرلین روی درصد جوانه‌زنی بذور *Sapindus trifoliatus* به مراتب بیش از اثر اکسین و آبسزیک اسید بوده است.

کنترل رویش توسط جیبرلین عمدتاً از طریق تغییر نفوذپذیری غشاء و تاثیر آن بر سطح سنتز اولیه ATP و سطوح انرژی در جنین انجام می گیرد که منجر به رویش و جوانه زنی می گردد. می توان عنوان کرد که به دنبال آبگیری دانه، جیبرلین با اثراتش روی نفوذپذیری غشاء و سنتز ATP و تاثیر متقابل با سیتوکینین، نقش فعال کننده اصلی را درروبش دانه ایفا می‌کند (Bensent *et al*. 1990). امروزه به طور کلی پذیرفته شده است که جیبرلین با عنوان تحریک کننده های قوی و موثر در جوانه زنی و شکستن خواب بذر در گونه هایی از گیاهان زراعی پذیرفته شده اند.(Takahashi، 1991). مشخص شده است که جیبرلین ها می توانند اثر مشابه با نور قرمز را در تحریک جوانه زنی بذر نشان داده و جایگزین درجه حرارت پایین یا روزهای بلند برای شکستن خواب گردند (Takahashi *et al*.،1991).

با توجه به این نتایج انتظار می‌رفت که کاربرد همزمان جیبرلین و مس تا حدودی باعث رفع بازدارندگی اثر مس در جوانه زنی باشد که در پژوهش حاضر کاربرد غلظت ۰/۰۵ میلی‌مولار جیبرلین با افزایش غلظت مس نه تنها اثرات تعدیل کنندگی نداشت بلکه اثر سوء مس را بیشتر نشان می‌دهد.

در کلیه تیمارهای اعمال شده با افزایش غلظت سولفات مس در محلول غذایی، از غلظت پتاسیم به طور معنی‌دار ($P < ۰/۰۵$) کاسته شده است. این نتایج محققین دیگر (Wainwright and Woolhouse, 1977; Defilippis, 1979; DeVos et al., 1989; Woolhouse, 1989; Poschenrieder, 1989) مطابقت دارد.

به طور کلی از شباهت‌های اثر فلزات سنگین، آلودگی هوا، تابش UV-B، خشکی و شوری بر گیاهان؛ ایجاد تنش اکسیداتیو می‌باشد (Vincent and Roy, 1993; Hippel, and Elstner, 1996; Vangronsveld and Clijsters, 1994) و تنش اکسیداتیو پراکسیداسیون لیپیدها و بنابراین آسیب غشایی سلولی می‌شود (Vangronsveld and Clijsters, 1994).

پراکسیداسیون لیپیدها سبب اختلال در عمل غشاء شده اثرات زیان باری بر سلول‌های گیاهی می‌گذارد (Delong and Steffen, 1997).

بنابراین پراکسیداسیون لیپیدها به وسیله‌ی فلزات منجربه نشست K^+ از سلول می‌شود. (Mehta and Gour, 1999). نشست پتاسیم از سلول‌ها و بافت‌ها را از شاخص‌ترین اثرات آسیب‌های غشایی در گیاهان در معرض فلزات سنگین نیز عنوان کرده‌اند (Pandolfini *et al*., 1992).

زیرا غشاهای سلول گیاهی جزء اولین جایگاههایی هستند که به وسیله فلزات سنگین آسیب می‌بینند (Barcelo, 1990). البته باید توجه داشت که کاهش مقدار K^+ الزاماً در ارتباط با آسیب غشایی نیست و احتمالاً بوسیله جانشینی یونهای فلزات سنگین در کانال‌های یونی ویژه انتقال K^+ نیز امکان‌پذیر است (Devos *et al*. 1989 and Defilippis, 1979).

در این پژوهش کاهش پتاسیم در بخش زیرزمینی نسبت به بخش هوایی شدیدتر بوده است. تحت تیمارهای سولفات مس به همراه آسکوربات محتوای یونهای پتاسیم و سدیم در ریشه و بخش هوایی هر دو رقم کاهش می‌یابد؛البته نسبت به تیمارهای مس خفیف تر است با تیمارهای سولفات مس به همراه جیبرلین و نیز سولفات مس به همراه جیبرلین و آسکوربات به صورت توأم نسبت به شاهد کاهش محتوای یونی نشان داده شده است.($P<0.05$)

پرولین یکی از تنظیم کننده‌های اسمزی است، که موجب سازش سلول گیاهی برای زنده ماندن در شرایط تنش زا و حفاظت آنزیم‌ها و پروتئین‌های غشایی در برابر تغییرات ساختاری می‌شود (Rajagopal and Laher, 1993).

تحت شرایط نامساعد محیطی، مثل تنش و کمبود آب، گونه‌های فعال اکسیژن تولید و تجمع می‌یابند. گونه‌های فعال اکسیژن در سلول‌های گیاهی محل‌های هدف مختلفی مانند لیپیدها، رنگدانه‌ها، پروتئین‌ها و اسیدهای نوکلئیک دارند. لیپیدها، از جمله، ماکرومولکول‌های حیاتی سلول هستند که تحت شرایط تنش پراکسیده می‌شوند و به علت شرکت لیپید در ساختمان غشاء زیستی، تخریب این مولکول‌ها، ساختار غشایی را در بسیاری از سلول‌ها مختل می‌کند (Pustovoitova *et al*. 2000).

به عقیده (Hoekstra, 2001) به دلیل حفظ لیپیدهای غشاء از خسارت القاء شده توسط رادیکال‌های آزاد اکسیژن، افزایش پرولین مشاهده می‌شود و احتمالاً افزایش مقدار و فعالیت آنزیم‌ها و پروتئین‌های دفاعی، در حفظ ساختمان کلروپلاست دستگاه فتوسنتزی و کاهش تنش اکسیداتیو، حاصل از تنش نقش دارند.

نتایج بدست آمده از پژوهش حاضر، با مطالب ذکر شده مطابقت دارد و با افزایش غلظت سولفات مس در هر دو بخش اندام هوایی و ریشه در هر دو رقم هایولا ٤٠١ و RGS؛ افزایش پرولین دیده شد که طبق نظر (Ibarra *et al*., 1988) خود، نشاندهنده دفاع گیاه در برابر این تنش می‌باشد، این افزایش در رقم هایولا ٤٠١، چشمگیرتر بود.

بعد از تیمار سولفات مس به همراه آسکوربات پرولین در همه تیمارها با افزایش غلظت مس (۵ و ۱۵ و ۲۵ میکرومولار) نسبت به تیمارهای مس کاهش یافت و برعکس تحت تیمارهای سولفات مس به همراه جیبرلین و نیز کاربرد توأم جیبرلین و آسکوربات با سولفات مس افزایش معنی‌دار ($P < ۰/۰۵$) در تیمار دیده شد.

تحت تیمارهای سولفات مس: افزایش قندهای محلول نیز مانند پرولین به عنوان نوعی مکانیسم مقاوم به تنش وارد عمل می‌شود. می‌توان علت افزایش قندهای محلول در گیاه را در ارتباط با مهار چرخه‌ی کربس توسط مس دانست که تحت تنش مس فعالیت آنزیم‌های ایزوسیترات دهیدروژناز و گلوتامات دهیدروژناز مهار گردیده و در طی آن مصرف قندهای محلول در سلول کاهش می‌یابد که این خود موجب انباشتگی قندها در سلول می‌گردد (Hendry *et al*., 1992).

به عنوان علل دیگر می‌توان چنین ذکر نمود که با کاهش مصرف کربوهیدرات‌ها برای رشد گیاه که در اثر تنش فلز ایجاد می‌شود با کاهش در فتوسنتز و به تبع آن با کاهش در تثبیت CO_2 مواجه خواهیم بود که این امر منجربه تجمع کربوهیدارتها در گیاه می‌شود (Moya and Ros, 1993).

افزایش قندهای محلول در پژوهش حاضر با نتایج (Greger and Berell, 1992) که افزایش قندهای محلول را در اندام هوایی و ریشه گیاه برنج نشان می‌داد مطابقت دارد.

و کاهش مقدار نشاسته نیز بر اثر افزایش غلظت سولفات مس که به صورت معنی‌دار ($P < ۰/۰۵$) در ریشه و بخش هوایی هر دو رقم هایولا ٤٠١ و RGS دیده می‌شود؛ دلیلی بر این ادعاست که نشاسته تجزیه شده و قندهای محلول را ایجاد می‌کند (Badr Albaoui., 2003) و دیگر اینکه نقش مس یک اثر منفی و بازدارنده روی فعالیت آنزیم‌های درگیر در سنتز منبع نشاسته ایجاد می‌نماید و با بازدارندگی عمل آنزیم‌ها مانع از سنتز نشاسته در گیاهان می‌شود. (Van Huylenbroeck *et al*., 1996)

در این مورد هم تحت تیمارهای سولفات مس به همراه آسکوربات؛ آسکوربات باعث تعدیل در شرایط تنش‌زا و در نتیجه کاهش مقدار قندهای محلول در تیمارها نسبت به تیمارهای مس و افزایش قندهای نامحلول می‌شود. و جیبرلین به همراه سولفات مس و یا با کاربرد توأم با آسکوربات باعث افزایش اثر تنش‌زایی مس شد.

با توجه به مطالب ذکر شده درخصوص نحوه ایجاد تنش توسط فلز سنگین؛ می‌توانیم علت ایفای نقش آسکوربات را به عنوان تعدیل کننده و دارای آثار مثبت چنین بیان کنیم که از آنجایی که آسکوربات یک آنتی اکسیدان بسیار مؤثر است (Smirnoff and Wheeler, 2000) تجزیه رادیکال آزاد اکسیژن را افزایش داده و غشاءها را به کمک کاهش پروکسیداسیون لیپید از آسیب حفظ می‌کند (Guo *et al*., 2005).

نتیجه‌گیری

در مجموع از کلیه آزمایشات چنین نتیجه گیری می شود که تحت تنش مس، در مورد بیشتر پارامترهای مورد بحث، رقم هایولا ٤٠١ نسبت به RGS،«مقاومتر» بود. تیمار آسکوربات به همراه مس، آثار منفی مس را در دانه رستهای کلزا تخفیف می دهد. در صورتیکه، تیمار جیبرلین آثار مس را تشدید می نماید.

منابع

قربانلی، م. (۱۳۸۳) فیزیولوژی گیاهی۳، انتشارات دانشگاه پیام نور

Brigezu, K., Lichtenberger, O., Leopol, I., Neumann, D., 1999, Heavy metal tolerance of *Silene vulgaris*, J plant physiol, 158:536-546.

Badr-Alaoui, Patricia Genet, Florence Vinit Dunand, Marie-Laure Toussaint, Daniel Epron and Pierre-Marie Badot, 2003, Effect of copper on growth in cucumber plants (*Cucumis sativus*) and its relationships with carbohydrate accumulation and change in ion contents, Plant Science Vol., 166:1213-1218

Barcelo, Je., Poschenrieder, C., 1990, Plant water relations as affected by heavy metals: a review. J plant Nutr., 1:1-37.

Bates, L. S., Waldren, R. P., Treare, I. D., 1973, Rapid determination of free proline for water-stress studies, plant soil., 39-205-207.

Bewley, J. D., Black, M., 1994, Seeds: physiology of development and germination. Second edition. Plenum press, New York.

Clarkson, D. T. and Luttge, U., 1989, Divalent Cations, Transport and compartmentation, Prog. Bot., 51:93-112.

Defilippis, L. F., 1979, The effect of heavy metal compounds on the permeability of chlorella cells. Z. Pflanzenphysiol, 92-39-49.

Delong, J. M., Steffen, K. L., 1997, Photosynthetic function, lipid peroxiation and alpha tocopherol content in spinach leaves during exposure to UVB radiation, Canadian journal of plant science., 77:453-459.

Greger, M., Bertell, G., 1992, Effects of Ni^{2+} and Cd^{2+} on the carbohydrate metabolism in sugar beet (*Beta vulgaris*)., J Exp Bot., 43:467-173.

Guo, Z., Tan, H., Zhu, Z., Lu, S., 2005 Effect of intermediates on ascorbic acid and oxalate

Craig, J. S(ed): Hand book of phycological Methods., pp: 96-97 carbridge unir. Press, Cambridge.

Fanimokan, V. O., Adedeji, F. O., 1984, Copper deficiency and toxicity in two tropical leaf vegetables (*Celosia argentea L.* and *Amaranthus dubius* mart. ex thell), Envir & Exper. Botany., 24:105-110.

Mehta, Sk., Cour, J. P., 1999, Heavy metal-induced proline accumulation and its role in ameliorating metal toxicity in *Chlorella vulgaris*., New phytol., 143:253-259.

Mishra, A., Choudhuri, MA., 1997, Differential effects of pb^{2+} and Hg^{2+} on inhibition of germination of seed of two cultivars. Indian Journal of plant physiology 2(1)

Moya, J. L., Ros, R., Picazo, I., 1993, Influence of Cademium and Nickel on growth, net photosynthesis and carbohydrate distribution in rice plants, Photosynthesis research., 36:75-80.

Naidu, C. V., Rajendrudu, G., Swamy, P. M., 2000, Effect of plant growth regulators on seed germination of *Sapindus trifoliatus*. Seed Science and Technology., 28:249-252.

Palanca, J., et al, 2000, The control of As synthesis and turn over in pea seedling. J. Exp. Botany., 345-674.

Pandey, N., Sharma, C. P., 2002, Effect of heavy metal Co^{2+} Ni^{2+} and Cd^{2+} on growth and metabolism of cabbage, Plant Sci, 163: 753-758.

Pandolfini, T., Gabbrielli R, Commparini, C., 1992, Nickel toxicity and peroxidase activity In seedings of *Triticum aestivum L.*, Plant Cell Environ., 15:719-725

Poschenrieder, C. B., Gunse, Barcelo. J., 1989, Influence of heavy metals on water relations, stomatal resistance, and abscisic asid content in expanding bean leaves, plant physiol., 90:1365-1371.

Stearns, J. C., Shah, S., Greenberg, B. M., Oixon, D. G., Glick, B. R., 2005, Tolerance of transgenic canola expressing 1- amino cyclopropane- 1- Carboxylic acid deaminase to growth inhibition by nickel, Plant Physiology, Bichem, 41: 701-708.

Vincent, W. F., Roy, S., 1993, Solar ultraviolet-B radioation and aquatic primary production: biosynthesis of rice and in relation to its stress resistance, plant physiol & Bioch. 43: 955-962.

Harberd, N. P., Peng, J., 2002, The role of GA-mediated signaling in the control of germination. Science. 5:376-381.

Hendry GAF, Baker AJM, Ewart CF, 1992, Heavy metal tolerance and toxicity, oxygen radical processes and molecular damage in Cadmium tolerant clones of *Holcus lanatus L.* Acta Bot Neerl., 41:271-281.

Hippeli, S., Elstner, E. F., 1996, Mechanism of oxygen activation during plant stress: Bio Chemical effect of air pollutants. Journal of Plant physiology., 148:249-257.

Ibarra-Caballero J, Villanueva- Verdu Zco J, Molina-Galam J, J imerez ES-D, 1988, Proline accumulation as a symptom of drought stress in *maize*: a tissue differentiation requirement. Journal of Experimental Btany., 89:889-897.

Kochert, G., 1978, Carbohydrate determination by the phenol sulfuric acid method, In Helebust, J. A., damage, protection and recovery Environmental reviews 1:1-12.

Wain wright, S. J., Woolhouse, H. W., 1977, Some physiological Aspects of Nickel and Zinc tolerance in *Agrostis tenuis*: Cell Elongation and membrane walker, C. D. R. D, Graham, J. T. Madison, E. E. Cary, and R. M. Welch, 1989, Effects of N: deficiency on some nitrogen metabolites in cowpeas (*Vigan unguiculata L*. Walp). Plant physiol. 79:474-479.

Woolhouse, H. W., 1989, Toxicity and tolerance in the responses of plants to metals, pp: 245-300. In: O. L. lange, P. S. Nobel, C. B.

Yang, X., Baligor, V. C., Mantens, D. C., Clark, R. B., 1996, plant tolerance to Nickel toxicity:I. Influx, transport, and accumulation of Nickel in four species, Journal of plant nutrition. 19(1), 73-85.

Chao, L., Xiong, Z-T., Geng, B., 2006, Phyrotoxic effects of copper on nitrogen metabolism and plant growth in Brassica pekinensis Rupr, Ecotoxicology and Environmental Safety. V:64. 273-280.

Craker, L.E., Xin Craker, L.E., Xing, B., Zheljaz kov, V.D., 2006, Effects of Cd, Pb, and Cu on growth and essential oil contents in dill, peppermint, and basil, Envir. & Exper. Botany., 58:9-16.

Interaction of Copper, Ascorbate and Gibberllin on germination, ion content, proline, soluble sugar and starch content two cultivars of rape seed (*Brassica napus* L.)

LariYazdi, H[1]., Ghorbanli, M[2]., Roshani, M[1].

1- Assinstant professor, department of biology, Isalmic Azad University, Boroujerd,
2- Assinstant professor, department of biology, Isalmic Azad University, Gorgan,

Abstract

Copper is one of the heavy toxic metals that its toxicity is currently under investigation, in different plant types considering physiologic, biological, molecular, cellular and genetic aspects. In this research the copper toxicity effect on some of physiological activity of "*Brassica napus* L." Hylo 401 and RGS has been student. Seed of *Brassica* were cultured in hydroponic environmental. Roots and shoots used for evaluation of different treatments: Cu (5, 15, 25μm/l), Cu & AsA (0.5μm/l), Cu & GA_3 (0.05μm/l) and Cu, AsA & Ga_3 (as above), experiments were done in three replications in each treat group. In both Hyola 401 and RGS following factors were decreased significantly ($p<0.05$); germination percent, unsoluble sugar, K^+ ions (in shoot and root). In both Hyola and RGS following factors were increased significantly ($P<0.05$) soluble sugar, proline. The finding of the study suggest that upon copper stress, in majority of studied parameters, Hyola 401 was more resistant than RGS. AsA treatment accompanying Cu, attenuated Cu effects on *Brassica* seedling, however GA_3 exaggerated the Cu effects. Collected data were exracted and statistical analysis with SPSS statistical software 14th edition, performed. The results suggest that Cu induces inhibitory effects on growth and some of physiologic activities of plnant.

Keywords: *Brassica napus* L., Copper, Ascorbate, Gibberllin, Stress