نشریه تولید گیاهان زراعی
جلد هشتم، شماره چهارم، زمستان ۹٤
۱۰۵-۱۲۰
http://ejcp.gau.ac.ir

تاثیر نیتروژن و آرسینک بر رنگدانه‌های فتوسنتزی، فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان و مقادیر عناصر معدنی گلرنگ (*Carthamus tinctorius* L.)

سپیده محمدی[۱]، *مصطفی حیدری[۲]، مهدی دهمرده[۳] و محمدرضا اصغری‌پور[۳]

[۱]دانشجوی کارشناسی‌ارشد زراعت (آگرواکولوژی)، دانشگاه زابل، [۲]دانشیار گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشگاه شاهرود، [۳]دانشیار دانشکده کشاورزی، دانشگاه زابل

تاریخ دریافت: ۹۳/۱۱/۱۰ ؛ تاریخ پذیرش: ۹٤/٤/۱۸

چکیده

سابقه و هدف: آرسنیک یک شبه فلز سمی برای گیاهان است که از طریق منابع طبیعی و مصنوعی، محیط زیست را آلوده کرده و سلامتی انسان را مورد تهدید قرار می‌دهد. آرسنیک در گیاهان به سبب تولید گونه‌های فعال اکسیژن منجر به تخریب اسیدهای نوکلئیک و پروتئین‌ها می‌شود. این عنصر همچنین با تخریب غشاء کلروپلاستی سبب کاهش فتوسنتز و رشد خواهد شد. از این رو پاک‌سازی خاک‌های آلوده به آرسنیک یک مبحث مهم زیستی جهت مطالعه است. لذا مطالعه زیر به منظور بررسی اثرات غلظت‌های مختلف آرسنیک و کود نیتروژن بر رنگدانه‌های فتوسنتزی، میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدان و غلظت عناصر معدنی در گیاه گلرنگ (رقم گلدشت) انجام گرفت.

مواد و روش‌ها: جهت اجرای این طرح، آزمایشی گلدانی به صورت فاکتوریل و در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی با سه تکرار در دانشگاه زابل انجام گرفت. تیمارهای آزمایش شامل سه سطح نیتروژن: ۷۵ =N_1، ۱۵۰=N_2 و ۲۲۵=N_3 کیلوگرم در هکتار از منبع اوره و چهار سطح آرسنیک: ۰ =A_1، ۳۰ =A_2، ٦۰=A_3 و ۹۰=A_4 میلی‌گرم در کیلوگرم خاک از منبع آرسنات سدیم بودند.

یافته‌ها: نتایج آزمایش نشان داد آرسنیک تاثیر معنی‌داری بر فعالیت آنزیم‌های کاتالاز (CAT یا Catalase)، اسکوربات پراکسیداز (APX یا Ascorate perxidase) و گایاکول پراکسیداز (GPX یا Guaiacol peroxidase) داشت و تا سطح A_4 سبب افزایش فعالیت GPX، APX و کاهش CAT گردید. عنصر آرسنیک

*نویسنده مسئول: haydari2005@gmail.com

بدون تأثیر بر مقادیر کلروفیل a، b و کارتنوئید بود و تنها تأثیر معنی‌داری بر غلظت عناصر سدیم و پتاسیم آن هم در بخش هوایی داشت. تیمار کود نیتروژن و اثر متقابل آرسنیک و نیتروژن بجز APX، تاثیر معنی‌داری بر فعالیت دو آنزیم آنتی‌اکسیدان CAT و GPX داشتند. در این بین بیشترین فعالیت آنزیم آنتی اکسیدان GPX در تیمار A_4N_3 بدست آمد. در این آزمایش تیمار کودی نیتروژن سبب افزایش مقادیر رنگدانه‌های کلروفیل a، b و کارتنوئید در برگ‌ها گردید و نیز تنها تأثیر معنی‌دار بر غلظت عناصر پتاسیم و سدیم آنهم در بخش دانه‌ها داشت. با افزایش مصرف کود نیتروژن از سطح ۷۵ به ۲۲۵ کیلوگرم در هکتار بر میزان پتاسیم دانه‌ها افزوده و از غلظت سدیم در دانه‌ها کاسته شدند.

نتیجه‌گیری: به‌طورکلی نتایج این آزمایش نشان داد که عنصر آرسنیک تا سطح ۳۰ میلی‌گرم در کیلوگرم خاک بدون تأثیر سوء بر رشد و صفات فیزیولوژیکی گلرنگ رقم گلدشت بود و عمده تأثیر سوء این عنصر در غلظت‌های بالاتر از ۳۰ میلی‌گرم در کیلوگرم خاک بر این گیاه پدیدار شد.

واژه‌های کلیدی: آرسنیک، آنزیم‌های اکسایشی، صفات فیزیولوژیکی، رنگیزه‌های نوری، نیتروژن

مقدمه

گلرنگ با نام علمی *Carthamus tinctorius* L. یکی از گیاهان روغنی بومی ایران است که روغن آن با داشتن حدود ۸۰ درصد اسیدهای چرب غیراشباع همانند اسید لینولئیک و اسید اولئیک از کیفیت مطلوبی برای تغذیه انسان برخوردار است. با توجه به توان خوب این گیاه در توسعه ریشه مستقیم خود در اعماق خاک، به شرایط خشکی و شوری تا حدی مقاوم است (۱۸). این گیاه جزء تیره آستراسه بوده، گیاهان این تیره و از جمله آفتابگردان علاوه بر خصوصیات بسیار با ارزش زراعی و تولید روغن، خاصیت جذب عناصر سنگین خاک را نیز دارند (۹).

آلوده شدن منابع خاک و آب به انواعی از عناصر سنگین به سبب فعالیت‌های صنعتی و پیشرفت کشاورزی در اواخر قرن ۱۹ و در ادامه آنها در قرن ۲۰، امروزه به‌عنوان یکی از مسائل مهم زیست محیطی به‌شمار می‌روند. برخی از این فلزات همانند روی، نیکل و مس چون بخشی از ترکیبات آلی همانند رنگیزه‌ها و آنزیم‌ها را در گیاهان تشکیل می‌دهند، جزء عناصر ضروری برای برای رشد و نمو به‌شمار می‌روند و فقط در غلظت‌های بالاتر از نیاز فیزیولوژیکی اثرات سمی دارند (۱۲). در مقابل برخی دیگر از این دسته از عناصر همانند کادمیوم، آرسنیک و سرب که جزء فلزات غیر ضروری محسوب می‌شوند، حتی در غلظت‌های پایین نیز اثرات سمی بر گیاهان دارند. به همین دلیل، فلزات سنگین به‌عنوان یکی از عوامل تنش‌زا برای گیاهان به‌شمار می‌روند (۵).

از آغاز انقلاب صنعتی تاکنون، آلوده شدن محیط زیست با فلزات سنگین شدت یافته است. فلزات سنگین به‌وسیله فرآیندهای بسیاری از جمله کاربرد لجن فاضلاب، کودهای حیوانی، فاضلاب شهری و فرآورده‌های جنبی آنها و کودهای شیمیایی در خاک‌ها تجمع می‌یابند (۳). تجمع آنها در خاک‌ها موجب کاهش فعالیت و تنوع میکروبی، کاهش حاصلخیزی خاک، کاهش یا از بین رفتن محصول و حتی صدمه به سلامتی انسان و حیوانات از طریق ورود در زنجیره غذایی می‌شوند (۲۵).

در بین عناصر سنگین، آرسنیک، عنصری سمی برای انسان و جانوران به‌شمار می‌رود. آرسنیک از طریق منابعی همانند سموم، کودها، مواد نگهدارنده چوب و سوختن زغال سنگ و نیز فعالیت‌های صنعتی و کشاورزی در محیط انتشار می‌یابد (۱۰). آرسنیک معدنی باعث تولید گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) در گیاهان شود، ROSها می‌توانند به‌طور مستقیم سبب تخریب اسیدهای آمینه، پروتئین‌ها، اسیدهای نوکلئیک و افزایش پراکسیده شدن لیپدی غشاء شوند. تولید ROSها یک رویداد طبیعی است که در جریان واکنش‌های طبیعی سلول همانند تنفس و اکسیداسیون مواد به وجود می‌آید. اما میزان

تولید آن تحت تنش افزایش می‌یابد. این ترکیبات بسیار ناپدارند و مقادیر زیادی انرژی دارند. رادیکال‌های آزاد شامل رادیکال‌های سوپراکسید، رادیکال هیدروکسیل به اضافه مشتقات اکسیژن با الکترون‌های نابرابر همانند پراکسید هیدروژن و اکسیژن تنها هستند. در حالت عادی این رادیکال‌های آزاد می‌توانند در سلول‌ها خنثی و بی‌ضرر باشند اما عوامل مخرب محیطی همانند تنش‌ها و عناصر سنگین باعث تولید رادیکال‌های آزاد زیادی می‌شوند که به سلول‌های زنده آسیب وارد خواهند کرد (١). گزارش شده آرسنیک منجر به کاهش میزان فتوسنتز، تعرق، ممانعت از جوانه‌زنی، کاهش رشد، تخریب غشاء کلروپلاستی و افزایش پراکسیده شدن لیپدها می‌شود (٢٤). مطالعات نشان داده وجود عناصر سنگین همانند کادمیوم و آرسنیک در محیط رشد گیاهان می‌تواند سبب اختلال در جذب و بر هم زدن تعادل عناصر غذایی در آنها شود (٣١).

رشد گیاهان وابسته به فراهم بودن میزان مناسبی از عناصر غذایی در محیط ریشه است. در بین عناصر غذایی، نیتروژن از جایگاه ویژه‌ای برخودار است، زیرا نیتروژن در تشکیل آمینو اسیدها، پروتئین‌ها، اسیدهای نوکلئیک و دیگر ترکیبات سلولی نقش دارد (١٩). کمبود نیتروژن نمو فنولوژیکی را در دو مرحله رویشی و زایشی به تاخیر انداخته و سرعت توسعه و دوام سطح برگ در گیاهان را کاهش می‌دهد. در این شرایط راندمان استفاده از نور نیز کاهش می‌یابد. از طرفی هر چه غلظت نیتروژن در برگ‌ها افزایش یابد شدت کربن‌گیری بیشتر می‌شود. زیرا نیتروژن علاوه بر آن که به صورت پروتئین در گیاه وجود دارد عنصر اصلی تشکیل‌دهنده کلروفیل در گیاه بوده، عامل اساسی در کربن‌گیری محسوب می‌شود (٣٠). قاسمی و همکاران (٢٠١٢) گزارش کردند که مصرف ٩٠ کیلوگرم نیتروژن در هکتار برای عملکرد مطلوب دانه و روغن در گلرنگ مناسب است (٨). استراستل و ورلیکک (٢٠٠٢) اظهار داشتند که بیشترین عمکلرد دانه با کاربرد ١٥٠ کیلوگرم نیتروژن در هکتار در گلرنگ پاییزه بدست آمد و با افزایش نیتروژن به بیش از ١٥٠ کیلوگرم نیتروژن در هکتار، رشد اندام‌های رویشی افزایش و از تعداد طبق در بوته کاسته شد (٢٣). گرانت و بایلی (١٩٩٣) در بررسی خود بر روی کلزا گزارش کردند، نیتروژن عملکرد دانه را بوسیله تاثیر گذاشتن بر روی پارامترهای رشد افزایش داده و در نتیجه قدرت رشد و نمو گیاه کلزا را از طریق افزایش تعداد و وزن خورجین، بالا بردن وزن دانه‌ها و بهبود جذب عناصر غذایی بالا می‌برد (١١). در آزمایشی تاثیر نیتروژن، فسفر و کلرید پتاسیم بر غلظت کادمیم در آفتابگردان و جو بررسی شد. نتایج بدست آمده نشان داد که با مصرف نیتروژن و کلرید پتاسیم، غلظت کادمیم در گیاه افزایش یافت (٣٢).

از آنجایی که نقش نیتروژن در افزایش رشد و تولید عملکرد گیاهان زراعی و از جمله گلرنگ به اثبات رسیده است لذا در شرایط بالا بودن غلظت عناصر سنگین در محیط ریشه، ممکن است در حضور نیتروژن جذب این عناصر نیز تشدید شود. بالا رفتن غلظت عناصر سنگین در بخش هوایی در نهایت می تواند بسته به گونه گیاهی اختلالاتی را در رشد و فعالیت‌های فیزیولوژیکی آنها وارد نماید. لذا هدف از این تحقیق، بررسی اثرات سطوح مختلف نیتروژن و آرسنیک بر تغییرات رنگدانه‌های درگیر در فعالیت فتوسنتزی، چگونگی جذب و تجمع عناصر غذایی معدنی در دو بخش هوایی و دانه و نیز تاثیر این تیمارها بر میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در گیاه گلرنگ بوده است.

مواد و روش‌ها

جهت انجام این پژوهش، آزمایشی گلدانی به‌صورت فاکتوریل و در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی با ۳ تکرار در دانشگاه زابل اجرا گردید. تیمارهای آزمایشی شامل سه سطح نیتروژن به‌میزان N_1=۷۵، N_2=۱۵۰ و N_3=۲۲۵ کیلوگرم در هکتار از منبع اوره (معادل N_1=۱/۸۷، N_2=۳/۷۵ و N_3=۵/۶۲ گرم برای سطح هر گلدان) و چهار سطح آرسنیک به مقدار A_1=۰، A_2=۳۰، A_3=۶۰ و A_4=۹۰ میلی‌گرم در کیلوگرم خاک (معادل ۰، ۳۰۰، ۶۰۰ و ۹۰۰ میلی‌گرم در سطح هر گلدان) بودند. جهت اعمال تیمار آرسنیک از منبع آرسنات سدیم (Na_2HAsO_4) استفاده گردید.

برای انجام آزمایش گلدان‌هایی به ابعاد ۵۰×۳۰ سانتی‌متر تهیه، توسط خاک مزرعه پر شدند. قبل از آن، خاک‌های هر گلدان وزن و براساس تیمار آزمایش میزان آرسنیک لازم تهیه و قبل از کاشت به خاک اضافه و تا عمق ۱۵ سانتی‌متری با خاک کاملاً مخلوط شدند. در این بین مقادیر کودهای پایه فسفر و پتاسیم نیز براساس نتایج تجزیه شیمیایی خاک از منابع سوپر فسفات تریپل و سولفات پتاسیم و به مقدار ۱۵۰ و ۱۰۰ کیلوگرم در هکتار، تهیه و به خاک گلدان‌ها اضافه شدند. نتایج تجزیه شیمیایی خاک در جدول ۱ آورده شده است.

جدول ۱- نتایج تجزیه شیمیایی خاک مورد استفاده در آزمایش

Table 1. Physical and chemical characteristics of soil

بافت خاک Soil Texture	هدایت‌الکتریکی دسی زیمنس برمتر EC ($ds.m^{-1}$)	اسیدیته (pH)	شن Sand	رس Clay	لای Loam	موادآلی OM	پتاسیم K	فسفر (پی‌پی‌ام) P (ppm)	نیتروژن N
			(درصد)	(٪)					
لومی شنی Sandy loam	3.1	7.7	51	14	35	0.25	135	7.2	2.6

تیمار کودی نیتروژن در این آزمایش در دو مرحله قبل از کاشت و ٣ تا ٤ برگی اعمال گردید. کاشت در اواسط بهمن‌ماه ١٣٩٠ انجام و گلدان‌ها در شرایط آب و هوایی محیط بیرون قرار داده شدند. ابتدا در هر گلدان ٨ عدد بذر کاشته، بعد از جوانه زنی و استقرار تنک و به ٤ بوته در سطح هر گلدان رسانده شدند. از زمان کاشت تا جوانه‌زنی و استقرار به فاصله یک روز در میان آبیاری صورت گرفت. بعد از آن دور آبیاری به ٤ یا ٥ روز براساس شرایط آب و هوایی تغییر یافت. رقم گلرنگ گلدشت در این آزمایش مورد بررسی قرار گرفت.

جهت اندازه‌گیری رنگدانه‌های کلروفیل و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان، در شروع مرحله گلدهی از جوانترین برگ‌ها نمونه‌برداری صورت گرفت. برای کلروفیل a، b و کاروتنوئید از روش آرنون (١٩٦٧) استفاده شد (٢). برای این منظور ٠/٢ گرم از بافت تر برگ در هاون چینی که حاوی ١٠ میلی‌لیتر استن ٨٠ درصد بود ساییده شد. محتوای هاون در ٤٠٠٠ دور به‌مدت ده دقیقه سانتیریفوژ شدند. ٣ میلی‌لیتر از این محلول در کووت ریخته، جذب آنها در طول موج‌های ٦٦٣ نانومتر برای کلروفیل a، ٦٤٥ برای کلروفیل b و ٤٧٠ نانومتر برای کاروتنوئید با استفاده از اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شدند.

استخراج و سنجش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان: جهت استخراج آنزیم‌های حذف کننده پراکسید هیدروژن، ٠/٢ گرم از بافت سبز برگ که در مرحله شروع گلدهی از گیاهان برداشت و فریزز شده بودند در ٢ میلی‌لیتر از بافر فسفات پتاسیم سرد ١٠٠ میلی‌مولار (اسیدیته=٧/٥) که محتوی EDTA ٠/٤ میلی‌مولار، آسکوربات ٣ میلی‌مولار و پلی ونیل پیرولیدن ٥ درصد (وزن حجمی) بود، ساییده و به‌صورت همگن در آورده شدند. سپس نمونه‌ها به مدت ١٥ دقیقه با دور ١٦٠٠٠ سانتریفوژ شدند. در نهایت فاز بالایی به‌عنوان عصاره پروتئینی برای سنجش فعالیت آنزیمی مورد استفاده گردید. همه این عملیات‌ها در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد انجام گرفت. در نهایت جهت اندازه‌گیری فعالیت آنزیم کاتالاز (CAT) از روش بیرز و سیزر (١٩٥٢)، آنزیم آسکوربات پراکسیداز (APX) از روش ناکانا و آسادا (١٩٨١) و گایاکول پراکسیداز (GPX) از روش اوربانک و همکاران (١٩٩١) استفاده شدند (١٦ و ٢٩). جهت سنجش فعالیت آنزیم کاتالاز، کمپلکس واکنشی شامل ١/٥ میلی‌لیتر بافر فسفات پتاسیم ١٠٠ میلی‌مولار (اسیدیته=٧)، ٠/٥ میلی‌لیتر پراکسید هیدروژن ١/٢٥ میلی‌مولار و ٥٠ میکرولیتر از محلول آنزیمی بود که حجم نمونه‌ها با اضافه کردن آب مقطر به ٣ میلی‌لیتر رساند شد. نمونه‌ها در طیف جذبی ٢٤٠ نانومتر اندازه‌گیری شدند. برای آسکوربات پراکسیداز، کمپلکس شامل ٢٥٠ میکرولیتر

محلول بافر فسفات پتاسیم ۱۰۰ میلی‌مولار (اسیدیته=۷)، ۲۵۰ میکرولیتر آسکوربات یک میلی‌مولار، ۲۵۰ میکرولیتر ٠/٤EDTA میلی‌مولار، ۱۹۰ میکرولیتر آب دوبار تقطیر، ۱۰ میکرولیتر پراکسید هیدروژن ۱۰ میلی‌مولار و ۵۰ میکرولیتر محلول آنزیمی استخراج بود. طیف جذبی نمونه‌ها در طول موج ۲۹۰ نانومتر اندازه‌گیری شدند. در نهایت برای گایاکول پراکسیداز، کمپلکس واکنشی شامل یک میلی‌لیتر بافر فسفات ۱۰۰ میلی‌مولار (اسیدیته=۷)، ۲۵۰ میکرولیتر ٠/١EDTA میلی‌مولار، یک میلی‌لیتر گایاکول ۵ میلی‌مولار، یک میلی‌لیتر پراکسید هیدروژن ۱۵ میلی‌مولار و ۵۰ میکرولیتر از محلول آنزیمی استخراج شده بود. تغییرات جذب نمونه‌های در طول موج ٤٧٠ نانومتر قرائت شدند.

در انتهای دوره آزمایش و پس از رسیدگی دانه‌ها ، گیاهان موجود در سطح هر گلدان برداشت و برای اندازه‌گیری عناصر فسفر، پتاسیم و سدیم در دو بخش هوایی و دانه‌ها از روش خاکسترگیری خشک استفاده شد. میزان فسفر به روش کالریمتری و با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ٤٢٠ نانومتر و سدیم و پتاسیم به روش عزیزپور و همکاران (۲۰۱۰) و با استفاده از دستگاه فلم فتومتر اندازه‌گیری شدند (٤). در پایان داده‌های بدست آمده با استفاده از نرم‌افزار آماری SAS تجزیه و مقایسه میانگین‌ها براساس آزمون LSD در سطح ۵ درصد محاسبه شدند.

نتایج و بحث

آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان: نتایج تجزیه آماری داده‌ها در جدول (۲) نشان داد تیمار آرسنیک تاثیر معنی‌داری بر فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان کاتالاز (CAT)، آسکوربات پراکسیداز (APX) وگایاکول پراکسیداز (GPX) در گیاه گلرنگ داشت. مقایسه میانگین داده‌ها نشان داد میزان فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز همراه با افزایش غلظت آرسنیک در محیط ریشه افزایش، به‌طوری‌که بیشترین میزان فعالیت آسکوربات پراکسیداز در تیمار ۹۰ میلی‌گرم آرسنیک در هر کیلوگرم خاک حاصل شدند. میزان این نسبت به تیمار شاهد، معادل ۳۳/۳ درصد بود (جدول ۳). استوویا و همکاران (۲۰۰۵) اعلام کردند آرسنیک سبب تسریع در پراکسیداسیون چربی‌های موجود در غشاء سیتوپلاسمی سلول‌های گیاه لوبیا می‌شود. همچنین آرسنیک علاوه بر دارا بودن خاصیت سمی در تولید ROSها در سلول نیز نقش دارد. مشخص شده آرسنیک تولید ROSها را افزایش داده در این بین بر میزان فعالت آنزیم‌های آنتی‌اکیسدان در درون سیتزول سلول‌ها جهت از بین بردن ROSهای تولید شده نیز افزوده می‌شود (۱۵).

تیمار کودی نیتروژن بجز APX، تاثیر معنی‌داری بر میزان فعالیت دو آنزیم آنتی‌اکسیدان CAT و GPX در گیاه گلرنگ داشت (جدول ۲). مقایسه میانگین داده‌ها نشان داد هر چند با افزایش مصرف نیتروژن از ۷۵ به ۲۲۵ کیلوگرم در هکتار تا حدی از میزان فعالیت APX کاسته شد اما این کاهش از لحاظ آماری معنی‌دار نبود (جدول ۳). اثر متقابل آرسنیک و نیتروژن به‌جز APX تاثیر معنی‌داری بر میزان فعالیت دو آنزیم آنتی اکسیدان CAT و GPX دارا بود (جدول ۲). نتایج مقایسه میانگین داده‌ها نشان داد، بیشترین میزان فعالیت آنزیم‌های GPX و CAT به‌ترتیب مربوط به تیمارهای ۹۰ میلی‌گرم آرسنیک در کیلوگرم خاک به همراه ۲۲۵ کیلوگرم نیتروژن در هکتار و در تیمار عدم استفاده از آرسنیک به همراه ۷۵ کیلوگرم نیتروژن در هکتار بودند (شکل‌های ۱و ۲). لوگان و همکاران (۱۹۹۹) اعلام کردند نیتروژن تاثیر زیادی بر فعالیت آنزیم‌های درگیر در فتوسنتز همانند ریبولوز بی فسفات کربوکسیلاز دارد. در صورت نبود نیتروژن کافی از فعالیت ریبولوز بی فسفات کربوکسیلاز کاسته و بر میزان انتقال الکترون در مسیر احیاء نوری اکسیژن از طریق واکنش مهلر در درون کلروپلاست افزوده می‌شود. این امر در نهایت تولید ROSها را بالا می‌برد. در این شرایط انتظار می‌رود بر فعالیت ترکیبات آنزیمی و غیرآنزیمی آنتی‌اکسیدان در برگ‌های گیاهان افزوده شود (۱۳). در مقابل لین و همکاران (۲۰۱۲) گزارش کردند افزایش مصرف و بکارگیری نیتروژن سبب بالا رفتن میزان تولید آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان APX، CAT، POD و SOD در گیاه *Populus yunnanensis* شد (۱۲).

افزایش غلظت عناصر پر مصرف از جمله نیتروژن و فسفر در محیط ریشه، منجر به بالا رفتن تولید زیست توده و کاهش اثرات سمی آرسنیک در گیاهان می‌شود، در تأیید این نظریه، تیو و همکاران (۲۰۰۲) نشان دادند که گیاه گندم حساس به آرسنیک بوده و غلظت‌های ۱۰۰ تا ۲۵۰ میکرومولار آرسنیک سبب کاهش معنی‌داری در تولید زیست توده و رشد بخش هوایی و ریشه آن می‌شود (۲٦). در مقابل استفاده از کودهای پر مصرف همانند فسفر در غلظت‌های بالا اثرات بازدارندگی آرسنیک را کاهش داد. در تحقیق حاضر مشاهده شد، آرسنیک سبب افزایش میزان فعالیت آنزیم آنتی‌اکسیدان GPX در گلرنگ گردید. نیتروژن نیز بر میزان فعالیت این آنزیم در برگ‌های گیاه افزود. این امر می‌تواند به نوعی بیانگر فعال شدن مکانیسم‌های مقاومت در این گیاه برای کاهش اثرای سوء آرسنیک باشد.

رنگیزه‌های فتوسنتزی: نتایج تجزیه واریانس داده‌ها در جدول (۲) نشان داد سطوح مختلف آرسنیک تاثیر معنی‌داری بر مقادیر سه رنگیزه کلروفیل a، b و میزان کارتنوئید در گیاه گلرنگ نداشت. در این

بین تیمار کودی نیتروژن تاثیر معنی‌داری بر مقادیر این سه رنگیزه دارا بود. اثر متقابل آرسنیک و نیتروژن نیز در هیچ کدام از موارد فوق معنی‌دار نبود (جدول ۲). مقایسه میانگین داده‌ها نشان داد، با افزایش مصرف نیتروژن از ۷۵ به ۲۲۵ کیلوگرم در هکتار بر غلظت هر کدام از این رنگیزه‌ها افزوده شد. در این بین، بیشترین مقدار کلروفیل a از تیمار کودی ۱۵۰ کیلوگرم در هکتار، کلروفیل b و کارتنوئید از تیمار ۲۲۵ کیلوگرم در هکتار حاصل شد. این میزان افزایش برای کلروفیل a معادل ۱۹/۳ و برای کلروفیل b و کارتنوئید به‌ترتیب معادل ۲۳/۵ و ۳۹/۳ درصد نسبت به تیمار ۷۵ کیلوگرم در هکتار بودند (جدول ۳).

هر چند آرسنیک اثرات سویی بر رشد و نمو گیاهان دارد اما مطالعات صورت گرفته در مورد برخی از گیاهان از جمله پیاز نشان داد، آرسنیک تاثیری بر میزان کلروفیل در این گیاه نداشت (۲۱). میتوا و مراکچیسکا (۲۰۰۲) نیز گزارش کردند غلظت آرسنیک تا ۲۵ میلی‌گرم در کیلوگرم خاک تاثیری بر کلروفیل گیاه لوبیا ندارد و افزایش غلظت آرسنیک از ۲۵ به ۵۰ میلی‌گرم در کیلوگرم خاک توانست از میزان فتوسنتز و رنگدانه‌های فتوسنتزی در این گیاه بکاهد (۱٤). در این بین محتوای کلروفیل در برگها بسیار وابسته به میزان حضور نیتروژن در محیط ریشه است. وارول و همکاران (۱۹۹۷) تأیید کردند که افزایش کاربرد کود نیتروژن موجب افزایش میزان نسبی کلروفیل در ذرت می شود (۲۸). پنگ و همکاران (۱۹۹۹) در آزمایشی روی برنج گزارش کردند که محتوای کلروفیل در اثر کاربرد کود نیتروژن افزایش یافت و همبستگی بالایی را با کلروفیل برگ نشان داد (۱۷).

جدول ۲- نتایج تجزیه واریانس فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدان، رنگدانه‌های فتوسنتزی و میزان عناصر معدنی کلرنگ در تیمارهای آرسنیک و کود نیتروژن

Table 2. Analysis of variance on antioxidant enzymes, photosynthetic pigments and elements contents in safflower under nitrogen and arsenic treatments

منابع تغییرات S.O.V	درجه آزادی df	پتاسیم Potassium		فسفر Phosphorus		کاروتنوئید Cartoneid	کلروفیل b Chlorophyll "b"	کلروفیل a Chlorophyll "a"	آنزیم‌های آنتی اکسیدان Antioxidant enzyme			سدیم Sodium	
		دانه Seed	بخش هوایی Shoot	دانه Seed	بخش هوایی Shoot				آسکوربات پراکسیداز APX	گایاکول پراکسیداز GPX	کاتالاز CAT	بخش هوایی Shoot	دانه Seed
تکرار Replicate	2	3.2^{ns}	22.9^{ns}	58.7^{ns}	2.9^{ns}	0.00016^{ns}	0.0000009^{ns}	0.0000092^{ns}	0.00000095^{ns}	0.0013^{ns}	0.00000011^{ns}	0.02^{ns}	0.0007^{ns}
آرسنیک Arsenic(A)	3	2.3^{ns}	195.6^{*}	80.8^{ns}	0.9^{ns}	0.00096^{ns}	0.0000007^{ns}	0.00000078^{ns}	0.0000079^{*}	0.0024^{*}	0.000005^{*}	0.13^{*}	0.0012^{ns}
نیتروژن Nitrogen(N)	2	6.2^{*}	129.9^{ns}	63.1^{ns}	6.46^{ns}	0.034^{**}	0.000042^{**}	0.000063^{*}	0.000001^{ns}	0.0063^{**}	0.0000067^{*}	0.06^{ns}	0.0053^{*}
A×N	6	3.3^{ns}	49.1^{ns}	82.9^{ns}	3.3^{ns}	0.0024^{ns}	0.00000021^{ns}	0.000012^{ns}	0.000003^{ns}	0.00246^{**}	0.0000045^{*}	0.067^{ns}	0.0014^{ns}
خطای Error	22	2.2	73.8	74.1	3.2	0.0019	0.00000083	0.0000126	0.000003	0.00063	0.0000016	0.036	0.0013
CV%		14.5	14.7	6.8	2.6	18.5	5.7	15.4	25.5	23.3	20.6	19.1	6.8

^{ns}، *، ** به‌ترتیب غیر معنی دار، معنی‌دار در سطح احتمال ۵ و ۱ درصد

*, **and ^{ns} are significant at 5 and 1% level and not significant, respectively.

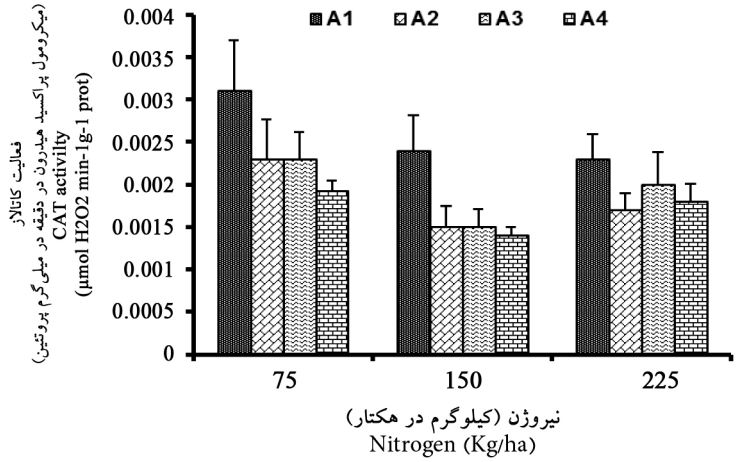
جدول ۳- مقایسه میانگین‌های تیمار آرسنیک و نیتروژن بر فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان، رنگدانه‌های فتوسنتزی و میزان عناصر معدنی کلرنگ

Table 3. Mean comparisons of the nitrogen and arsenic treatments on antioxidant enzymes, photosynthetic pigments and elements contents in safflower

تیمار Treatment	سدیم Sodium		پتاسیم Potassium		فسفر Phosphorus		کاروتنوئید Cartoneid	کلروفیل b Chlorophyll "b"	کلروفیل a Chlorophyll "a"	آنزیم‌های آنتی اکسیدان Antioxidant enzyme		
	دانه Seed	بخش هوایی Shoot	دانه Seed	بخش هوایی Shoot	دانه Seed	بخش هوایی Shoot				آسکوربات پراکسیداز APX	گایاکول پراکسیداز GPX	کاتالاز CAT
	(میلی‌گرم. گرم ماده خشک) (mg.g-1 dry weight)						(میکروگرم. گرم. وزن تر) (µg.g^{-1}. Fresh weight)			(میکرومول پراکسید هیدروژن در دقیقه در میلی‌گرم پروتئین) (µmol H_2O_2 min^{-1} mg^{-1} prot)		
Nitrogen (Kg. ha^{-1})												
N_1=75	0.55a	0.93a	5.66b	60.4a	128.9a	78.5a	0.17b	0.013c	0.02b	0.0029a	0.02b	0.0031a
N_2=150	0.52b	0.99a	5.66b	60.6a	125.2a	78.3a	0.24a	0.013b	0.025a	0.0028a	0.021b	0.0017b
N_3=225	0.53ab	1.08a	6.91a	53.8a	124.7a	79.7a	0.28a	0.017a	0.023a	0.0024a	0.06a	0.0027ab
Arsenic (mg. Kg^{-1} Soil)												
A_1=0	0.52a	0.92ab	5.4a	63.2a	123.6a	79.1a	0.25a	0.15a	0.0228a	0.0024ab	0.029b	0.0036a
A_2=30	0.547a	0.89b	6.5a	54.8ab	124.9a	78.4a	0.23a	0.16a	0.0225a	0.0015b	0.02b	0.0025ab
A_3=60	0.54a	1.12a	6.4a	61.1ab	126.1a	78.8a	0.23a	0.016a	0.0226a	0.0033ab	0.03b	0.0019b
A_4=90	0.53a	1.06a	5.8a	54.1b	135.1a	79.2a	0.22a	0.16a	0.0232a	0.0036a	0.05a	0.002b

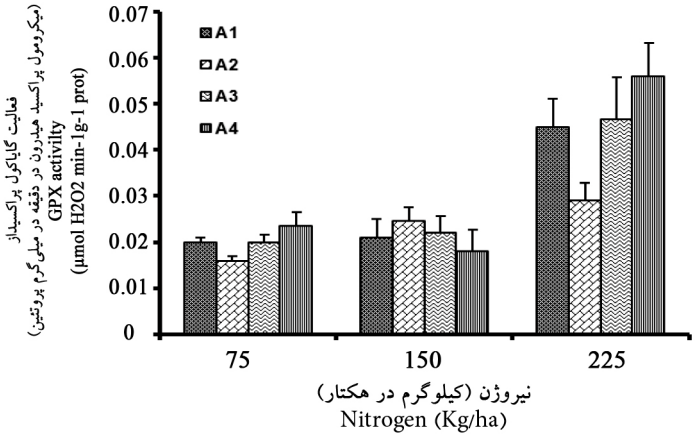
در هر ستون و برای هر تیمار که دارای حرف مشترک هستند، در سطح احتمال پنج درصد تفاوت معنی‌داری ندارند

Means, in each column and for each treatment, followed by at least one similar letter are not significantly different at 5% probability level



شکل ١- اثر متقابل آرسنیک و نیتروژن بر میزان فعالیت آنزیم کاتالاز برگ‌های گلرنگ.

Figure 1. Interaction between nitrogen and arsenic on catalase activity (CAT) in leaves of safflower plants.



شکل ٢- اثر متقابل آرسنیک و نیتروژن بر میزان فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز برگ‌های گلرنگ.

Figure 2. Interaction between nitrogen and arsenic on gayacol peroxidase activity (GPX) in leaves of safflower plants.

عناصر معدنی پتاسیم، فسفر و سدیم در دو بخش هوایی و دانه: نتایج تجزیه آماری داده‌ها در جدول ٢ نشان داد، تیمار آرسنیک در بین عناصر مورد مطالعه، تنها تاثیر معنی‌دار بر غلظت عناصر پتاسیم و سدیم آن‌هم در بخش هوایی دارا و در سایر موارد از تاثیر معنی‌داری برخودار نبود. با افزایش غلظت آرسنیک در

محیط ریشه از میزان پتاسیم در بخش هوایی گلرنگ کاسته و بر مقدار سدیم افزوده شد. بیشترین میزان پتاسیم در تیمار شاهد و سدیم در تیمار ٦٠ میلی‌گرم در کیلوگرم خاک حاصل شد (جدول ٣).

یکی از اثرات سوء عناصر سنگین در گیاهان، کاهش سرعت رشد، کاهش میزان تعرق و جذب عناصر غذایی است. در بین عناصر سنگین، عناصری همانند کادمیوم و آرسنیک سبب تداخل در انجام فرآیندهای جذب در ریشه شده و نیز باعث کاهش هدایت روزنه‌ای در برگ‌های گیاهان می‌شوند. در نتیجه از جذب آب و عناصر غذایی در ریشه‌ها کاسته می‌شود (٦). گیاهان در این شرایط از عناصری همانند پتاسیم و ترکیبات آلی نظیر پرولین و قندها جهت افزایش غلظت در سلول‌های ریشه استفاده می‌کنند تا شرایط لازم برای بهبود جذب آب و عناصر غذایی فراهم نمایند (٢٠).

تیمار کودی نیتروژن در این مطالعه، تنها تاثیر معنی‌دار بر غلظت عناصر پتاسیم و سدیم آن‌هم در بخش دانه‌ها داشت. در این بین اثر متقابل آرسنیک و نیتروژن در مورد غلظت عناصر در هیچکدام از موارد مورد مطالعه تاثیر معنی‌داری نداشت (جدول ٢). مقایسه میانگین داده‌ها نشان داد با بالا رفتن میزان نیتروژن مصرفی از ٧٥ به ٢٢٥ کیلوگرم در هکتار بر میزان پتاسیم موجود در دانه‌ها افزوده و از مقدار سدیم کاسته شد (جدول ٣). استال و همکاران (١٩٩١) معتقدند که یکی از اثرات افزایش نیتروژن در محیط ریشه، افزایش جذب یون‌ها می‌باشد (٢٢). بنابراین چنین به‌نظر می‌رسد که نیتروژن می تواند سبب یک افزایش نسبی در میزان جذب سایر عناصر غذایی گردد. از دیگر اثرات نیتروژن می‌توان به افزایش فعالیت متابولیک گیاه و تسریع در نقل و انتقال مواد در درون اندام‌های گیاهان اشاره کرد. وانر و مارشال (١٩٩٢) اعلام کردند بعضی از اثرات تحریک کنندگی نیتروژن بر رشد رویشی مربوط به بالا بردن درجه اسیدی خاک است. براساس نظر این محققین، مقدار بالای نیتروژن در خاک جذب عناصر پتاسیم و منگنز را در گیاهان افزایش می‌دهد. در صورتی که جذب عنصر روی در غلظت پائین نیتروژن به حداکثر خود می‌رسد (٢٧).

نتیجه‌گیری کلی

بر اساس نتایج به‌دست آمده در این آزمایش می‌توان بیان کرد که آرسنیک به‌عنوان یکی از عناصر سنگین سبب تغییراتی در واکنش‌های فیزیولوژیکی گیاه گلرنگ (رقم گلدشت) گردید. در این بین تاثیر آن تا سطح ٩٠ میلی‌گرم در کیلوگرم خاک، بر صفات فیزیولوژیکی همانند رنگیزه‌های درگیر در فتوسنتز چشمگیر نبود. در حضور آرسنیک بر میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدان افزوده شد،

بطوری که در بین آنزیم‌های آنتی اکسیدان، آرسنیک سبب افزایش دو آنزیم GPX و APX در این گیاه شد. همچنین آرسنیک بدون تاثیر معنی‌دار بر میزان جذب و تجمع فسفر در دو بخش هوایی و دانه تنها سبب کاهش میزان پتاسیم در بخش هوایی این گیاه گردید. در مقابل استفاده از نیتروژن تا سطح ۲۲۵ کیلوگرم در هکتار با بهبود برخی از صفات فیزیولوژیکی همانند رنگیزه‌های فتوسنتزی (کلروفیل a، کلروفیل b و کارتنوئید) و افزایش جذب فسفر و پتاسیم، مانع تاثیر سوء آرسنیک بر این گیاه گردید.

منابع

1.Apel, K., and Hirt, H. 2004. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress and signal transduction. Plant Biol. 55: 373-399.

2.Arnon, A.N. 1967. Method of extraction of chlorophyll in the plants. Agron. J. 23:112-121.

3.Azevedo, H., Gomes, C., Pinto, G., and Santos, C. 2005. Cadmium effects in sunflower: nutritional imbalances in plants and calluses. J. Plant Nut. 28: 2221–2231.

4.Azizpour, K., Shakiba, M., Khosh Kholgh Sima, N., Alyari, H., Moghaddam, M., Esfandiari, E., and Pessarakli, M. 2010. Physiological response of spring durum wheat genotypes to salinity. J. Plant Nut. 33 (6): 859-873.

5.Babula, P., Adam, V., Opatrilova, R., Zehnalek, J., Havel, L., and Kizek, R. 2008. Uncommon heavy metals, metalloids and their plant toxicity: a review. Environ. Chem. Lett. 6: 189-213.

6.Barcelo, J., and Poschenreider, C. 1990. Plant water relations as affected by heavy metals: a review. J. Plant Nut. 13: 1–37.

7.Beers, G.R., and Sizer, I.V. 1952. A spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase. Biol. Chem. 195:133-140.

8.Ghasemi, M., Moghaddasi, M.S., and Omidi, A.H. 2012. The effects of biological and chemical nitrogen fertilizers on agronomical traits of winter safflower cultivars in Saveh region of Iran. Ann. Biol. Res. 3: 5141-5144.

9.Gilbert, N.W., and Tucker, T.C. 1967. Growth, yield and yield components of safflower as affected by source, rate, and time of application of nitrogen. Agron. J. 59: 54-56.

10.Gomez-Caminero, A., Howe, P., Hughes, M., Kenyon, E., Lewis, D.R., Moore, M., and Ng, J. 2001. Arsenic and Arsenic Compounds. Report on carcinogens, Thirteenth Edition, Pp: 591-594.

11.Grant, C.A., and Bailey, L.D. 1993. Fertility management in canola production. Can. J. Plant Sci. 73: 651-671.

12.Lin, T., Zhu, X., and Zhang, F. 2012. The Interaction effect of cadmium and Nitrogen on *Populus yunnanensis*. J. Agri. Sci. 4 (2):125-134.

13.Logan, B.A., Demmig-Adams, B., Rosenstiel, T.N., and Adams, W.W. 1999. Effect of nitrogen limitation on foliar antioxidants in relationship to other metabolic characteristics. Planta. 299: 213–220.
14.Miteva, E., and Merakchiyska, M. 2002. Response of chloroplasts and photosynthetic mechanism of bean plants to excess arsenic in soil. Bulg. J. Agric. Sci. 8: 151-156.
15.Mocquot, B., Van Gronsveld, J., Clijsters, H., and Mench, M. 1996. Copper toxicity in young maize (*Zea mays* L.) plants: effect on growth, mineral and chlorophyll contents and enzyme activities. Plant and Soil. 182: 287-300.
16.Nakano, Y., and Asada, K. 1981. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate specific peroxidases in spinach chloroplasts. Plant cell physiol. 22:867-880.
17.Peng, S., Sanico, A.L., Grrcia, F.V., Laza, R.C., Visperas, R.M., Descalsota, J. P., and Cassman, K. 1999. Effect of leaf phosphorus and potassium concentration on chlorophyll meter reading in rice. Plant Prod. Sci. 2: 227-231.
18.Rajput, R., and Gautam, D. S. 1992. Relative performance of safflower varieties with different levels of nitrogen under rainfed condition. Indian J. Agro. 37: 290-292.
19.Salas, M.L., Hickman, M.V., Huber, D.M., and Schreiber, M.M. 1997. Influence of nitrate and ammonium nutrition on the growth of giant foxtail (*Setaria faberi*). Weed Sci. 45: 664–669.
20.Salt, D., Price, R., Pickering, I., and Raskin, I. 1995. Mechanisms of cadmium mobility and accumulation in Indian mustard. Plant Physiol. 109: 1427–1433.
21.Singh Sushant, K., and Ghosh, A.K. 2010. Effect of Arsenic on Photosynthesis, Growth and its Accumulation in the Tissues of *Allium cepa* (Onion). Environ. Eng. Manag. J. 1(1): 39-50
22.Staal, M.F., Maatheusis, J.M., and Elzennga, T.M. 1991. $^{Na+}/_{K+}$ antiport activity in tonoplast vesicles from roots of the salt tolerant *plantago maritina* and the salt sensitive *Plantago media*. Plant Physiol. 82: 164-179.
23.Strasil, Z., and Vorlicek, Z. 2002. The effect of nitrogen fertilization, sowing rates and site on yields and yield components of selected varieties of safflower (*Carthamus tinctorius* L.). Rost Vyroba. 48: 307-311.
24.Stoeva, N., and Bineva, T. 2003. Oxidative changes and photosynthesis in OAT plants grown in As-conttaminated Soil. Bulg. J. Plant Physiol. 29(1-2): 87-95.
25.Stoeva, N., Berova, M., and Zlatev, Z. 2005. Effect of arsenic on some physiological parameters in bean plants. Biol. Plant. 49: 293-296.
26.Tu, C., Ma, L.Q., and Bondada, B. 2002. Arsenic accumulation in the hyperaccumulator chinese brake and its utilization potential for phytoremediation. J. Environ. Qual. 31: 1671-1675.
27.Vannier, H., and Marchal, J. 1992. Effect of mineral nutrition on mineral composition of leaves of Clemantin. Fruit Paris. 19: 32-36.

28. Varvel, G.E., Schepers, J.S., and Francis, D.D. 1997. Ability for in season correction of nitrogen deficiency in corn using chlorophyll meters. Soil Sci. Soc. Am. J. 61: 1233-1239.
29. Urbanek, H., Kuzniak–Gebarowska, E., and Herka, K. 1991. Elicitation of defense responses in bean leaves by *Botrytis cinerea* polyglacturonase. Acta Physiol. Plant. 13: 43–50.
30. Walker, A.J. 2001. The effects of soil fertilizer, nitrogen and moisture on yield, oil and protein of flaxseed. Field Crop Res. 932: 101-114.
31. Wu, F.B., and Zhang, G.P. 2002. Alleviation of cadmium-toxicity by application of zinc and ascorbic acid in barley. J. Plant Nut. 25: 2745-2761.
32. Zhong-Qiu, Z., Youg-Guan Zhu, L., Smith, F.A., and Smith, F.A. 2004. Effects of forms and rate of potassium fertilizers on cadmium uptake by spring canola and spring wheat. Environ. Int. 29(7): 973-978.