

بررسی پاسخ دو رقم جدید گوجه‌فرنگی به کاربرد برون‌زای لیگاندهای هیستیدین و مالات جهت کاهش تنش اکسیداتیو ناشی از سمیت همزمان مس و نیکل در محیط کشت هیدروپونیک

حسین مظفری^{۱*}، حسن سالاری^۱، حکیمه علومی^۱، محمد مقتدر^۲ و محمد محسن سلاجقه^۱

^۱ گروه اکولوژی، پژوهشکده علوم محیطی، پژوهشگاه علوم و تکنولوژی پیشرفته و علوم محیطی، دانشگاه تحصیلات تکمیلی صنعتی و فناوری پیشرفته، کرمان، ^۲ گروه تنوع زیستی، پژوهشکده علوم محیطی، پژوهشگاه علوم و تکنولوژی پیشرفته و علوم محیطی، دانشگاه تحصیلات تکمیلی صنعتی و فناوری پیشرفته، کرمان

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۰۴/۲۵، تاریخ پذیرش نهایی: ۱۳۹۸/۰۷/۲۲)

چکیده

سمیت فلزات سنگینی مانند مس و نیکل، موجب القا تنش اکسیداتیو در ارقام گوجه‌فرنگی می‌شود که به دلیل تولید رادیکال‌های آزاد و آسیب‌های غشا پلاسمایی ناشی از مقادیر سمی مس و نیکل است. هنگامی که اثرات منفی تنش اکسیداتیو بیش از توانایی سیستم مقاومت آنتی‌اکسیدانی باشد، گیاه دچار کاهش رشد و عملکرد می‌شود. در این پژوهش سعی شد تا تأثیر همزمان دو لیگاند هیستیدین و مالات بر بهبود رشد و کاهش تنش اکسیداتیو در دو رقم جدید گوجه‌فرنگی شامل کال‌جی و ارلی‌اوربانا تحت تنش همزمان مس و نیکل در شرایط استاندارد هیدروپونیک بررسی شود. نه تیمار آزمایش پس از بهینه‌سازی حاوی غلظت‌های ۱۵۰ و ۳۰۰ میکرومولار مس و نیکل، ۳۰۰ و ۶۰۰ میکرومولار هیستیدین و ۱ و ۲ میلی‌مولار مالات در پایه‌ای از محلول هوگلند بودند. تیمارهای مذکور بر گیاهان کشت‌شده در سطح لوله فالکون ۵۰ سی‌سی حاوی محلول هوگلند بدون بستر کشت در سه تکرار اعمال شدند. پس از تیمار، پارامترهایی مانند رشد مورفولوژیک، میزان پروتئین کل، تغییر فعالیت آنزیم‌های کاتالاز و پراکسیداز، تجمع آب اکسیژنه، مالون دی‌آلدئید و غیره در هر دو رقم گیاه سنجش شدند. نتایج نشان داد که کاربرد همزمان ۲ میلی‌مولار و ۶۰۰ میکرومولار از لیگاندهای هیستیدین و مالات تأثیر معنی‌داری بر بهبود تنش اکسیداتیو بر ارقام گوجه‌فرنگی تحت تنش ۳۰۰ میکرومولار نیکل و مس داشت. به‌طوری که با افزودن لیگاندها در شرایط تنش، شاخص‌های اکسیدانی به میزان شاهد بهبود یافته که نشان از همبستگی بیشتر غشا پلاسمایی و کاهش جذب و انتقال کاتیون‌های آزاد نیکل و مس دارد. علاوه بر این، رقم کال‌جی پاسخ نسبی بهتری از لحاظ شاخص‌های رشد و اکسیدانی به لیگاندها، تحت شرایط تنش داد. به نظر می‌رسد لیگاندها با تأثیر فلزات سنگین آزاد بر فرآیندهای فیزیولوژیکی، مولکولی، فعالیت آنزیم‌ها و جایگزینی با عناصر تغذیه‌ای مقابله می‌کنند که پیشنهاد می‌شود این تأثیر لیگاندها در سطح مولکولی نیز مطالعه گردد.

واژه‌های کلیدی: پراکسیداز، کاتالاز، مالون دی‌آلدئید، مس، نیکل

مقدمه

جهت حفظ متابولیسم و رشد بهینه گیاهان عالی مؤثرند

(Parlac, 2016؛ امینی و همکاران، ۱۳۹۱؛ قادریان و مهتدی،

عناصر سنگین مس و نیکل به عنوان عناصر تغذیه‌ای کم‌مصرف،

*نویسنده مسئول، نشانی پست الکترونیکی: mozafari.hossein@gmail.com

مطالعات زیادی به منظور یافتن گونه‌های گیاهی با ویژگی تحمل، تجمع مس و یا بررسی ساز و کارهای فیزیولوژیک تحمل به سمیت این عنصر انجام شده است (Mahmood and Islam, 2006). احتمال می‌رود در بین ارقام مختلف گیاهی، نمونه‌ای جالب توجهی از پاسخ گیاهان به سمیت مس به‌ویژه از جنبه کاربرد تنظیم‌کننده‌های رشد یا لیگاندها یافت شود. از این‌رو، بررسی برخی ویژگی‌های فیزیولوژیک و میزان تحمل ناشی از افزایش این فلز سنگین حائز اهمیت است (Xu et al., 2006; Srivastava et al., 2006; Tewari et al., 2006).

در محیط هیدروپونیک حاوی نیکل نیز میزان تجمع این عنصر سنگین در گیاهان قابل توجه بوده که در محیط‌های اکولوژیکی این تجمع گزارش نشده است (Ahmad et al., 2013; Asher, 1991; Sreekanth et al., 2007). آستانه سمی نیکل در محیط هیدروپونیک از ۰/۵ تا ۳۰۰ میلی‌گرم بر لیتر است. در حالی که در آلوده‌ترین مناطق (کارخانه‌های ذوب نیکل - مس) ۰/۱ تا ۲/۹ میلی‌گرم بر کیلوگرم خاک است. این موضوع نشان‌دهنده ت/دثیر مواد ذکرشده در خاک در کاهش نیکل آزاد است (Baker et al., 2000; Bhalerao et al., 2015; Kovacik et al., 2008).

کمپلکس کاتیون‌های آزاد نیکل با لیگاندهای ضعیف مانند گروه کربوکسیل اسیدهای آلی مانند مالیک اسید و اسیدهای آمینه مانند هیستیدین بر جذب نیکل آزاد توسط گیاهان تأثیر می‌گذارد و سمیت نیکل را کاهش می‌دهد. کمپلکس‌شدن این کاتیون‌ها با لیگاندهای قوی مانند اتیلن دی‌امین تترا استیک اسید (EDTA) هم باعث کاهش پایدارتر جذب نیکل آزاد توسط گیاه شده و سمیت نیکل آزاد را بیشتر کاهش می‌دهد و ظرفیت مقابله با تنش فلزات سنگین را در گیاهان افزایش می‌دهد (Xu et al., 2009; Wu et al., 2007). تأثیر سمیت نیکل در غلظت مشابه نسبت به بسیاری از آلاینده‌های دیگر مانند مس کمتر است (Mostofa et al., 2015). در گیاهان تحت تنش غرقابی سمیت نیکل معمولاً چند صد برابر کمتر از مس است. البته سمیت نیکل و مس به دلیل مشترک بودن برخی مسیرهای کانال‌های کاتیونی و ناقل‌های پروتئینی غشایی

(۱۳۸۶). مس در فرایندهای تنفس، فتوسنتز، انتقال قندها، متابولیسم پروتئین‌ها، متابولیسم ازت، ثبات دیواره سلولی، کوفاکتور آنزیم‌ها و پاسخ هورمونی گیاهان نقش مهمی دارد (Gao et al., 2008; Mostofa et al., 2015). نیکل نیز در ساخت آنزیم اوره‌آز، فرودوکسین و برخی پروتئین‌ها در گیاهان اهمیت دارد (Parlac, 2016; Sreekanth et al., 2013). با این وجود، غلظت‌های فوق آستانه‌ای این دو عنصر، سبب بروز سمیت و تنش اکسیداتیو در گیاهان می‌شوند (Allen, 2002; Gao et al., 2008). عوامل و منابع زیست محیطی مهمی مانند فعالیت کارخانجات ذوب فلزات، فعالیت معادن استخراج فلزات، فاضلاب‌های شهری، سوزاندن زباله‌ها و استفاده از کودهای کشاورزی، موجب انتشار فلزات سنگین نیکل و مس به محیط زیست می‌شوند و تجمع این عناصر را در خاک افزایش می‌دهند (Sreekanth et al., 2013; Mostofa et al., 2015; Zhang et al., 2008).

یکی از علائم سمیت مس در گیاهان، پراکسیداسیون لیپیدهای غشایی است که موجب تغییر ساختار غشای سلولی و بازدارندگی رشد گیاه می‌شود. سلول‌های گیاهی برای حفاظت در مقابل تنش اکسیداتیو، مجهز به یک سیستم جاروب‌کننده رادیکال‌های آزادند که به دو صورت آنزیمی و غیرآنزیمی عمل می‌نماید. سمیت مس، موجب بازدارندگی فعالیت آنزیم‌های مربوط به فتوسنتز، ساخت رنگیزه‌های گیاهی و ثبات غشا مداخله می‌کند. سمیت مس، معمولاً رشد ریشه را بیشتر از اندام‌های هوایی متأثر می‌سازد؛ زیرا مقدار زیادی از آن در دیواره سلولی یا در فضای بین غشا و دیواره سلولی ریشه تجمع می‌یابد و ایجاد سمیت می‌کند. مکانیسم‌های تحمل سمیت مس در گیاهان عالی، شامل اجتناب از جذب مس، غیرمحرک کردن یون‌ها در دیواره سلولی و نگهداری آن در نقاطی از سلول به صورت ترکیبات پیچیده محلول است. تنش مس بر عملکرد و دستگاه فتوسنتزی به‌ویژه غشاهای تیلاکوئیدی و فتوسیستم ۲ ثابت شده است. غلظت ۱۰ میکرومولار مس موجب سمیت در گیاهان مانند برنج می‌گردد (Mostofa et al., 2015; Kupper et al., 2009).

در گیاهان، لیگاندهایی مانند سیترات، سوکسینات، گلوتامات، اگزالات، هیستیدین و ملات موجب اتصال نسبتاً پایداری با یون‌های نیکل می‌شوند و کمپلکس‌هایی را ایجاد می‌کنند. این نوع اتصال در شیرابه برخی درختان بخوبی دیده می‌شود (Cobbett and Goldsbrough, 2002; Kupper, 2009). هیستیدین نیز نقش مهمی در مقاومت گیاهان به تنش نیکل از طریق شلاته‌کردن، سم‌زدایی نیکل و همچنین انتقال نیکل باندشده از ریشه به آوندهای چوبی دارد. تشکیل کمپلکس نیکل-هیستیدین در جریان مقاومت گونه‌های مختلف مخمرها به تنش‌های نیکل، مس و کبالت نیز مشاهده شده است (Pearce and Sherman, 1999). به هر حال تأثیر دقیق نیکل از جنبه‌های بیوشیمیایی و مولکولی، بر تغییر مسیر بیوستز هیستیدین چندان شناخته شده نیست، اما ارتباط مستقیم بین نیکل و بیان ژن فعالیت اولین آنزیم مسیر بیوستز هیستیدین به اثبات رسیده است.

آلودگی گیاهان زراعی مانند گوجه‌فرنگی نیز یکی از مشکلات مهم جامعه امروزی است که سلامت انسان را تهدید می‌کند و موجب بروز بیمارهای مختلف جسمی و عصبی می‌گردد (Ahonen-Jonnarth et al., 2004; Diaz et al., 2001). بنابراین کاهش آلودگی فلزات سمی مانند مس و نیکل در رشد و عملکرد گیاه گوجه‌فرنگی اهمیت دارد. گیاه گوجه‌فرنگی دارای ارقام جدید مختلف بوده و هر روز ارقام جدید آن در صنعت کشاورزی وارد می‌شوند که لزوم به بررسی واکنش‌پذیری آن به آلودگی فلزات سنگین و بهبود مقاومت به تنش‌های مربوطه احساس می‌گردد. بنابراین، سمیت توأم یا جداگانه مس و نیکل در گیاهان زراعی مانند گوجه‌فرنگی موجب کاهش محصول می‌گردد که مطالعه تأثیرات اثر همزمان و متقابل این فلز سمی با شلاته‌کننده‌ها حائز اهمیت است (Barcelo and Poschenrieder, 2004; Jones, 2002).

با توجه به گسترش اسیدی‌شدن خاک‌های کشاورزی، گسترش مناطق صنعتی و در نتیجه آزادشدن تدریجی نیکل و مس در خاک و تجمع و تنش آن در گوجه‌فرنگی (Mostofa et

Alam et al., 2007; Athar and Ahmad, 2002).

به‌طور کلی مقادیر اضافی و سمی نیکل بر پدیده‌هایی همچون جوانه‌زنی گیاه (Andersen et al., 2002a)، رشد گیاه‌چه، رشد ریشه، رشد ساقه، گسترش برگ، وزن خشک گیاه، فتوستت، تنفس، جذب مواد غذایی، متابولیسم، تغذیه گیاهی، تجمع متابولیت‌های گیاهی (Meriga et al., 2004; Chen et al., 2004)، کیفیت و عملکرد غشا، تغییر کیفیت لپیدهای غشایی، عملکرد پروتئین‌های غشایی در جذب و انتقال یون‌ها، انتقال قندها و روابط آبی گیاه (Volbeda and Fontecilla-Camps, 2005; Wang et al., 2010) تأثیرگذار است.

بنابراین نیکل و مس از طریق دو مسیر کلی بر گیاهان تأثیر منفی می‌گذارند که ابتدا تنش این عنصر بر متابولیسم و کارکرد گیاه تأثیر گذاشته و در مرحله بعد موجب القا تنش اکسیداتیو ثانویه در گیاه می‌شود (Bowler and Fluhr, 2000; Lukin et al., 2003). میزان مقاومت گیاهان به تنش نیکل، بستگی به نوع گیاه، غلظت نیکل، شرایط جذب نیکل و وجود کلسیم دارد (Ghasemi et al., 2009). به‌عنوان مثال غلظت ۲۶ میکروگرم بر گرم بافت خشک موجب کاهش فتوستت در گیاه ذرت می‌شود در حالی که در گیاه چاودار، میزان ۵۰ میکروگرم بر گرم بافت خشک نیکل موجب کاهش تدریجی کلروفیل و آغاز فرایند کلروزگی در بافت‌های فتوستت‌کننده می‌شود. نکروزگی بافت‌ها و پژمردگی نیز در هنگام تنش نیکل بخوبی قابل مشاهده است (Osteras and Greger, 2006; Zoller et al., 2003). در تحقیقات مختلف دیگر نیز تأثیر تنش‌زای مس نیز در گیاهانی مانند شاهی، ریحان و غیره به‌طور قابل‌توجه از لحاظ فیزیولوژیک مشاهده شده است (Georgiadou et al., 2015; Gao et al., 2008; Mostofa et al., 2018).

اتصال فلزات سنگین به لیگاندهایی مانند هیستیدین و ملات از واکنش‌های نامناسب فلز سمی با سایر لیگاندهای سلولی مهم مانند پروتئین‌ها، کلروفیل و غیره در همان بخش سلولی ممانعت به‌عمل آورد (Kupper, 2009).

در این تحقیق سعی شد از دو رقم مهم گوجه‌فرنگی مانند کال‌جی و ارلی‌اوربانا جهت بررسی مکانیسم‌های مقاومت به تنش اکسیداتیو ناشی از سمیت نیکل و مس استفاده گردد. بنابراین میزان تأثیر همزمان و متقابل دو لیگاند اسیدآمینه هیستیدین و مالات بر کاهش اثرات سمی و اکسیداتیو مس و نیکل در دو رقم زراعی گیاه گوجه‌فرنگی در شرایط هیدروپونیک بررسی شد. جهت این مطالعه، کاهش اثرات این دو تنش همزمان بر دو مرحله جوانه‌زنی و مرحله رویشی گیاه از لحاظ شاخص‌های رشد، بیوشیمیایی، آنتی‌اکسیدانی، آنزیمی و غیرآنزیمی در محیط‌کشت هیدروپونیک مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

انتخاب گیاه: در این پژوهش، دو رقم جدید از گیاه گوجه‌فرنگی شامل کال‌جی‌ان ۳ (Cal j N3) و رقم ارلی اوربانا (early urbana) انتخاب گردیدند که اهمیت خاصی در مناطق گرم و خشک ایران به‌ویژه مناطق کشاورزی جنوب شرق ایران دارند و دارای سطح زیرکشت زیادی در سایر مناطق ایران نیز هستند. بذره‌های گیاه مورد نظر از شرکت فلات ایران-تهران تهیه شدند.

تعیین ترکیب تیمارها: ترکیب نهایی تیمارها پس از مطالعات اولیه، تحقیقات قبلی ما و سایر تحقیقات متدوال تعیین گردید. طبق آزمایش فاکتوریل، تعداد کدهای تیماری اولیه آزمایش ۸۱ عدد شامل سه سطح غلظتی از هر یک از مواد هیستیدین، مالات، سولفات نیکل و سولفات مس به صورت جداگانه و یا توأم بود که جهت بهینه‌سازی با سه تکرار بر گیاهان اعمال شد. اما پس از مرحله بهینه‌سازی و انتخاب تیمارهای متناسب با شرایط واقعی‌تر محیط، سایر تحقیقات و حذف تنش‌های شدید ساس شاخص‌های مهم رشد و تنش، در پژوهش نهایی نه تیمار حاوی ۱۵۰ یا ۳۰۰ میکرومولار هیستیدین + ۱ یا ۲ میلی‌مولار مالات انتخاب گردید. پس کاربرد این غلظت‌ها پس از بهینه‌سازی آزمایشگاهی و مطالعه پژوهش‌های مرتبط صورت گرفت (Pearce and Sherman, 1999; Kupper, 2009; Cobbett and

Goldsbrough, 2002). کدهای نهایی تیماری این پژوهش در جدول ۱ ارائه شده است که در قالب طرح کاملاً تصادفی بر بذرها و گیاهان اعمال شدند. بنابراین گیاهان شامل دو رقم گوجه‌فرنگی تحت نه تیمار نهایی حاوی مقادیر متفاوت لیگاند هیستیدین، مالات و فلزات سنگین نیکل و مس با سه عدد تکرار قرار گرفتند (جدول ۱). با توجه به سایر تحقیقات، محلول‌های تیمار دارای اسیدیته $\text{pH} = 5.7-5.9$ بودند که این اسیدیته و ثبات محلول غذایی، از آزادبودن یون‌ها در محیط حاوی لیگاندهای هیستیدین و مالات جلوگیری به‌عمل می‌آورد و مبنای فرضیه این پژوهش نیز بر همین اساس است. به عبارت دیگر کمپکس تشکیل‌شده کاتیون لیگاند در این شرایط دارای پایداری کافی بوده و میزان کاتیون‌های آزاد محلول به حداقل می‌رسد (محمد حسینی و همکاران، ۱۳۹۰؛ Pearce and Sherman, 1999; Kupper, 2009; Cobbett and Goldsbrough, 2002).

بررسی جوانه‌زنی بذر تحت تیمارها: بذره‌های ارقام گوجه‌فرنگی با هیپوکلریت سدیم ۰/۱ درصد ضدعفونی و سپس سه مرتبه با آب مقطر دوبار تقطیر شسته شدند. در هر پتری‌دیش ۱۰۰ عدد بذر در ردیف‌های ۱۰ تایی کاشته شد. پتری‌ها در ژرمیناتور، مدل 1KH RH ساخت شرکت پارس، با دمای 23 ± 0.1 درجه سانتی‌گراد و رطوبت ۶۰-۶۵ درصد نگهداری شدند. برای هر تیمار سه پتری (سه تکرار) در نظر گرفته شد و محلول‌های تیمار به حجم ۳ الی ۴ میلی‌لیتر در قالب طرح کاملاً تصادفی به هر یک از پتری‌ها اضافه گردید. پس از یک هفته، تعداد بذره‌های جوانه‌زده هر پتری‌دیش شمارش گردید و درصد جوانه‌زنی مشخص محاسبه شد (Gonnelli et al., 2001).

کشت هیدروپونیک ارقام گیاه و کاربرد تیمارها: بذره‌های ارقام پس از ضدعفونی‌نمودن به‌مدت سه ساعت در آب مقطر خیسانده شدند. سپس بذرها به پتری‌دیش‌های مرطوب‌شده با محلول‌های تیمار ($\text{pH} = 5.7-5.9$) منتقل گردید. بذرها به‌مدت چهار روز در تاریکی با دمای 25 ± 0.1 درجه سانتی‌گراد در ژرمیناتور نگهداری شدند. از گیاهک‌های به‌وجود آمده با اندازه یکسان جهت کشت در محلول غذایی استفاده گردید. کاشت

جدول ۱- تیمارهای مورد استفاده پس از بهینه‌سازی نهایی در آزمایش که با سه تکرار بر دو مرحله جوانه‌زنی و رشد دو رقم گیاه گوجه‌فرنگی در شرایط استاندارد هیدروپونیک در گلخانه مورد استفاده قرار گرفت.

کد تیمار	محلول سولفات نیکل + سولفات مس (میکرومولار)	محلول لیگاند (میکرومولار هیستیدین + میلی مولار ملات)
۱ (شاهد)	۰ + ۰	۰ + ۰
۲	۱۵۰ + ۱۵۰	۰ + ۰
۳	۳۰۰ + ۳۰۰	۰ + ۰
۴	۰ + ۰	۱ + ۳۰۰
۵	۱۵۰ + ۱۵۰	۱ + ۳۰۰
۶	۳۰۰ + ۳۰۰	۱ + ۳۰۰
۷	۰ + ۰	۲ + ۶۰۰
۸	۱۵۰ + ۱۵۰	۲ + ۶۰۰
۹	۳۰۰ + ۳۰۰	۲ + ۶۰۰

گیاهک‌ها در لوله‌های آزمایش پلاستیکی دارای درب (با شبکه توری در مرکز درب جهت رشد گیاهک بر روی سطح آن) صورت گرفت. حجم لوله‌های آزمایش ۵۰ میلی‌لیتر بوده که در سطح هر کدام دو گیاهک قرار داده شد. لوله‌ها با محلول غذایی هوگلند با رقت ۰/۱ حاوی کد تیمار مربوطه پر شدند (Asher, 1991).

جهت ایجاد محیط مناسب برای تأثیر بهتر تیمارها بر گیاه، اسیدیته محلول غذایی بین ۵/۹-۵/۷ حفظ شد. محلول غذایی هر دو روز یکبار تعویض گردید. گیاهان در شرایط ۱۶ ساعت نور با دمای 25 ± 0.1 درجه سانتی‌گراد و ۸ ساعت تاریکی با دمای 23 ± 0.1 درجه سانتی‌گراد با شدت نور ۱۲۰ میکرومول بر متر مربع بر ثانیه قرار گرفتند. پس از ۱۰ روز، تیمارها به محلول غذایی لوله‌ها اضافه شدند. مدت زمان تیمار گیاهان ۱۰ روز بود. از گیاهان حاصل جهت سنجش پارامترها استفاده گردید (Asher, 1991; Xu, 2009).

طول اندام‌های ریشه و اندام هوایی: با استفاده از خط‌کش با دقت ۰/۱ سانتی‌متر و پس از برش منطقه یقه گیاه و جداسازی آنها از یکدیگر، طول اندام‌های ریشه و ساقه در هر گیاه تیمار شده اندازه‌گیری گردید.

وزن تر ریشه و اندام هوایی: جهت تعیین میزان تأثیر

تیمارها بر رشد گیاهان، ریشه گیاهان پس از تیمار و خارج‌نمودن ریشه از داخل محلول غذایی، بلافاصله ریشه‌ها با محلول ۰/۵ میلی‌مولار کلسیم کلرید شسته شد. وزن تر ریشه و اندام هوایی نیز در هر گیاه گوجه‌فرنگی تیمار شده، با ترازوی Sartorius (مدل BPSIID) با دقت ۰/۰۰۱ گرم سنجش شد و بر حسب گرم بر هر گیاه ارائه گردید. از این نمونه‌ها جهت فریزکردن و استفاده در بیشتر پارامترهای بعدی استفاده گردید.

سطح برگ: جهت محاسبه سطح برگ سوم هر گیاه از روش وزن کاغذ معادل سطح هر برگ رسم شده استفاده گردید. سطح دقیق برگ بر حسب سانتی‌متر مربع با استفاده از معادله مربوطه محاسبه گردید.

رنگی‌های فتوسنتزی برگ: سنجش میزان رنگی‌های فتوسنتزی در برگ گیاهان ارقام گوجه‌فرنگی تحت تیمارها، شامل کلروفیل a، b، کلروفیل کل و کاروتنوئیدها بوده که به روش Lichtenthaler (۱۹۸۷) انجام پذیرفت. ۰/۲ گرم از برگ سوم با ۱۵ میلی‌لیتر استون ۸۰ درصد بخوبی سائیده شده تا بافت برگ بخوبی با استون مخلوط گردد. پس از صاف‌کردن و سانتریفیوژ مخلوط حاصل، جذب محلول به‌دست آمده بلافاصله با دستگاه اسپکتروفتومتر Carry50 (ساخت کشور استرالیا) در طول‌موج‌های ۶۶۳/۲۰، ۶۴۶/۸ و ۴۷۰ نانومتر

گلیسین استفاده شد (Hwang, 1975).

سنجش هیدروژن پراکسید (H_2O_2) در برگ: سنجش میزان تجمع هیدروژن پراکسید در برگ با استفاده از روش Velikova و همکاران (۲۰۰۰) به صورت رنگ سنجی انجام پذیرفت. ۵۰۰ میلی گرم از بافت های اندام هوایی در حمام یخ با تری کلرو استیک اسید ۰/۱ درصد سائیده شدند. عصاره حاصل با استفاده از یک سانتریفوژ یخچال دار سانتریفوژ گردید. سپس ۰/۵ میلی لیتر از محلول رویی به ۰/۵ میلی لیتر بافر فسفات پتاسیم ۱۰ میلی مولار (pH=۷) و یک میلی لیتر یدید پتاسیم یک مولار اضافه گردید و جذب محلول ها در طول موج ۳۹۰ نانومتر خوانده شد. مقدار هیدروژن پراکسید در هر نمونه با استفاده از ضریب خاموشی $0.28 M^{-1}cm^{-1}$ محاسبه شد و بر حسب میکرومول بر گرم وزن تر گزارش گردید.

سنجش میزان پراکسیداسیون لیپیدهای برگ: جهت مطالعه میزان پراکسیداسیون اسیدهای چرب غیراشباع غشایی در برگ تحت اثر تیمارها، غلظت مالون دآلدئید و سایر آلدئیدها به دو روش ذیل اندازه گیری گردید:

تعیین غلظت مالون دآلدئید برگ: اندازه گیری مالون دآلدئید (MDA) به روش Heath و Packer (۱۹۶۸) انجام شد. شدت جذب محلول حاصل با استفاده از اسپکتروفتومتر مدل Varian Cary50 (ساخت استرالیا) در طول موج ۵۳۲ نانومتر خوانده شد. ماده موردنظر برای جذب در این طول موج، کمپلکس قرمز MDA-TBA است. جذب بقیه رنگی های غیراختصاصی و مزاحم در ۶۰۰ نانومتر تعیین گردید و از این مقدار کسر گردید. برای محاسبه غلظت MDA از ضریب خاموشی معادل $155 mM^{-1}cm^{-1}$ استفاده شد و نتایج حاصل از اندازه گیری بر حسب نانومول بر گرم وزن تر محاسبه گردید.

سنجش سایر آلدئیدهای برگ: سنجش میزان سایر آلدئیدها با روش Meirs و همکاران (۱۹۹۲) انجام شد. جذب سایر رنگی های غیراختصاصی و مزاحم در ۶۰۰ نانومتر خوانده شد و از این مقدار کسر گردید. برای محاسبه غلظت این آلدئیدها از ضریب خاموشی معادل $10^5 \times 0.457 mM^{-1}cm^{-1}$ استفاده شد. نتایج بر حسب نانومول

به دست آمد و غلظت رنگی های بر حسب میکروگرم بر گرم وزن تر با استفاده از معادله های مربوطه به دست آمد.

سنجش پروتئین کل محلول و استخراج پروتئین ها: برای سنجش مقدار پروتئین کل محلول، ابتدا پروتئین ها از اندام هوایی گیاه در دمای بین صفر تا ۴ درجه سانتی گراد در آب یخ استخراج شدند. بافر استخراج شامل بافر فسفات ۵۰ میلی مولار با pH=۷/۲ که دارای اتیلن دی آمین تتراسیتیک اسید (EDTA) ۱ میلی مولار، فنیل متان سولفونیل فلورید (PMSF) ۱ میلی مولار و پلی وینیل پیرولیدون (PVP) ۱ درصد بود. از عصاره به دست آمده جهت سنجش پروتئین کل و فعالیت آنزیم ها استفاده گردید. جهت سنجش مقدار پروتئین کل از روش Bradford (۱۹۷۶) استفاده شد.

سنجش پرولین: جهت سنجش میزان پرولین بافت گیاهی از روش Bates (۱۹۷۵) استفاده شد. ۰/۰۲ گرم از بافت فریز شده در محلول ۳ درصد سولفوسالسیلیک اسید سائیده و عصاره حاصل به مدت ۵ دقیقه در $10000g$ سانتریفوژ شد. ۲ میلی لیتر از مایع رویی با ۲ میلی لیتر معرف نین هیدرین و ۲ میلی لیتر استیک اسید خالص مخلوط گردید و یک ساعت در دمای ۱۰۰ درجه سانتی گراد قرار گرفت. پس از سرد شدن لوله ها، ۴ میلی لیتر تولوئن به مخلوط اضافه گردید. جذب لایه ی رنگی فوقانی در ۵۱۸ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر تعیین شد و مقدار پرولین با منحنی استاندارد پرولین تعیین گردید.

سنجش آمینواسیدهای آزاد (FAA): میزان آمینواسیدهای آزاد به روش رنگ سنجی و با معرف نین هیدرین اندازه گیری شد. ۰/۲ گرم بافت تازه گیاهی در ۵ میلی لیتر بافر پتاسیم فسفات سرد ۵۰ میلی مولار (pH=۶/۸) سائیده شد. مخلوط حاصل به مدت ۳۰ دقیقه در 10000 دور در دقیقه سانتریفوژ گردید. از محلول رویی برای سنجش میزان آمینواسیدهای آزاد استفاده شد. یک میلی لیتر از معرف نین هیدرین ۰/۳۵ درصد به ۵ میلی لیتر عصاره سانتریفوژ در لوله آزمایش افزوده شد. جذب نمونه ها با دستگاه اسپکتروفتومتر در ۵۷۰ نانومتر خوانده شد. برای محاسبه مقدار آمینواسیدهای آزاد از منحنی استاندارد

ANOVA) بود. مقایسه میانگین داده‌ها نیز با آزمون چند دامنه‌ای دانکن با دقت ۹۵ درصد انجام گردید. جداول میانگین پارامترهای سنجش شده به صورت $\text{Mean} \pm \text{SE}$ در بخش نتایج ارائه شده‌اند.

نتایج و بحث

در این پژوهش، تنش حاصل از هر دو سطح سمی نیکل و مس موجب کاهش معنی‌دار درصد جوانه‌زنی در هر دو رقم گوجه‌فرنگی در سطح معنی‌دار پنج درصد شده است. به‌طوری که تحت سمیت توأم ۳۰۰ میکرومولار نیکل و مس، درصد جوانه‌زنی بذر تا میزان ۵۰ درصد نسبت به شاهد کاهش یافت و کاربرد همزمان دو لیگاند هیستیدین و ملات کاهش اخیر را بخوبی بهبود داد. کاربرد غلظت ۶۰۰ میکرومول هیستیدین و ۲ میلی‌مولار ملات بخوبی تأثیر مقاومت‌زای خود را در شرایط تنش ۳۰۰ میکرومولار مس و نیکل به‌ویژه در رقم ارلی اوربانا نشان داد (جدول ۲).

همچنین تیمار ۳۰۰ میکرومولار نیکل و مس موجب کاهش معنی‌دار رشد طولی ساقه در هر دو رقم گوجه‌فرنگی تحت تیمار نسبت به شاهد گردید. در حالی که میزان ۱۵۰ میکرومولار تنش حاصل از این دو کاتیون تأثیر کاهشی در رقم ارلی اوربانا نداشتند. اما کاربرد ۶۰۰ میکرومول هیستیدین با ۲ میلی‌مولار ملات به‌طور همزمان با ۳۰۰ میکرومولار نیکل و مس، موجب بهبود این شاخص در ارلی اوربانا گردید (جداول شماره ۲ و ۳). بنابراین کاهش رشد طولی اندام هوایی رقم کال‌جی تحت تنش ۱۵۰ و ۳۰۰ میکرومولار نیکل و مس، با کاربرد همزمان هیستیدین و اسید آلی ملات بهبود نیافت و همچنین اثر همزمان این دو لیگاند در این شرایط جهت جبران رشد اندام هوایی در رقم معنی‌دار نبود. غلظت ۳۰۰ میکرومولار نیکل و مس در رقم ارلی موجب کاهش رشد اندام هوایی نسبت به شاهد گردید در حالی که دو لیگاند مذکور موجب بهبود این پارامتر گردیدند. در مورد رشد طولی ریشه و وزن تر اندام هوایی و ریشه نیز شرایط مشابه بود و کاربرد لیگاندها در سطح بیشتر در تنش شدیدتر نیکل و مس تأثیر

بر گرم وزن تر محاسبه گردید.

فعالیت آنزیم کاتالاز (CAT) (EC 1.11.1.6) برگ:

سنجش فعالیت آنزیم کاتالاز با استفاده از محاسبه سرعت تجزیه و کاهش جذب H_2O_2 (کاهش مقدار H_2O_2 در ۲۴۰ نانومتر و با روش Dhindsa و همکاران (۱۹۸۱) انجام شد. فعالیت آنزیم به‌صورت واحد آنزیمی 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.

فعالیت آنزیم گایاکل پراکسیداز (GPX) (EC 1.11.1.7) برگ:

سنجش فعالیت آنزیم پراکسیداز با استفاده از گایاکل و اندازه‌گیری میزان جذب تترایاکل تشکیل‌شده از گایاکل در نتیجه فعالیت پراکسیداز، در ۴۷۰ نانومتر با روش Plewa (۱۹۹۳) انجام گرفت.

فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز (APX) (EC1.11.1.1) برگ:

سنجش فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز با استفاده از تغییرات جذب در دقیقه میزان آسکوربات برجای مانده پس از دو دقیقه انجام واکنش آنزیمی محاسبه شد و از روش Nakano و Asada (۱۹۸۱) استفاده گردید. یک واحد آنزیمی آسکوربات پراکسیداز، مقدار آنزیمی است که یک میلی‌مولار آسکوربات را در یک دقیقه اکسید می‌کند.

سنجش قندهای احیاکننده: برای سنجش میزان قندهای

احیاکننده از روش Somogy (۱۹۵۲) استفاده شد. شدت جذب محلول‌ها در طول‌موج ۶۰۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر تعیین شد و با استفاده از منحنی استاندارد گلوکز غلظت قندهای احیاکننده محاسبه گردید. نتایج بر حسب میلی‌گرم بر گرم وزن تر ارائه گردید.

تجزیه آماری و مقایسه داده‌ها: داده‌های مربوط به سه

تکرار در هر تیمار جهت پارامترهای مختلف، با نرم‌افزار SPSS 18.0 مورد تجزیه آماری قرار گرفتند. روش آماری مورد استفاده نیز به‌صورت آنالیز واریانس دوطرفه (Two-way

جدول ۲- تأثیر تیمارها بر تغییر درصد جوانه‌زنی، رشد طولی ریشه، رشد طولی اندام هوایی و وزن تر اندام هوایی در دو رقم گوجه‌فرنگی در سطح معنی‌دار ۵ درصد

ترکیب محلول تیمار		وزن تر اندام هوایی (گرم)		وزن تر ریشه (گرم)		طول ریشه (میلی‌متر)	
His (μM) + Malat (mM)	Ni ²⁺ (μM) + Cu ²⁺ (μM)	رقم کال‌جی	رقم اوربانا	رقم کال‌جی	رقم اوربانا	رقم کال‌جی	رقم اوربانا
۰ + ۰	۰ + ۰	۲/۹۶±۰/۰۳ ^{ab}	۲/۲۶±۰/۱ ^a	۱/۴۶±۰/۰۳ ^b	۱/۳۶±۰/۰۱ ^a	۱۷۸/۵±۲/۸ ^a	۱۷۲±۸/۸ ^a
۰ + ۰	۱۵۰ + ۱۵۰	۰/۴۰±۰/۰۲ ^{de}	۰/۸۹±۰/۰۱ ^c	۰/۳۰±۰/۰۱ ^d	۰/۳۷±۰/۰۳ ^f	۱۲۰±۳/۱ ^f	۱۴۹±۷/۲ ^c
۰ + ۰	۳۰۰ + ۳۰۰	۰/۲۳±۰/۰۱ ^f	۰/۵۳±۰/۰۱ ^{de}	۰/۲۱±۰/۰۱ ^{ef}	۰/۷۵±۰/۰۲ ^c	۱۳۵/۳۵±۲/۳ ^d	۱۳۲±۵/۸ ^d
۳۰۰ + ۱	۰ + ۰	۲/۷۷±۰/۰۱ ^{ab}	۱/۶۹±۰/۰۲ ^b	۱/۶۵±۰/۰۲ ^{ab}	۰/۹۲±۰/۰۱ ^b	۱۴۰/۸±۴/۳ ^c	۱۵۶±۴/۱ ^b
۳۰۰ + ۱	۱۵۰ + ۱۵۰	۰/۴۹±۰/۰۱ ^d	۰/۵۰±۰/۰۱ ^{ef}	۰/۱۵±۰/۰۱ ^{ef}	۰/۱۹±۰/۰۲ ^g	۱۳۴/۶۷±۱/۳ ^d	۱۲۳±۴/۳ ^{ef}
۳۰۰ + ۱	۳۰۰ + ۳۰۰	۰/۲۷±۰/۰۱ ^f	۰/۱۶±۰/۰۱ ^g	۰/۳۲±۰/۰۱ ^d	۰/۱۵±۰/۰۳ ^g	۱۳۰/۰۱±۴/۶ ^e	۱۴۹±۶/۱ ^c
۶۰۰ + ۲	۰ + ۰	۱/۰۴±۰/۰۱ ^c	۱/۲۲±۰/۰۱ ^{ab}	۱/۱۹±۲/۹ ^{ef}	۱۲۰/۱±۳/۶ ^f	۶۴/۶۷±۲/۵ ^{ab}	۷۶/۲±۲/۸ ^e
۶۰۰ + ۲	۱۵۰ + ۱۵۰	۲/۳۸±۰/۰۲ ^{de}	۲/۶۳±۰/۰۱ ^{ab}	۱/۷۷±۱/۷ ^f	۱۵۰/۵±۵/۸ ^b	۷۹/۴±۳/۵ ^{de}	۹۴/۸±۱/۷ ^c
۶۰۰ + ۲	۳۰۰ + ۳۰۰	۲/۰۹±۰/۰۱ ^c	۲/۱۷±۰/۰۲ ^b	۱/۷۵±۵/۱ ^a	۱۷۹/۴±۲/۷ ^a	۱۰۱±۴/۸ ^{ab}	۵۴/۳±۲/۱ ^f

حروف متفاوت بیانگر اختلاف معنی‌دار میانگین‌ها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در روش مقایسه میانگین هستند. اعداد به صورت Mean±SE می‌باشند.

ادامه جدول ۲-

ترکیب محلول تیمار		طول اندام هوایی (میلی‌متر)		جوانه‌زنی بذر (%)	
His (μM) + Malat (mM)	Ni ²⁺ (μM) + Cu ²⁺ (μM)	رقم کال‌جی	رقم اوربانا	رقم کال‌جی	رقم اوربانا
۰ + ۰	۰ + ۰	۱۱۸/۷±۵/۲ ^{ab}	۷۵/۲۵±۳/۵ ^{de}	۸۹±۳/۱۴ ^{ab}	۹۵±۲/۰۵ ^{ab}
۰ + ۰	۱۵۰ + ۱۵۰	۹۱/۵±۳/۵ ^{de}	۹۱/۶۷±۲/۱ ^c	۵۵±۲/۱۱ ^e	۵۷±۲/۱۱ ^e
۰ + ۰	۳۰۰ + ۳۰۰	۶۶/۳±۱/۸ ^{ef}	۸۵/۳۳±۲/۶ ^{ab}	۴۰±۱/۰۵ ^f	۴۴±۱/۱۱ ^f
۳۰۰ + ۱	۰ + ۰	۱۱۷/۵±۲/۶ ^{ab}	۱۲۴/۵±۱/۸ ^a	۸۸±۰/۰۵ ^{ab}	۷۵±۳/۱۴ ^{cd}
۳۰۰ + ۱	۱۵۰ + ۱۵۰	۱۰۰/۸±۵/۴ ^{ab}	۹۵/۶۷±۳/۶ ^{bc}	۶۵±۱/۱۱ ^d	۸۹±۲/۱۱ ^b
۳۰۰ + ۱	۳۰۰ + ۳۰۰	۱۲۱/۳±۱/۵ ^{ab}	۷۵/۲۵±۴/۱ ^{ab}	۶۴±۲/۵۵ ^d	۶۹±۲/۳۵ ^d
۶۰۰ + ۲	۰ + ۰	۷۶/۲±۲/۸ ^e	۶۴/۶۷±۲/۵ ^{ab}	۸۷±۱/۰۵ ^{ab}	۸۲±۲/۱۱ ^c
۶۰۰ + ۲	۱۵۰ + ۱۵۰	۹۴/۸±۱/۷ ^c	۷۹/۴±۳/۵ ^{de}	۸۰±۳/۴۸ ^c	۸۷±۳/۵۳ ^{bc}
۶۰۰ + ۲	۳۰۰ + ۳۰۰	۵۴/۳±۲/۱ ^f	۱۰۱±۴/۸ ^{ab}	۷۹±۳/۱۴ ^c	۸۵±۲/۰۵ ^{bc}

حروف متفاوت بیانگر اختلاف معنی‌دار میانگین‌ها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در روش مقایسه میانگین هستند. اعداد به صورت Mean±SE می‌باشند.

گزارتر بودند (جداول شماره ۲ و ۳).
 مقادیر سمی نیکل موجب کاهش حجم، چروکیدگی و در نهایت مرگ سلول‌ها از طریق جایگزینی با یون‌های مهمی مانند یونی با نیکل و اثرات آنتاگونیستی آن است (Sharma and Bhardwaj, 2008; Thauer, 2001; Mittler, 2002).

جدول ۳- تأثیر تیمارها بر تغییر محتوای کلروفیل‌های a، b، کل و کارتنوئیدها در برگ دو رقم گوجه‌فرنگی در سطح معنی‌دار ۵ درصد

ترکیب محلول تیمار		کلروفیل a (میکروگرم/گرم وزن تر)		کارتنوئیدها (میکروگرم/گرم وزن تر)	
Ni ²⁺ (μM) + Cu ²⁺ (μM)	His (μM) + Malat (mM)	رقم کال‌جی	رقم اوربانا	رقم کال‌جی	رقم اوربانا
۰ + ۰	۰ + ۰	۳۵/۳۶±۱/۸ ^{ab}	۳۱/۶±۱/۴ ^c	۱۰/۱۵±۰/۰۳ ^a	۹/۱۷±۰/۰۴ ^{ab}
۱۵۰ + ۱۵۰	۰ + ۰	۲۳/۵۶±۱/۵ ^e	۱۷/۰۱±۱/۴ ^h	۷/۱۴±۰/۰۴ ^{ef}	۴/۵۷±۰/۰۲ ^d
۳۰۰ + ۳۰۰	۰ + ۰	۲۶/۲۶±۰/۶ ^{cd}	۲۸/۰۶±۱/۱ ^{de}	۸/۵۶±۰/۰۳ ^{cd}	۸/۵۴±۰/۰۴ ^{bc}
۰ + ۰	۳۰۰ + ۱	۳۴/۱۶±۱/۱ ^{ab}	۳۴/۰۸±۱/۹ ^{ab}	۹/۱۸±۰/۰۶ ^{ab}	۱۰/۰۸±۰/۰۲ ^a
۱۵۰ + ۱۵۰	۳۰۰ + ۱	۲۰/۰۶±۰/۵ ^{ab}	۱۳/۵۱±۰/۶ ⁱ	۵/۵۰±۰/۰۳ ^h	۳/۵۳±۰/۰۴ ^d
۳۰۰ + ۳۰۰	۳۰۰ + ۱	۱۹/۲۹±۰/۳ ^f	۳۴/۸۴±۰/۹ ^{ab}	۷/۱۷±۰/۰۴ ^{ef}	۸/۱۶±۰/۰۳ ^b
۰ + ۰	۶۰۰ + ۲	۲۸/۲۵±۱/۳ ^{cd}	۳۱/۹۸±۰/۹ ^d	۷/۷۰±۰/۰۲ ^{ef}	۹/۹۴±۰/۰۳ ^a
۱۵۰ + ۱۵۰	۶۰۰ + ۲	۲۳/۲۶±۰/۴ ^e	۱۹/۰۶±۰/۴ ^g	۶/۷۸±۰/۰۳ ^g	۵/۳۳±۰/۰۴ ^d
۳۰۰ + ۳۰۰	۶۰۰ + ۲	۲۹/۴±۰/۸ ^f	۲۱/۰۴±۱/۲ ^f	۷/۸۰±۰/۰۴ ^{ef}	۳/۴۷±۰/۰۲ ^e

حروف متفاوت بیانگر اختلاف معنی‌دار میانگین‌ها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در روش مقایسه میانگین هستند. اعداد به صورت Mean±SE می‌باشند.

ادامه جدول ۳-

ترکیب محلول تیمار		کلروفیل کل (میکروگرم/گرم وزن تر)		کلروفیل b (میکروگرم/گرم وزن تر)	
Ni ²⁺ (μM) + Cu ²⁺ (μM)	His (μM) + Malat (mM)	رقم کال‌جی	رقم اوربانا	رقم کال‌جی	رقم اوربانا
۰ + ۰	۰ + ۰	۲۵/۲۱±۱/۳ ^a	۲۲/۴۸±۱/۶ ^{ab}	۴/۴۸±۰/۲۷ ^a	۳/۶۲±۰/۱۳ ^c
۱۵۰ + ۱۵۰	۰ + ۰	۱۶/۴۲±۰/۸ ^{cd}	۱۲/۴۳±۰/۸ ^e	۱/۷۸±۰/۰۸ ^g	۲/۵۱±۰/۱۴ ^f
۳۰۰ + ۳۰۰	۰ + ۰	۱۷/۷۰±۰/۹ ^{cd}	۱۹/۵۲±۱/۱ ^{cd}	۴/۷۵±۰/۲۱ ^a	۴/۱۵±۰/۲۱ ^{ab}
۰ + ۰	۳۰۰ + ۱	۲۴/۹۸±۱/۱ ^a	۲۴/۰±۱/۷ ^{ab}	۴/۳۵±۰/۲۲ ^b	۳/۶۹±۰/۱۶ ^c
۱۵۰ + ۱۵۰	۳۰۰ + ۱	۱۴/۵۶±۰/۳ ^e	۹/۹۷±۰/۶ ^f	۳/۴۸±۰/۱۱ ^b	۲/۲۶±۰/۱۳ ^f
۳۰۰ + ۳۰۰	۳۰۰ + ۱	۱۲/۱۱±۰/۶ ^e	۲۶/۶۸±۱/۹ ^{ab}	۲/۸۵±۰/۱۲ ^{de}	۴/۵۸±۰/۱۷ ^{ab}
۰ + ۰	۶۰۰ + ۲	۲۰/۵۵±۱/۳ ^b	۲۲/۰۴±۱/۳ ^{ab}	۳/۸۰±۰/۱۸ ^c	۳/۱۷±۰/۱۵ ^{de}
۱۵۰ + ۱۵۰	۶۰۰ + ۲	۱۶/۴۷±۰/۵ ^{cd}	۱۳/۷۳±۰/۵ ^e	۳/۷۲±۰/۱۱ ^c	۲/۶۵±۰/۱۴ ^f
۳۰۰ + ۳۰۰	۶۰۰ + ۲	۲۲/۲۳±۰/۳ ^{bc}	۱۷/۵۲±۰/۴ ^{cd}	۲/۳۳±۰/۱۵ ^f	۵/۲۸±۰/۲۸ ^a

حروف متفاوت بیانگر اختلاف معنی‌دار میانگین‌ها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در روش مقایسه میانگین هستند. اعداد به صورت Mean±SE می‌باشند.

Xu et al., 2006; Srivastava et al., 2006; Tewari et al., 2006). این تأثیرات نامطلوب مس و نیکل بر بیشتر پارامترهای این تحقیق تأثیر گذاشته که در ادامه نیز بیان شده است. در حالی که کاربرد دو لیگاند مورد تحقیق، موجب بهبود

در مورد مس نیز شرایط مشابه بوده و تجمع زیاد مس در سلول از طریق ناقل‌های یونی پروتئینی مربوطه، موجب اختلال تغذیه‌ای و تأثیر سمی آن بر غشا نیز می‌گردد و در نتیجه تنش اکسیداتیو رخ داده و چربی‌های غشا نیز پراکسیده می‌شوند

پارامترهای رشد و کاهش تنش اکسیداتیو شدند (جداول شماره ۲ و ۳).

به طور کلی میزان تأثیر تنش نیکل بستگی به شرایط مختلف محیطی، مرحله رشد گیاه و تنوع ژنتیکی گیاه (گونه و رقم گیاهی) دارد (Sharma and Bhardwaj, 2008; Thauer, 2001; Mittler, 2002). جذب و تجمع مقادیر بیش از نیاز نیکل توسط گیاهان، موجب تقابل نیکل با بسیاری از ترکیبات مهم سلولی شده و در نتیجه اختلال در متابولیسم طبیعی، رشد مورفولوژیک گیاه، آسیب‌های سلولی، مرگ بافت‌های گیاهی و حتی کل گیاه رخ می‌دهد. بر طبق مطالعات مختلف حداقل سه پدیده در گیاه نقش اساسی در جهت بروز آثار سمیت فلزات سنگینی مانند نیکل و مس در گیاهان دارند. این سه پدیده عبارتند از: الف) جایگزینی نیکل در ترکیبات آلی مهم گیاه به جای عناصر تغذیه‌ای دیگر ب) بازدارندگی گروه‌های فعال و عملکردی مولکول‌های مهم گیاهی توسط نیکل ج) تغییر ساختار و فعالیت حیاتی پروتئین‌ها، آنزیم‌ها، غشاها و ناقل‌های غشایی به دلیل حضور و تجمع نیکل هستند. این موضوع در داده‌های به دست آمده این تحقیق نیز بخوبی مشاهده شد (جداول شماره ۱ تا ۶).

مس نیز تأثیر سمی خود را بر ساختار کلروفیل، کلروپلاست و شاخص‌های فیزیولوژیک گیاهان نشان داده است (Panou-Filothou et al., 2001). این تغییرات ناشی از سمیت مس و نیکل موجب کاهش رشد و جوانه‌زنی در گیاهان می‌شود (Sigel et al., 2007; Baker et al., 2000; Nieminen, 2004). باندشدن کاتیون‌های فلزات سنگینی مانند نیکل و مس با مولکول لیگاندهای مختلف مانند ملات و هیستیدین، بر جذب نیکل آزاد توسط گیاهان تأثیر گذاشته و سمیت نیکل را در گیاهان به طور نسبی کاهش می‌دهد و رشد گیاه را بهبود می‌بخشد (Xu et al., 2009; Wu et al., 2007).

نتایج این تحقیق نیز نشان داد که تنش نیکل و مس در غلظت ۱۵۰ و ۳۰۰ میکرومولار موجب کاهش معنی‌دار (در سطح ۵ درصد) رنگیزه‌های برگ مانند کلروفیل a در هر دو رقم گوجه‌فرنگی نسبت به شاهد گردید. اما این موضوع در

رقم کال‌جی مشهودتر بود و تیمار ۱۵۰ میکرومولار تنش توأم نیکل و مس، موجب کاهش معنی‌دار ۴۵ درصدی کلروفیل a و کل در رقم کال‌جی گردید (جدول ۳). کاربرد ترکیب لیگاندی حاوی ۶۰۰ میکرومول هیستیدین با ۲ میلی‌مولار ملات، موجب بهبود معنی‌دار ۳۱ درصدی کلروفیل a در رقم کال‌جی گوجه‌فرنگی تحت تنش ۳۰۰ میکرومولار نیکل و مس شد. اما در رقم ارلی‌اوربانا تأثیر چندان لیگاندها در بهبود رنگیزه‌ها به ویژه کلروفیل a مشاهده نگردید و می‌توان بیان کرد که در رقم ارلی‌اوربانا فرایند حفظ رنگیزه‌های برگ نسبت به تنش نیکل و مس مقاومت نشان داده‌اند (جدول ۳).

در تیمار توأم ۱۵۰ میکرومولار سولفات نیکل و مس کاهش قابل توجهی در میزان کارتنوئیدها در هر دو رقم به ویژه کال‌جی (۶۰٪ کاهش) تحت ۱۵۰ میکرومولار تنش نسبت به شاهد مشاهده شد. کاربرد ترکیب توأم لیگاندها به میزان ۶۰۰ میکرومولار هیستیدین و ۲ میلی‌مولار ملات موجب افزایش کارتنوئیدهای برگ شد (جدول ۴). بنابراین تأثیر تنش‌زای نیکل و مس بر کارتنوئیدها در رقم ارلی‌اوربانا چندان چشمگیر نبود اما تأثیر لیگاندها تحت تنش موجب تجمع بیشتر کارتنوئیدها در رقم کال‌جی گردید (جدول ۴).

آنزیم‌ها و پروتئین‌های گیاهی دارای گروه‌های فعالی هستند که به آسانی با نیکل اتصال یافته و در نتیجه فعالیت حیاتی آنها از دست می‌رود. یون دو ظرفیتی نیکل دارای خاصیت واکنش‌پذیری نسبتاً بالایی با گروه‌های مختلف پروتئین‌ها است. بنابراین تحت تنش نیکل افزایش تولید رادیکال‌های مختلف پراورژی و القا تنش اکسیداتیو (Thauer, 2001; Sirko et al., 2004)، بروز کلروزگی، نکروزگی، بازدارندگی رشد ریشه و ساقه و همچنین کاهش در سطح برگ گیاهان تحت تنش مشاهده شده است (Yan et al., 2008). با توجه به تأثیر نیکل اضافی بر ساختار کلروپلاستی، این تأثیرها در مورد مس نیز مشاهده است که به صورت توأم با نیکل بر گیاه تأثیر منفی می‌گذارد و تجمع رنگیزه‌ها را کاهش می‌دهد. کاربرد لیگاندها توانست این تغییرات را بهبود دهد که در تحقیق حاضر نیز این موضوع مشاهده گردید (Panou-Filothou et al., 2001;)

جدول ۴- تأثیر تیمارهای آزمایش بر تغییر میانگین سطح برگ، محتوای پرولین و FAA در دو رقم گوجه‌فرنگی در سطح معنی‌دار ۵ درصد

ترکیب محلول تیمار		محتوای پرولین		محتوای FAA		سطح برگ	
(میلی گرم/گرم وزن تر)		(میلی گرم/گرم وزن تر)		(میلی گرم/گرم وزن تر)		(سانتی متر مربع)	
His (μM) + Malat (mM)	Ni ²⁺ (μM) + Cu ²⁺ (μM)	رقم کال‌جی	رقم اوربانا	رقم کال‌جی	رقم اوربانا	رقم کال‌جی	رقم اوربانا
۰ + ۰	۰ + ۰	۱۱/۱۳±۰/۴۴ ^{ef}	۱۴/۳۲±۰/۷۵ ^c	۱/۸۴±۰/۰۴ ^c	۲/۲۷±۰/۱۳ ^{bc}	۱۰/۰۹±۰/۵۵ ^{ab}	۸/۲۲±۰/۴۱ ^{bc}
۰ + ۰	۱۵۰ + ۱۵۰	۱۸/۶۰±۰/۹۰ ^d	۱۴/۲±۰/۶۵ ^c	۶/۳۰±۰/۰۳ ^e	۵/۴۰±۰/۰۱ ^f	۸/۱۲±۰/۴۳ ^{cd}	۵/۵۶±۰/۴۴ ^f
۰ + ۰	۳۰۰ + ۳۰۰	۱۷/۳۱±۰/۷۷ ^d	۱۷/۰۷±۰/۶۶ ^b	۸/۸۰±۰/۰۵ ^c	۶/۹۸±۰/۰۶ ^d	۳/۳۶±۰/۱۲ ^h	۴/۸۲±۰/۴۲ ^f
۳۰۰ + ۱	۰ + ۰	۸/۹۸±۰/۴۱ ^g	۸/۷۸±۰/۴۱ ^e	۰/۶۹±۰/۰۱ ^g	۴/۷۸±۰/۲۳ ^a	۶/۰۳±۰/۳۵ ^{ef}	۸/۵۷±۰/۳۹ ^{bc}
۳۰۰ + ۱	۱۵۰ + ۱۵۰	۲۸/۰۶±۱/۰۱ ^c	۱۶/۱۵±۰/۸۲ ^b	۲/۲۰±۰/۱۴ ^b	۱/۲۶±۰/۰۸ ^e	۶/۲۳±۰/۳۶ ^{ef}	۹/۶۰±۰/۴۷ ^{ab}
۳۰۰ + ۱	۳۰۰ + ۳۰۰	۳۷/۹۶±۱/۹۳ ^a	۲۵/۹۸±۱/۰۹ ^a	۴/۵۳±۰/۲۳ ^a	۲/۹۱±۰/۱۱ ^{bc}	۸/۱۲±۰/۴۱ ^{cd}	۶/۶۷±۰/۴۱ ^e
۶۰۰ + ۲	۰ + ۰	۱۰/۸±۰/۵۲ ^{ef}	۸/۲۷±۰/۳۳ ^e	۱/۶۶±۰/۰۸ ^d	۱/۹۱±۰/۰۵ ^d	۱۰/۷±۰/۵۳ ^{ab}	۷/۶۳±۰/۳۶ ^d
۶۰۰ + ۲	۱۵۰ + ۱۵۰	۳۰/۷۹±۱/۱۷ ^b	۱۳/۶۷±۰/۵۶ ^{cd}	۲/۱۶±۰/۱۲ ^b	۲/۲۰±۰/۱۴ ^{bc}	۸/۲۷±۰/۴۱ ^{cd}	۷/۸۸±۰/۳۳ ^d
۶۰۰ + ۲	۳۰۰ + ۳۰۰	۱۱/۱۳±۰/۶ ^{ef}	۱۹/۸۷±۰/۸۹ ^{bc}	۱/۱۹±۰/۰۱ ^f	۲/۶۶±۰/۰۶ ^{bc}	۵/۷۷±۰/۲۹ ^g	۱۵/۸۸±۰/۲۸ ^a

حروف متفاوت بیانگر اختلاف معنی‌دار میانگین‌ها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در روش مقایسه میانگین هستند. اعداد به صورت Mean±SE می‌باشند.

(Mostofa et al., 2015) (جدول ۴).

کاربرد دو لیگاند هیستیدین و ملات موجب شد تا در غلظت‌های ۱۵۰ و ۳۰۰ میکرومولار تنش توأم نیکل و مس، میزان سطح برگ به بیش از شاهد در رقم ارلی اوربانا برسد. به‌طوری که تحت شرایط سمی همزمان ۳۰۰ میکرومولار مس و نیکل که از لیگاندهای ۶۰۰ میکرومولار هیستیدین و ۲ میلی‌مولار ملات استفاده گردید، میزان سطح برگ به دو برابر شاهد در رقم ارلی اوربانا افزایش یافت (جدول ۴). در همین شرایط، در رقم کال‌جی تحت تأثیر لیگاندها تغییر سطح برگ قابل‌توجه نبود و فقط در شرایط بدون تنش، تأثیر لیگاندها حاوی ۶۰۰ میکرومولار هیستیدین و ۲ میلی‌مولار ملات موجب افزایش سطح برگ در رقم کال‌جی گردید (جدول ۴). بنابراین پاسخ‌دهی دو رقم به تیمارها در این تحقیق با هم یکسان نبود و تفاوت‌های چشمگیری مشاهده شد (جدول ۴). به‌طور کلی، بررسی نتایج حاصل از سنجش پارامترهای رشد و مورفولوژیک شامل سطح برگ، رشد طولی، وزن تر و وزن خشک ریشه و ساقه در این تحقیق نشان داد که به‌طور کلی تنش توأم نیکل و مس در هر دو سطح ۱۵۰ و ۳۰۰

میکرومولار موجب کاهش معنی‌داری شاخص‌های رشدی مانند رشد طولی ریشه و اندام هوایی نسبت به شاهد گردید. این موضوع بخوبی در رقم کال‌جی به‌استثنا پارامتر سطح برگ مشهود بود (جدول ۴). نتایج حاصل از رشد طولی ریشه و ساقه نشان داد که اثر همزمان ملات و هیستیدین به‌ویژه در سطح تنش توأم ۳۰۰ میکرومولار نیکل و مس، موجب بهبود و افزایش رشد طولی اندام‌های آسیب‌دیده از تنش می‌گردد (جدول ۲ و ۳).

رشد طولی ریشه بیش از اندام هوایی تحت تأثیر تنش نیکل و مس قرار می‌گیرد (Armengaud et al., 2004; Mostofa et al., 2015). در گیاهانی که نیکل و مس را در ریشه خود تجمع می‌دهند، رشد ریشه نسبت به اندام هوایی بیشتر بازداشته می‌شود و بنابراین شاخص رشد ریشه جهت ارزیابی سمیت بسیاری از فلز سنگین مانند نیکل و مس حائز اهمیت است (Sharma and Bhardwaj, 2008; Mostofa et al., 2015). گزارش شده است. تیمار نهال‌های گندم با ۲۰۰ میکرومولار نیکل موجب کاهش رشد ریشه شده است و تیمار نهال‌های گندم با نیکل اضافی، موجب تجمع سریع نیکل در

بافت ریشه شده است (Ahonen-Jonnarh *et al.*, 2004). البته در پژوهشی دیگر کاربرد ۱۰ میکرومولار نیکل، موجب تغییر معنی‌داری در رشد طولی نهال‌ها نشد (Sofa *et al.*, 2004). اما تیمار ۱۰۰ میکرومولار نیکل موجب کاهش معنی‌دار رشد طولی ریشه گیاه شب‌بو در مقایسه با شاهد شده است (Volbeda and Fontecilla-Camps, 2005). نتایج تحقیق حاضر با این تحقیقات تطابق دارد و تیمارهای مس و نیکل موجب کاهش رشد طولی ریشه گردیدند (جدول ۲).

مطالعات مختلف نشان داده‌اند که فلزات سنگین به‌ویژه نیکل در سطوح سلولی، اندام‌ها و کل گیاه بر رشد تأثیرگذار هستند (Adriano, 2001; Lukin *et al.*, 2003). در برخی از تحقیقات دیگر اثر تنش نیکل بر رشد ساقه گیاهان مختلف ارزیابی شده است و می‌توان براساس چنین تحقیقاتی رابطه بین تنش نیکل و رشد ساقه را جستجو نمود. در تحقیقی، تأثیر ۱۰۰ میکرومولار سولفات نیکل II بر اندام هوایی گندم بررسی شده است و این مقدار اضافی نیکل موجب کاهش سطح برگ و ضخامت بافت مزوفیل برگ، اندازه دستجات آوندی ساقه و عرض سلول‌های اپیدرمی ساقه شده است. همچنین در تحقیق جداگانه دیگر بر نهال‌های گندم، تنش ۲۰۰ میکرومولار نیکل موجب کاهش رشد طولی ساقه گردید (Roitto *et al.*, 2005). در نهال‌های سویا تحت تیمارهای بیش از ۵۰ میکرومولار هم کاهش در وزن خشک و تر اندام هوایی مشاهده شده است (Seregin and Kozhevnikova, 2006). تحقیق دیگر نشان داده است که غلظت ۱۰۰ میکرومولار نیکل موجب کاهش رشد اندام هوایی گندم و ظهور علائم کلروزگی و نکروزگی در اندام هوایی گیاهان تحت تنش نیکل شده است (Sigel *et al.*, 2007). در تحقیقات مختلف، رشد ساقه به‌عنوان یک شاخص عمومی رشد گیاه محسوب می‌شود که توسط نیکل و بسیاری از فلزات سنگین دیگر بازداشته می‌شود. بازدارندگی رشد ساقه و برگ توسط نیکل به‌علت بی‌نظمی متابولیکی حاصل از تجمع نیکل آزاد در درون گیاه و توقف سریع تقسیم سلولی است (Sigel *et al.*, 2007). یافته‌های این پژوهش نیز با این موضوع تطابق دارد (جدول ۲).

تنش نیکل و مس تجمع پرولین و اسیدآمینو آزاد را در اندام هوایی با الگوی مشابه افزایش داده است. در رقم کال‌جی میزان ۱۵۰ و ۳۰۰ میکرومولار نیکل و مس بدون کاربرد لیگاند به‌ترتیب موجب افزایش شش و هشت برابری محتوای پرولین اندام هوایی نسبت به شاهد گردید. همچنین میزان افزایش تجمع پرولین در اندام هوایی رقم ارلی اوربانا نیز تحت همین شرایط به حدود سه و چهار برابر شاهد رسید. این موضوع در مورد تجمع FAA نیز صادق بود، اما میزان افزایش به این شدت نبود. کاربرد لیگاندهای ۶۰۰ میکرومولار هیستیدین + ۲ میلی‌مولار ملات موجب کاهش میزان پرولین و حتی میزان اسید آمینه‌ها تقریباً برابر با مقدار شاهد بود (جدول ۴).

لیگاندها نقش فیزیولوژیکی و تغذیه‌ای مهمی در متابولیسم و مقاومت به تنش‌های محیطی در گیاهان دارد. این مواد آلی در فرایندهایی مانند حفظ تمامیت ساختمانی و عملکرد غشاهای سلولی، تثبیت ساختمان دیواره سلول و تنظیم انتقال یون و کنترل رفتار تبادل یونی ضروری در شرایط تنش است. شواهد زیادی وجود دارد مبنی بر اینکه لیگاندها نقش اساسی در فعالیت غشاهای بیولوژیکی دارد. ذخیره لیگاندها در دیواره سلولی موجب حفظ غشا شده و از بهم ریختگی ساختمان سه بعدی غشا جلوگیری می‌کند (Andersen *et al.*, 2002b). عواملی مانند وجود لیگاندها در خاک و اسیدیته مناسب می‌توانند بر جذب فلزات سنگین توسط گیاهان عالی تأثیر داشته باشند (Armengaud *et al.*, 2004; Baker *et al.*, 2000). لیگاندهای مختلف موجب فعال‌شدن آنزیم‌های گیاهی مرتبط با مسیرهای متابولیکی بیوستز و تجزیه اسیدآمینوهای آزاد مانند پرولین می‌گردد (Alam *et al.*, 2007). لیگاندها اساساً آنزیم‌های متصل‌شده به غشا را نیز فعال می‌کنند. به‌طوری که این فعالیت، توسط ساختمان غشا تنظیم می‌شود. همچنین لیگاندها از فعالیت بعضی آنزیم‌های سیتوپلاسمی و متابولیکی جلوگیری می‌کنند. کالمودولین (یک پروتئین باندشونده به لیگاندها) برای تنظیم بسیاری از آنزیم‌های در انسان و حیوان بسیار مهم است (Xu *et al.*, 2009; Wu *et al.*, 2007). شواهد زیادی وجود دارد که نشان می‌دهد این پروتئین

آلدئیدها در شرایط ۳۰۰ میکرومولار تنش نیکل و مس شدند و اثرات مقاومت‌زایی خود را در مورد این شاخص اکسیداتیوی نشان دادند (جدول ۵ و ۶).

ایجاد تنش اکسیداتیو در سلول از طریق یون- لیگاندها می‌تواند تعدیل شود (Murphy, 1999). در نتیجه مقاومت سلول به این تنش بیشتر می‌شود. در حقیقت زمانی که سلول تحت تنش اکسیداتیو قرار می‌گیرد، اولین پاسخ سلول به این تنش تغییر غلظت لیگاندها سیتوسولی و لیگاندها سایر اندامک‌های سلولی است (Zhang et al., 2008). در این پژوهش نیز تأثیر تیمارهای تنش‌زا بر میزان فعالیت کاتالاز افزایشی بود و این موضوع به‌خصوص در مورد تأثیر نیکل و مس بر اندام هوایی صحیح است و نشان‌دهنده القا تنش اکسیداتیو در دو رقم گوجه‌فرنگی توسط نیکل و مس است (جدول ۶). در دو رقم کال‌جی و ارلی اوربانا غلظت ۳۰۰ میکرومولار نیکل و مس به‌ترتیب موجب افزایش پنج و دو برابری فعالیت این آنزیم نسبت به شاهد در اندام هوایی گردیدند، در حالیکه تیمار نیکل و مس حاوی لیگاندها در این ارقام تأثیر معنی‌داری بر کاهش فعالیت کاتالاز داشت (جدول ۶). بنابراین تأثیر همزمان هیستیدین و اسید آلی مالات بر کاهش تنش اکسیداتیو در هر دو رقم در شرایط سمیت نیکل و مس بخوبی مشاهده و ثابت گردید (جدول ۵ و ۶).

با توجه به این نتایج، به‌طور کلی گیاهان دارای مکانیسم‌های متفاوتی برای مقاومت به تنش اکسیداتیو هستند و کاربرد لیگاندها می‌تواند برخی از این مکانیسم‌ها را به‌ویژه در تغییر محتوای ترکیبات سیکل‌گلوکاتیون- آسکوربات تقویت کند و اثرات تنش اکسیداتیو را بهبود بخشد (Yusuf et al., 2011; Quinn et al., 2003).

در هنگام القا تنش اکسیداتیو، فعالیت کانال‌های یونی تغییر زیادی از خود نشان می‌دهند (Kidd et al., 2001) و موجب افزایش کاتیون‌های سیتوسولی می‌شوند. به‌طوری که کانال‌های موجود در غشا سیتوسولی و شبکه آندوپلاسمی تحت این تنش فعال شده و باعث افزایش میزان کاتیون‌های سیتوپلاسم می‌شوند. این کانال‌ها به‌عنوان کانال مربوط به اینوزیتول تری

نقش اساسی در تنظیم لیگاندها داخل سلولی و آنزیم‌ها در گیاهان دارد. همچنین این نکته پذیرفته شده است که کالمودونین در انتقال لیگاندها به واکوئل‌ها نقش اساسی دارد (Andersen et al., 2002a; Pearce and Sherman, 1999). سمیت‌زدایی فلز سنگین توسط لیگاندها و کاهش اثرات نیکل و مس موجب کاهش پرولین و اسیدآمین‌های آزادشده و گیاه را از شرایط تنش خارج می‌کند که در این تحقیق نیز مشاهده شد (جدول ۴).

تأثیر مقادیر اضافی نیکل و مس بر افزایش تجمع پروتئین در هر دو رقم مشهود بود اما در رقم کال‌جی درصد افزایش ۲/۵ برابر نسبت به شاهد ثبت شد. در این رقم تأثیر ۳۰۰ میکرومولار هیستیدین و ۱ میلی‌مولار مالات در جهت افزایش تجمع پروتئین در رقم کال‌جی چشمگیر بود. همچنین تحت تنش ۳۰۰ میکرومولار نیکل و مس، کاربرد همزمان هیستیدین و مالات موجب افزایش پروتئین نسبت به شرایط تنش نیکل و مس گردید و میزان پروتئین کل حتی از نمونه‌های شاهد بیشتر بود (جدول ۵). البته تحت تنش ۱۵۰ میکرومولار مس و نیکل، کاربرد ۱+۳۰۰ هیستیدین و مالات موجب کاهش پروتئین گردید. در رقم ارلی اوربانا نیز از لحاظ تأثیرگذاری تیمارها وضعیت تقریباً متفاوت از رقم قبلی است. سطوح سمی نیکل و مس باعث تجمع پروتئین گردید و کاربرد لیگاندها موجب کاهش آن شد (جدول ۵).

جهت بررسی القا تنش اکسیداتیو تحت مقادیر سمی مس و نیکل و تعدیل آن توسط لیگاندها، نتایج مربوط به آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان و پراکسیداسیون غشا در بین تیمارها از لحاظ آماری مقایسه گردید. نتایج نشان داد که تنش نیکل و مس در هر دو سطح ۱۵۰ و ۳۰۰ میکرومولار موجب ایجاد تنش اکسیداتیو و در نتیجه افزایش معنی‌دار آب‌اکسیژنه، MDA و سایر آلدئیدها در هر دو رقم گوجه‌فرنگی مورد مطالعه گردید (جدول ۵ و ۶). این نتایج نشان می‌دهد که سطح سمی نیکل و مس اعمال‌شده بر گیاهان گوجه‌فرنگی، موجب القا تنش اکسیداتیو شده است. کاربرد همزمان هیستیدین و مالات به‌ویژه در رقم ارلی اوربانا، موجب کاهش آب‌اکسیژنه و MDA، سایر

جدول ۵- تأثیر تیمارهای آزمایش بر تغییر میانگین MDA، سایر آلدئیدها، تجمع آب اکسیژنه و قندهای احیاکننده در دو رقم گوجه‌فرنگی در سطح معنی‌دار ۵ درصد

ترکیب محلول تیمار		میزان قندهای احیاکننده		تجمع آب اکسیژنه	
		(میلی‌گرم/گرم وزن تر)		(میکرومول/گرم وزن تر)	
His (μM) + Malat (mM)		رقم کال‌جی	رقم اوربانا	رقم کال‌جی	رقم اوربانا
Ni ²⁺ (μM) + Cu ²⁺ (μM)					
۰ + ۰	۰ + ۰	۴۸/۳±۱ ^g	۵۱/۲±۲ ^f	۹/۵±۱/۲ ^h	۱۰/۴±۰/۵۸ ^h
۱۵۰ + ۱۵۰	۰ + ۰	۴۵/۲±۳ ^g	۱۵۴/۵±۴ ^c	۱۱/۲±۰/۹۱ ^h	۱۰/۸±۰/۶۶ ^h
۳۰۰ + ۳۰۰	۰ + ۰	۲۴۶/۱±۱۱ ^a	۲۵۲/۲±۱۰ ^a	۱۸/۱۱±۱/۱۵ ^{gh}	۱۸/۱۵±۰/۸۷ ^{gh}
۰ + ۰	۳۰۰ + ۱	۶۸/۵±۳ ^{de}	۶۰/۱±۲ ^e	۳۱/۸۳±۲/۸۱ ^f	۲۲/۹۴±۱/۲ ^{gh}
۱۵۰ + ۱۵۰	۳۰۰ + ۱	۱۶۲/۸±۷ ^b	۱۵۱/۱±۴ ^{bc}	۱۲۲/۳۵±۴/۷۵ ^{ab}	۱۱۳/۹±۱/۰۱ ^a
۳۰۰ + ۳۰۰	۳۰۰ + ۱	۱۴۷/۹±۸ ^c	۱۵۴/۹±۳ ^{bc}	۹۰/۳۱±۲/۶۸ ^{bc}	۹۲/۸۴±۵/۸ ^b
۰ + ۰	۶۰۰ + ۲	۵۵/۸±۱ ^f	۴۹/۳±۳ ^f	۶۵/۵۷±۲/۷ ^{de}	۶۰/۶۳±۳/۴ ^{de}
۱۵۰ + ۱۵۰	۶۰۰ + ۲	۶۰/۸±۳ ^e	۴۹/۳±۲ ^f	۹/۹۴±۱/۶۷ ^{gh}	۱۰/۳±۴/۳ ^{hi}
۳۰۰ + ۳۰۰	۶۰۰ + ۲	۱۰۹/۲±۵ ^d	۱۰۱/۵±۵ ^d	۸/۵±۱/۱ ^h	۱۰/۸±۰/۱۸ ^h

حروف متفاوت بیانگر اختلاف معنی‌دار میانگین‌ها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در روش مقایسه میانگین هستند. اعداد به صورت Mean±SE می‌باشند.

ادامه جدول ۵-

ترکیب محلول تیمار		میزان سایر آلدئیدها		میزان MDA	
		(نانومول/گرم وزن تر)		(نانومول/گرم وزن تر)	
His (μM) + Malat (mM)		رقم کال‌جی	رقم اوربانا	رقم کال‌جی	رقم اوربانا
Ni ²⁺ (μM) + Cu ²⁺ (μM)					
۰ + ۰	۰ + ۰	۱/۰۵±۰/۰۵ ^{fg}	۰/۱۵±۰/۰۲ ^j	۰/۲۰±۰/۰۰ ^j	۰/۰۱۵±۰/۰ ^{fg}
۱۵۰ + ۱۵۰	۰ + ۰	۱/۱۲±۰/۰۴ ^{hi}	۱/۰۸±۰/۰۱ ^{hi}	۰/۱۳±۰/۰۱ ^{hi}	۰/۱۱±۰/۰ ^{hi}
۳۰۰ + ۳۰۰	۰ + ۰	۱/۸۵±۰/۰ ^{gh}	۱/۸۲±۰/۰ ^{gh}	۰/۱۹±۰/۰ ^{gh}	۰/۱۸±۰/۰ ^{gh}
۰ + ۰	۳۰۰ + ۱	۲/۱۸±۰/۰ ^{gh}	۲/۲۹±۰/۰ ^{gh}	۰/۳۲±۰/۰ ^f	۰/۲۳±۰/۰ ^{gh}
۱۵۰ + ۱۵۰	۳۰۰ + ۱	۱۰/۲±۰/۵۹ ^{ab}	۱۰/۴±۰/۵۲ ^a	۱/۰۲±۰/۰ ^{ab}	۱/۱۴±۰/۰ ^a
۳۰۰ + ۳۰۰	۳۰۰ + ۱	۷/۰۳±۰/۳۱ ^{bc}	۷/۲۸±۰/۳۴ ^b	۰/۸۰±۰/۰ ^{bc}	۰/۷۳±۰/۰ ^b
۰ + ۰	۶۰۰ + ۲	۶/۵۶±۰/۲۴ ^{de}	۶/۰۶±۰/۳۶ ^{de}	۰/۶۶±۰/۰ ^{de}	۰/۶۱±۰/۰ ^{de}
۱۵۰ + ۱۵۰	۶۰۰ + ۲	۲/۹۹±۰/۱۴ ^{gh}	۱/۰۳±۰/۰ ^{hi}	۰/۲۰±۰/۰ ^{hi}	۰/۱۰±۰/۰ ^{gh}
۳۰۰ + ۳۰۰	۶۰۰ + ۲	۱/۰۳±۰/۰۴ ^{fg}	۰/۱۷±۰/۰ ^j	۰/۲۵±۰/۰ ^j	۰/۰۱۶±۰/۰ ^{fg}

حروف متفاوت بیانگر اختلاف معنی‌دار میانگین‌ها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در روش مقایسه میانگین هستند. اعداد به صورت Mean±SE می‌باشند.

فسفات معروف هستند. افزایش کاتیون‌های سیتوپلاسمی توسط های از سیتوسول، سطح کاتیون‌های سلول را در حد اپتیمم نگه می‌دارند (Liao et al., 2000; Reimann et al., 1998).

ناقل و پمپ‌های دیگری کنترل می‌شوند و با خارج کردن کاتیون-

جدول ۶- تأثیر تیمارهای آزمایش بر تغییر میانگین پروتئین کل، فعالیت آنزیم‌های کاتالاز، گایاکول پراکسیداز و آسکوربات پراکسیداز در دو رقم گوجه‌فرنگی در سطح معنی‌دار ۵ درصد

فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز (U/میلی گرم پروتئین)		فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز (U/میلی گرم پروتئین)		ترکیب محلول تیمار	
رقم کال جی	رقم اوربانا	رقم کال جی	رقم اوربانا	His (μM) + Malat (mM)	Ni ²⁺ (μM) + Cu ²⁺ (μM)
۰/۶۵±۰/۰۱ ^g	۰/۱۵±۰/۲۱ ^g	۲/۰۵±۰/۱ ^g	۱/۵۴±۰/۱۱ ^g	۰ + ۰	۰ + ۰
۱/۱۲±۰/۰۵ ^f	۱/۵۸±۰/۲۱ ^e	۰/۱۲±۰/۰۵ ^h	۲/۵۰±۰/۲۲ ^f	۰ + ۰	۱۵۰ + ۱۵۰
۱/۸۱±۰/۰۶ ^e	۱/۸۱±۰/۲۱ ^e	۱۸/۱۱±۰/۹۲ ^e	۱۸/۱±۰/۹۲ ^d	۰ + ۰	۳۰۰ + ۳۰۰
۲/۱۸±۰/۰۳ ^d	۲/۲۹±۰/۲۱ ^d	۲۱/۸۳±۱/۲۲ ^d	۲۲/۹±۱/۰۱ ^c	۳۰۰ + ۱	۰ + ۰
۳/۲۲±۰/۱۴ ^c	۴/۳۹±۰/۲۱ ^c	۳۲/۲۵±۱/۰۴ ^c	۵۳/۹±۰/۲۵ ^b	۳۰۰ + ۱	۱۵۰ + ۱۵۰
۷/۳۱±۰/۳۹ ^a	۶/۲۸±۰/۲۱ ^{ab}	۵۰/۳۱±۲/۳۳ ^b	۵۲/۸±۰/۲۳ ^b	۳۰۰ + ۱	۳۰۰ + ۳۰۰
۶/۵۵±۰/۳۲ ^b	۶/۰۶±۰/۲۱ ^{ab}	۶۵/۵۷±۳/۴۳ ^a	۶۰/۶±۳/۲۸ ^a	۶۰۰ + ۲	۰ + ۰
۱/۱۹±۰/۰۸ ^f	۱/۰۳±۰/۲۱ ^f	۱۵/۹۴±۰/۴۴ ^f	۱۰/۳۲±۰/۵۷ ^e	۶۰۰ + ۲	۱۵۰ + ۱۵۰
۰/۶۶±۰/۰۲ ^g	۰/۱۶±۰/۲۱ ^g	۲/۰۵±۰/۱۷ ^g	۱/۵۴±۰/۰۸ ^g	۶۰۰ + ۲	۳۰۰ + ۳۰۰

حروف متفاوت بیانگر اختلاف معنی‌دار میانگین‌ها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در روش مقایسه میانگین هستند. اعداد به صورت Mean±SE می‌باشند.

ادامه جدول ۶-

فعالیت آنزیم کاتالاز (U/میلی گرم پروتئین)		پروتئین کل (میلی گرم / گرم وزن تر)		ترکیب محلول تیمار	
رقم کال جی	رقم اوربانا	رقم کال جی	رقم اوربانا	His (μM) + Malat (mM)	Ni ²⁺ (μM) + Cu ²⁺ (μM)
۲/۳±۰/۱۴ ^f	۴/۴۸±۰/۲۵ ^c	۵/۵۴±۰/۲۸ ^e	۴/۱۵±۰/۲۲ ^e	۰ + ۰	۰ + ۰
۶/۲±۰/۳۵ ^c	۸/۷۸±۰/۴۲ ^{ab}	۱۰/۴±۰/۵۱ ^{bc}	۷/۱۴±۰/۳۱ ^{bc}	۰ + ۰	۱۵۰ + ۱۵۰
۱۱/۳±۰/۵۳ ^b	۹/۷۵±۰/۴۵ ^a	۱۱/۷۰±۰/۵۴ ^b	۹/۵۶±۰/۴۳ ^a	۰ + ۰	۳۰۰ + ۳۰۰
۲/۶±۰/۱۸ ^f	۴/۳۵±۰/۲۷ ^c	۵/۶±۰/۲۳ ^{ae}	۵/۱۸±۰/۲۵ ^e	۳۰۰ + ۱	۰ + ۰
۶/۸±۰/۳۹ ^b	۳/۴۸±۰/۳۱ ^c	۱۴/۵۶±۰/۷۹ ^a	۵/۵۰±۰/۲۶ ^b	۳۰۰ + ۱	۱۵۰ + ۱۵۰
۱۳/۲±۰/۸۰ ^a	۲/۸۵±۰/۲۵ ^d	۱۲/۱۱±۰/۶۲ ^b	۷/۱۷±۰/۲۸ ^{bc}	۳۰۰ + ۱	۳۰۰ + ۳۰۰
۳/۱±۰/۱۷ ^e	۳/۸۰±۰/۲۶ ^c	۶/۵±۰/۳۸ ^d	۴/۷۰±۰/۲۰ ^e	۶۰۰ + ۲	۰ + ۰
۵/۵±۰/۲۵ ^c	۳/۷۲±۰/۳۵ ^c	۴/۴۷±۰/۲۳ ^f	۶/۷۸±۰/۳۵ ^d	۶۰۰ + ۲	۱۵۰ + ۱۵۰
۴/۲±۰/۲۳ ^d	۲/۳۳±۰/۲۰ ^d	۸/۲۳±۰/۴۸ ^c	۷/۸۰±۰/۳۹ ^b	۶۰۰ + ۲	۳۰۰ + ۳۰۰

حروف متفاوت بیانگر اختلاف معنی‌دار میانگین‌ها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در روش مقایسه میانگین هستند. اعداد به صورت Mean±SE می‌باشند.

شود (Xu et al., 2009; Wu et al., 2007; Pohlmeier and Prasad, 2004) و موجب بهبود تنش فلز سنگین و اکسیداتیو

کاربرد لیگاندها موجب کاهش کاتیون‌های آزاد بافت گیاهی شده و تقویت خروج یون‌های سمی از سلول‌ها و بافت‌ها می‌-

می‌شود که نتایج مربوط به بهبود شاخص‌های رشد در این تحقیق نیز مشاهده شد (جدول ۶).

تنش ۱۵۰ میکرومولار مس و نیکل دارای تأثیرهای متفاوتی بر میزان قندهای احیاکننده در ارقام مختلف مطالعه شده بودند اما بنابراین سطح سمی ۳۰۰ میکرومولار موجب افزایش قندهای اندام هوایی نسبت به شاهد گردید. میزان افزایش به حدود پنج برابر نیز رسید. بنابراین تغییرات افزایش میزان این پارامتر در شرایط تنش به‌ویژه ۳۰۰ میکرومولار میکس نیکل و مس قابل توجه بود. کاربرد دو لیگاند در گیاهان ارقام کال‌جی تحت تنش ۱۵۰ میکرومولار نیکل و مس کاهش قندهای احیاکننده اندام هوایی نسبت به میزان شاهد را باعث گردید (جدول ۵). به‌طور کلی روند تأثیر تیمارهای تنشی آزمایش بر میزان فعالیت آنزیم کاتالاز افزایشی بود و این موضوع به‌خصوص در مورد تأثیر نیکل و مس بر اندام هوایی صادق است و نشان‌دهنده القا تنش اکسیداتیو در دو رقم گوجه‌فرنگی توسط نیکل و مس است (جدول ۶).

در رقم کال‌جی و ارلی اوربانا سطح ۳۰۰ میکرومولار نیکل و مس به‌ترتیب موجب افزایش پنج و دو برابری فعالیت این آنزیم نسبت به شاهد در اندام هوایی گردیدند، در حالی که تنش نیکل و مس همزمان با کاربرد لیگاندها در این ارقام تأثیر همزمان معنی‌داری بر کاهش فعالیت کاتالاز داشت (جدول ۶). بنابراین تأثیر همزمان هیستیدین و مالات در هر دو رقم کال‌جی و ارلی اوربانا تحت شرایط تنش و غیرتنش بخوبی مشاهده گردید.

به‌نظر می‌رسد که تیمار همزمان هیستیدین و مالات در مرحله رویشی گیاهان رقم کال‌جی تحت تنش موجب کاهش چشمگیر فعالیت آنزیم کاتالاز شده است. باید توجه نمود که در اندام هوایی رقم کال‌جی تحت شرایط تنش، کاربرد مالات بدون هیستیدین موجب افزایش چند برابری فعالیت آنزیم کاتالاز نسبت به شاهد گردید (جدول ۶).

همچنین در رقم کال‌جی مشابه وضعیت قبل، تیمار همزمان دو لیگاند موجب کاهش معنی‌دار سطح فعالیت ارتقایافته آنزیم آسکوربات پراکسیداز نسبت به شرایط تنش در اندام

هوایی گردید در حالی که تیمار حاوی ۱+۶۰۰ هیستیدین و مالات موجب کاهش فعالیت آنزیم اخیر گردید. در مورد MDA و سایر آلدئید و آباکسیژنه نیز وضعیت تا حدی مشابه است. (جدول ۶).

گیاهان به آسانی نیکل را در بافت‌های خود تجمع می‌دهند و بر خلاف بسیاری از عناصر کم‌مصرف گیاهی نیکل آزادانه و به سرعت در گیاه انتقال می‌یابد و در نهایت نیز در دانه‌ها تجمع می‌یابد. ایجاد رفتار تنش‌زای نیکل در گیاهان به این دلیل است که نیکل دارای نقش عملکردی و غیرعملکردی مشابه با کاتیون‌های ضروری روی و مس در سیستم ریشه گیاهان است (Holmgren et al., 1993). بنابراین محدودیت جذب و انتقال روی و مس در گیاه تحت تنش نیکل موجب بی‌نظمی‌های تغذیه‌ای می‌گردد. مطالعات و سنجش‌های یونی در زمینه تغذیه گیاهی نشان داده است که گیاهان زراعی بسیاری از کاتیون‌های ضروری خود را در آوندهای چوبی به فرم آزاد منتقل نمی‌کنند و چنین عناصری در برگ گیاه به فرم کمپلکس‌های فلزی با بار منفی یافت می‌شوند. این کمپلکس‌های فلزی با مواد آلی مانند اسیدهای آلی تشکیل شده و نسبتاً پایدار هم هستند. از جمله این عناصر تشکیل‌دهنده کمپلکس فلزی می‌توان به آهن، کلسیم، مس و روی اشاره نمود و فقط عناصری مانند منگنز به‌صورت کاتیون آزاد یا احتمالاً دارای کمپلکس آنیونی ناپایدار در شیره خام انتقال می‌یابد و در فرایندهای مهمی مانند فتوسنتز برگی شرکت می‌نماید (Yi et al., 2013). تحقیقات مربوط به تعیین فرم انتقال نیکل در برگ گیاهان بیش تجمع‌دهنده نیکل نشان داده است که نیکل به‌صورت یک کمپلکس فلزی با بار مثبت یا منفی (بسته به نوع گیاه و غلظت نیکل) دارای جرم مولکولی کم در گیاه انتقال و تجمع می‌یابد. ثابت شده است که کمپلکس‌های کلسیم، نیکل و آهن بیشتر از طریق آوند چوبی منتقل می‌گردد و در حالی که کمپلکس‌های فلزی منگنز و روی بیشتر از طریق آوندهای آبکش در درون گیاه جابه‌جا می‌شوند (Wu et al., 2012; Yan et al., 2008). در گوجه‌فرنگی یک کمپلکس با بار مثبت از نیکل در آوند چوبی به‌همراه میزان کمی (۳ میکرومولار) از کمپلکس با بار منفی یافت شده است.

اسیدهای آلی و کربوکسیلی مانند فولویک اسید و هیومیک اسید نیز در خاک به وفور یافت شده و می‌توانند با نیکل کمپلکس‌های پایداری را تشکیل دهند و از غلظت نیکل آزاد خاک بکاهند (Barcelo and Poschenrieder, 2004; Bowler and Fluhr, 2000). در این تحقیق نیز به دلیل شباهت‌های ساختاری، لیگاندهای مورد آزمایش (هیستیدین و مالات) دارای همین تأثیرگذاری در جهت رفع و بهبود آثار تنش‌زای سمیت نیکل و مس بودند (جداول ۱ تا ۶).

نتیجه‌گیری

نتایج حاصل از این پژوهش ثابت کرد که دو رقم گوجه‌فرنگی مورد استفاده تحت تأثیر معنی‌دار تیمارهای تنش و مقاومت زای لیگاندی قرار گرفتند. در بسیاری از پارامترهای رشد و اکسیداتیو مانند رشد گیاه، MDA، تجمع آب‌اکسیژنه، فعالیت آنزیم کاتالاز و آسکوربات پراکسیداز به‌ویژه در کال‌جی پاسخ چشمگیری نسبت به ارلی اوربانا از خود نشان داد و تأثیر فاکتور نوع رقم از لحاظ آماری معنی‌دار بود. نکته قابل‌توجه آن که کاربرد همزمان ۲+۶۰۰ لیگاندهای هیستیدین و مالات تحت شرایط تنش‌زای ۳۰۰ میکرومولار توأم از نیکل و مس به‌ویژه رقم کال‌جی از لحاظ تخفیف تنش اکسیداتیو تأثیرگذارتر بود. به‌طوری‌که در برخی پژوهش‌های آتی می‌توان اثر ترکیبی لیگاندها را تحت تنش سایر فلزات سنگین نیز بررسی نمود. بررسی سایر ارقام جدید گوجه‌فرنگی یا سایر گیاهان زراعی نیز می‌تواند به تکمیل کاربرد لیگاندهای مرتبط کمک کند. همچنین پیشنهاد می‌گردد این نوع تحقیقات در سطح وسیع مزرعه یا مناطق آلوده صنعتی حتی به‌صورت محلول‌پاشی اجرا شود و نتایج کاربردی آن در مناطق آلوده صنعتی و کشاورزی در اختیار محققین حوزه‌های محیط‌زیست و کشاورزی قرار گیرد. بنابراین می‌توان فعالیت ژنی و محصولات ژن‌ها را در مراحل بالادستی در گیاهان زراعی مانند گوجه‌فرنگی و ارقام جدید گوجه‌فرنگی مورد مطالعه و پژوهش قرار داد. به‌طور کلی در این تحقیق، تیمارهای لیگاندی و یونی به‌صورت جداگانه یا توأم به‌صورت تیمار یونی و لیگاند استفاده شد و

این نوع مطالعات نشان می‌دهد که مقادیر غیرسمی نیکل در گیاهان به‌صورت باندشده با مواد آلی وجود دارند و فرم باندشده نیکل تقریباً پایدار بوده و در صورت نفوذ دوباره خاک دارای خطر زیست‌محیطی نمی‌باشد. زمانی که مقدار نیکل جذب‌شده از حد آستانه تحمل یک گیاه بیشتر باشد، توانایی گیاه در باندکردن مقادیر اضافی یون‌های نیکل چندان مشاهده نمی‌گردد و مقادیر اضافی نیکل به فرم آزاد در گیاه تجمع می‌یابد و اثرات تنش‌زای نیکل در این موقع مشاهده می‌گردد (Tiwari et al., 2002). این مقادیر اضافی نیکل پس از مرگ گیاه به‌راحتی به محیط‌زیست و مزارع کشاورزی آزاد می‌گردد. معمولاً ۱۰۰ میلی‌گرم نیکل در هر کیلوگرم خاک به‌عنوان آستانه سمیت نیکل برای بسیاری از گیاهان حساس در خاک‌ها محسوب می‌شود (Zhang et al., 2008). مقادیر سمی مس در بافت گیاهی می‌تواند موجب تغییر در نفوذپذیری غشا، ساختار کروماتین، فعالیت‌های آنزیمی فرایندهای تنفس، فتوسنتز و القا پیری گردد (Freedman et al., 1989; Roitto et al., 2005). باندشدن نیکل و مس به لیگاندهایی مانند هیستیدین و مالات در این پژوهش، بخوبی شاخص‌های اکسیدانی و رشدی گیاهان به‌ویژه رقم کال‌جی تحت شرایط تنش را بهبود داد (جداول ۵ و ۶).

شاخص‌های ظرفیت قابلیت تبادل یونی (CEC)، تجمع و میزان حلالیت نیکل و مس در خاک تحت تأثیر عوامل مختلفی از جمله اسیدیته، اتصال به مواد آلی لیگاندی، فعالیت میکروارگانیسم‌های خاک و غلظت کلسیم هستند (Lago-Vila et al., 2015; Bhalerao et al., 2015). بنابراین وجود لیگاندهای آلی مانند سیترات و آرژنین و همچنین اکسیدهای آهن و منگنز در فاز جامد خاک، موجب افزایش قابل‌توجه جذب سطحی کاتیون‌های نیکل در خاک‌های ماسه‌ای لومی می‌شوند (Georgiadou et al., 2018; Conyers et al., 2002; Liao et al., 2000). در این شرایط کمپلکس ماده آلی- نیکل می‌تواند به جایگاه‌های تبدلی خاک متصل شده و ضریب دسترسی نیکل یا مس را کاهش دهد (Athar and Ahmad, 2002; Seregin and Kozhevnikova, 2006). همچنین

تشکر و قدردانی

تأثیر برونزای فیزیولوژیکی و کاربردی آنها در این پژوهش مد نظر بود. واکنش باندشدن بین کاتیون‌ها و لیگاندها به دلیل اثر متقابل آماری از لحاظ پارامترهای مختلف بررسی شد که در نتایج و بحث ارائه شده مشهود بود. بنابراین واکنش لیگاندی محض بین ترکیب‌های تیماری با توجه به تأثیر فیزیولوژیک در تحقیقات آینده انجام خواهد گرفت.

این مقاله بخشی از یک طرح پژوهشی بوده که قرارداد آن به شماره ۷/ص/۹۵/۴۰۴ در پژوهشگاه علوم و تکنولوژی پیشرفته و علوم محیطی، دانشگاه تحصیلات تکمیلی صنعتی و فناوری پیشرفته کرمان به ثبت رسیده است. نویسندگان مقاله مراتب تشکر خود را از مسئولین پژوهشگاه و دانشگاه اعلام می‌دارند.

منابع

امینی، ف.، نوری، م.، عسکری، م.، فروغی، م. و عباس‌پور، ج. (۱۳۹۱) تغییرات القایی نیکل بر برخی خصوصیات بیوشیمیایی و الگوی الکتروفورزی پروتئین‌های گیاه یونجه تاجی (*Coronilla varia* L.) در کشت هیدروپونیک. مجله تولید و فراوری محصولات زراعی و باغی ۲: ۱۵۲-۱۴۳.

قادریان، س. م. و مهدی، ا. (۱۳۸۶) اثر نیکل و کروم بر جوانه‌زنی و رشد در جمعیت‌های سرپتین و غیرسرپتین *Alyssum simplex* و *Alyssum bracteatum*. مجله پژوهشی علوم پایه دانشگاه اصفهان، ویژه‌نامه زیست‌شناسی ۲۸: ۴۲-۳۱.

محمدحسینی، م.، نکوئی، م. و رحیمی، م. (۱۳۹۰) وابستگی ثابت‌های تشکیل کمپلکس کادمیم 2-4- (II) پیریدیل آزو- رزورسینول (PAR) به قدرت یونی در محیط‌های آبی، الکلی و عوامل فعال سطحی غیریونی به روش اسپکتروفوتومتری. مجله شیمی کوانتومی و اسپکتروسکوپی ۱: ۶۸-۵۹.

- Adriano, D. C. (2001) Trace Elements in Terrestrial Environments. 2nd Ed. Springer, New York.
- Ahmad, M. S. A., Hussain, M., Saddiq, R. and Alvi, A. K. (2007) Mungbean: A nickel indicator, accumulator or excluder?. Bull Environmental Contamination Toxicology 78: 319-324.
- Ahonen-Jonnarth, U., Roitto, M., Markkola, A. M., Ranta, H. and Neuvonen, S. (2004) Effects of nickel and copper on growth and mycorrhiza of scots pine seedlings inoculated with *Gremmeniella abietina*. Forest Path 34: 337-348.
- Alam, M. M., Hayat, S., Ali, B. and Ahmad, A. (2007) Effect of 28-homobrassinolide treatment on nickel toxicity in *Brassica juncea*. Photosynthetica 45: 139-142.
- Allen, H. (2002) Terrestrial ecosystems: an overview. In: Bioavailability of Metals in Terrestrial Ecosystems (ed. Allen, H.) Pp. 1-5. SETAC Press, Pensacola.
- Andersen, M. K., Raulund-Rasmussen, K., Strobel, B. W. and Hansen, H. C. B. (2002a) Heavy metal distribution and fractionation in pairs SAS Institute. Journal of Soil Sciences 53: 491-502.
- Andersen, M. K., Refsgaard, A., Raulund-Rasmussen, K., Strobel, B. W. and Hansen, H. C. B. (2002b) Content, distribution, and solubility of cadmium in arable and forest soils. Soil Sciences Society of American 66: 1829-1835.
- Armengaud, P., Thiery, L., Buhot, N., Grenier-de March, G. and Savoure, A. (2004) Transcriptional regulation of proline biosynthesis in *Medicago truncatula* reveals developmental and environmental specific features. Physiologia Plantarum 120: 442-445.
- Asher, C. J. (1991) Beneficial elements, functional nutrients and possible new essential elements, micronutrients in agriculture, 2nd Ed. Soil Science Society of America, Madison.
- Athar, R. and Ahmad, M. (2002) Heavy metal toxicity in legume-microsymbiont system. Journal of Plant Nutrition 25: 369-386.
- Baker, A. J. M., McGrath, S. P., Reeves, R. D. and Smith, J. A. C. (2000) Metal hyperaccumulator plants: A review of the ecology and physiology of a biological resource for phytoremediation of metalpolluted soils. In: Phytoremediation of Contaminated Soil and Water (eds. Terry, N. and Banuelos, G.) Pp. 85-107. Lewis Publishers, Boca Raton.
- Barcelo, J. and Poschenrieder, C. (2004) Structural and ultra-structural changes in heavy metal exposed plants. In: Heavy Metal Stress in Plants: from Biomolecules to Ecosystem (ed. Prasad, M. N. V.) Pp. 223-248. Springer, Berlin.
- Bates, L. S., Waldren, R. P. and Teares, I. D. (1975) Rapid determination of free proline in water stress studies. Plant and Soil 39: 205-207.
- Bhalerao, S. A., Sharma, A. S. and Poojari, A. C. (2015) Toxicity of nickel in plants. International Journal of Pure and Applied Bioscience 3: 345-355.

- Bowler, C. and Fluhr, R. (2000) The role of calcium and activated oxygens as signals for controlling cross-tolerance. *Trends in Plant Science* 5: 1360-1385.
- Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248-254.
- Chen, C., Chen, T. H., Lo, K. F. and Chiu, C. Y. (2004) Effects of proline on copper transport in rice seedlings under excess copper stress. *Plant Science* 166: 103-111.
- Cobbett, C. and Goldsbrough, P. (2002) Phytochelatins and metallothioneins: Roles in heavy metal detoxification and homeostasis. *Annual Review of Plant Biology* 53: 159-82.
- 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, Australian Society of Agronomy*.
- Dhindsa, R. S., Plumb-Dhindsa, P. and Thorpe, T. A. (1981) Leaf senescence: Correlated with increased levels of membrane permeability and lipid peroxidation, and decreased levels of superoxide dismutase and catalase. *Journal of Experimental Botany* 32: 93-101.
- Diaz, J., Bernal, A., Pomar, F. and Merino, F. (2001) Induction of skhikimate dehydrogenase and peroxidase in pepper (*Capsicum annuum* L.) seedlings in response to copper stress and its relation to lignification. *Plant Science* 161: 179-188.
- Freedman, J. H., Ciriolo, M. R. and Peisach, J. (1989) The role of glutathione in copper metabolism and toxicity. *Journal of Biological Chemistry* 264: 5598-5605.
- Gao, S., Yan, R., Cao, M., Yang, W., Wang, S. and Chen, F. (2008) Effects of copper on growth, antioxidant enzymes and phenylalanine ammonia-lyase activities in *Jatropha curcas* L. seedling. *Plant and Soil Environmental* 54: 117-122.
- Georgiadou, E. C., Kowalska, E., Patla, K., Kulbat, K., Smolinska, B., Leszczynska, J. and Fotopoulos, V. (2018) Influence of heavy metals (Ni, Cu, and Zn) on nitro-oxidative stress responses, proteome regulation and allergen production in basil (*Ocimum basilicum* L.) plants. *Frontiers in Plant Science* 9: 86-92.
- Ghasemi, R., Ghaderian, S. M. and Kramer, U. (2009) Interference of nickel with copper and iron homeostasis contributes to metal toxicity symptoms in the nickel hyperaccumulator plant *Alyssum inflatum*. *New Phytologist* 184: 566-580.
- Gonnelli, C., Galardi, F. and Gabrielli, R. (2001) Nickel and copper tolerance and toxicity in three Tuscan populations of *Silene paradoxa*. *Physiological Plantarum* 113: 507-514.
- Heath, R. L. and Packer, L. (1968) Photoperoxidation in isolated chloroplasts I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 12: 189-198.
- 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. *Journal of Environmental Quality* 22: 335-348.
- Hwang, N. (1975) Rapid hippurate hydrolysis method for presumptive identification of group B streptococci. *Journal of Clinical Microbiology* 1: 114-115.
- Jones, R. L. (2002) Zinc and cadmium in illinois surface soils. *Transactions of the Illinois State Academy of Science* 95: 87-97.
- Kidd, P. S., Llugany, M., Poschenrieder, C., Gunse, B. and Barcel, J. (2001) The role of root exudates in aluminium resistance and silicon-induced amelioration of aluminium toxicity in three varieties of maize (*Zea mays* L.). *Journal of Experimental Botany* 52: 1339-352.
- Kovacik, J., Gruz, J., Backor, M., Tomko, J., Strnad, M. and Repcak, M. (2008) Phenolic compounds composition and physiological attributes of *Matricaria chamomilla* grown in copper excess. *Environmental Experimental Botany* 62: 145-152.
- Kupper, H., Gotz, B., Mijovilovich, A., Kupper, F. C. and Meyer-Klaucke, W. (2009) Complexation and toxicity of copper in higher plants. I. Characterization of copper accumulation, speciation, and toxicity in *crassula helmsii* as a new copper accumulator. *Plant Physiology* 151: 702-714.
- Lago-Vila, M., Arenas-Lago, D., Rodriguez-Seijo, A., Andrade Couce, M. L. and Vega, F. A. (2015) Cobalt, chromium and nickel contents in soils and plants from a serpentinite quarry. *Solid Earth* 6: 323-335.
- Liao, M. T., Hedley, M. J., Woolley, D. J., Brooks, R. R. and Nichols, M. A. (2000) Copper uptake and translocation in chicory (*Cichorium intybus* L. cv Grasslands Puna) and tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill. Cv Ronly) plants grown in NFT system: II. The role of nicotianamine and histidine in xylem sap copper transport. *Plant and Soil* 223: 243-252.
- Lichtenthaler, H. (1987) Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. *Methods Enzymology* 148: 350-382.
- Lukin, A., Dauvalter, V., Kashulin, N., Yakovlev, V., Sharov, A. and Vandysh, O. (2003) Assessment of copper-nickel industry impact on a subarctic lake ecosystem. *Science Tot Environment* 306: 73-83.

- Luo, M. and Bi, S. (2003) Solid phase extraction-spectrophotometric determination of dissolved aluminum in soil extracts and ground waters. *Journal Inorg Biochemistry* 15: 173-8.
- Mahmood, T. and Islam, K. R. (2006) Response of rice to copper toxicity and acidity. *Journal Plant Nutrition* 29: 943-957.
- Meirs, P., Hada, S. and Aharoni, N. (1992) Ethylene increased accumulation of fluorescent lipid peroxidation products detected during parsley by a newly developed method. *Journal of American Society and Horticulture Science* 117: 128-132.
- Meriga, B., Reddy, B. K., Rao, K. R., Reddy, L. A. and Kishor, P. B. K. (2004) Aluminium-induced production of oxygen radicals, lipid peroxidation and DNA damage in seedlings of rice (*Oryza sativa*). *Journal of Plant Physiology* 161: 63-68.
- Mittler, R. (2002) Oxidative stress antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plant Science* 7: 405-410.
- Mostofa, M. G., Hossain, M. A., Fujita, M. and Lam-Son Phan Tran, L. (2015) Physiological and biochemical mechanisms associated with trehalose-induced copper-stress tolerance in rice. *Scientific Reports* 5: 1-16.
- Murphy, A. S. (1999) Early copper-induced leakage of K⁺ from Arabidopsis seedlings is mediated by ion channels and coupled to citrate efflux. *Plant Physiology* 121: 1375-1382.
- Nakano, Y. and Asada, K. (1981) Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant Cell Physiology* 22: 867-880.
- Nieminen, T. M. (2004) Effects of soil copper and nickel on survival and growth of Scots pine. *Journal of Environmental Monitor* 6: 888-896.
- Osteras, A. H. and Greger, M. (2006) Interactions between calcium and copper or cadmium in Norway spruce. *Biologia Plantarum* 50: 647-652.
- Panou-Filothou, H., Bosabalidis, A. M. and Karataglis, S. (2001) Effects of copper toxicity on leaves of oregano (*Origanum vulgare* subsp. *hirtum*). *Annals of Botany* 88: 207-214.
- Parlac, U. (2016) Effect of nickel on growth and biochemical characteristics of wheat (*Triticum aestivum* L.) seedlings. *NJAS-Wageningen Journal of Life Sciences* 76: 1-5.
- Pearce, D. A. and Sherman, F. (1999) Toxicity of copper, cobalt, and nickel salts is dependent on histidine metabolism in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Bacteriology* 181: 4774-4779.
- Plewa, M. J. and Wagner, E. D. (1993) Activation of promutagens by green plants. *Annual Review of Genetics* 27: 93-113.
- Pohlmeier, A. and Prasad, N. V. (2004) Heavy Metal Stress in Plants. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg.
- Quinn, J. M., Kropat, J. and Merchant, S. (2003) Copper response element and *crr1*-dependent Ni²⁺-responsive promoter for induced, reversible gene expression in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Eucariotic Cell* 2: 995-1002.
- Reimann, C., Ayras, M., Chekushin, V., Bogatyrev, I., Boyd, R., de Caritat, P., Dutter, R., Finne, T. E., Halleraker, J., Jaeger, H., Kashulina, G., Lehto, O., Niskavaara, H., Pavlov, V., Raisanen, M. L., Strand, T. and Volden, T. (1998) Groundwater composition near the nickel-copper smelting industry on the Kola Peninsula, central Barents Region (NW Russia and NE Norway). *Environmental Geochemical Atlas of the Central Barents Region* 422-425.
- Roitto, M., Rautio, P., Julkunen-Tiitto, R., Kukkola, E. and Huttunen, S. (2005) Changes in the concentrations of phenolics and photosynthates in *Scots pine* (L.) seedlings exposed to nickel and copper. *Environmental Pollution* 137: 603-609.
- Seregin, V. and Kozhevnikova, A. D. (2006) Physiological role of nickel and its toxic effects on higher plants. *Russ Journal of Plant Physiology* 53: 257-277.
- Sharma, P. and Bhardwaj, R. (2008) Effect of 28-homobrassinolide on nickel uptake, protein content and antioxidative defence system in *Brassica juncea*. *Biologia Plantarum* 52: 767-770.
- Sigel, A., Sigel, H. and Sigel, R. K. O. (2007) Metal Ions in Life Sciences. 2nd Ed. John Wiley and Sons Ltd, The Atrium, Southern Gate, Chichester, England.
- Sirko, A., Blaszczyk, A. and Liszewska, F. (2004) Overproduction of SAT and /or OASTL in transgenic plants: A survey of effects. *Journal of Experimental Botany* 55: 1881-1888.
- Sofo, A., Dichio, B., Xiloyannis, C. and Masia, A. (2004) Lipoxygenase activity and proline accumulation in leaves and roots of olive trees in response to drought stress. *Physiologia Plantarum* 121: 58-65.
- Somogyi, M. (1952) Determination of reducing sugars by Nelson-Somogyi method. *Journal of Biology and Chemistry* 200: 245.
- Sreekanth, T. V. M., Nagajyothi, P. C., Lee, K. D. and Prasad, T. N. (2013) Occurrence, physiological responses and toxicity of nickel in plants. *International Journal of Environmental Science and Technology* 10: 1129-1140.
- Srivastava, S., Mishra, S., Tripathi, R. D., Dwivedi, S. and Gupta, D. K. (2006) Copper induced oxidative stress and responses of antioxidants and phytochelators in *Hydrilla verticillata* (L.). *Royle Aquatic Toxicology* 80: 405-415.
- Tewari, R. K., Kumar, P. and Sharma, P. N. (2006) Antioxidant responses to enhanced generation of superoxide anion radical and hydrogen peroxide in the copper-stressed mulberry plants. *Planta* 223: 1145-1153.
- Thauer, R. K. (2001) Enzymology: Nickel to the fore. *Science* 293: 1264-1265.

- Tiwari, R. K., Kumar, P., Sharma, P. N. and Bisht, S. S. (2002) Modulation of oxidative stress responsive enzymes by excess cobalt. *Plant Science* 162: 381-388.
- Volbeda, A. and Fontecilla-Camps, J. C. (2005) Investigations of models related to the active sites of [NiFe] and other nickel-iron enzymes. *Coordination Chemistry Review* 249: 1609-1619.
- Wang, S., He, X. J. and An, R. D. (2010) Responses of growth and antioxidant metabolism to nickel toxicity in *Luffa cylindrica* seedlings. *Journal Animal Plant Science* 7: 810-821.
- Wu, L., Luo, Y. and Song, J. (2007) *Methods in Biotechnology, Phytoremediation: Methods and Reviews*. Willey, Humana Press Inc., Totowa, New Jersey.
- Wu, Y., Liu, X., Wang, W., Zhang, S. and Xu, B. (2012) Calcium regulates the cell-to-cell water flow pathway in maize roots during variable water conditions. *Plant Physiology and Biochemistry* 58: 212-219.
- Xu, W., Li, W., He, J., Balwant, S. and Xiong, Z. (2009) Effects of insoluble Zn, Cd and EDTA on the growth, activities of antioxidant enzymes and uptake of Zn and Cd in *Vetiveria zizanioides*. *Journal of Environmental Sciences* 21: 186-192.
- Xu, J., Yang, L., Wang, Z., Dong, G., Huang, J. and Wang, Y. (2006) Toxicity of copper on rice growth and accumulation of copper in rice grain in copper contaminated soil. *Hemosphere* 62: 602-607.
- Yan, R., Gao, S., Yang, W., Cao, M., Wang, S. and Chen, F. (2008) Nickel toxicity induced antioxidant enzyme and phenylalanine ammonia-lyase activities in *Jatropha curcas* L. cotyledons. *Plant Soil and Environment* 54: 294-300.
- Yi, H., Dey, S., Kumaran, S., Lee, S. G., Krishnan, H. B. and Jez, J. M. (2013) Structure of soybean serine acetyl transferase and formation of the cysteine regulatory complex as a molecular chaperone. *JBC Papers*. (In Press)
- Yusuf, M., Fariduddin, Q., Hayat, S. and Ahmad, A. (2011) Nickel: An overview of uptake, essentiality and toxicity in plants. *Bull Environmental Contamination Toxicology* 86: 1-17.
- Zhang, Y., Zhang, H. W., Zhen-Cheng, S. U. and Zhang, C. G. (2008) Soil microbial characteristics under long-term heavy metal stress: A case study in Zhangshi Wastewater Irrigation Area, Shenyang. *Pedosphere* 18: 1-10.
- Zoller, T., Skroppa, T., Johnsen, O. and Polle, A. (2003) Apoplastic peroxidases in needles of Norway spruce (*Picea abies* progenies from different crossing environments. *Forst Wissencha Ftliches Central Blatt* 122: 153-159.

An investigation of the response of two new tomato varieties to the use of exogenous histidine and malate ligands to reduce oxidative stress due to the simultaneous toxicity of copper and nickel in hydroponics culture media

Hossein Mozafari^{1*}, Hassan Salari¹, Hakimeh Oloomi¹, Mohammad Moghtader² and Mohammad Mohsen salajeghe¹

¹Department of Ecology, Institute of Science and High Technology and Environmental Sciences, Graduate University of Advanced Technology, Kerman, Iran

²Department of Biodiversity, Institute of Science and High Technology and Environmental Sciences, Graduate University of Advanced Technology, Kerman, Iran
(Received: 16/07/2018, Accepted: 14/10/2019)

Abstract

The toxicity of heavy metals such as copper and nickel induces oxidative stress in tomato cultivars, due to the production of free radicals and damage to the plasma membrane due to toxic amounts of copper and nickel. When the negative effects of oxidative stress exceed the ability of the antioxidant resistance system, the plant decreases its growth and yield. In this research, we tried to study the simultaneous effect of two histidine and malate ligands on growth improvement and oxidative stress reduction in two new tomato cultivars including Cal J N3 and Earlyurbana under simultaneous stresses of copper and nickel under standard hydroponic conditions. 9 post-optimization treatments containing concentrations of 150 and 300 μ M of copper and nickel, 300 and 600 μ M of histidine and 1 and 2 mM of malate were in the base of Hoagland solution. The treatments were applied to plants cultivated at 50 ml Falcon tube containing Hoagland solution without culture medium in three replications. After treatment, parameters such as morphological growth, total protein content, changes in the activity of catalase and peroxidase enzymes, H_2O_2 accumulation, Malon dialdehyde and so on were measured in both cultivars. The results showed that the simultaneous use of 600 μ M and 2 mM from histidine and malate ligands had a significant effect on oxidative stress improvement on tomato cultivars under 300 μ M of nickel and copper stresses. Thus, by adding ligands in stress conditions, oxidant indices improved in comparison with control, indicating a greater correlation between plasma membrane and reduced absorption and transport of nickel and copper free cations. In addition, Cal j N3 cultivar gave a more significant relative response to the growth and oxidation parameters of ligands under stress conditions. Ligands seemed to confront by the influence of heavy metals on physiological, molecular, enzymatic activity and nutrient substitution, which indicates further study of the effect of ligands on the molecular level.

Keywords: Catalase, Copper, Malon dialdehyde, Nickel, Peroxidase

Corresponding author, Email: mozafari.hossein@gmail.com