

اثر مقادیر مختلف نیکل بر برخی پارامترهای فیزیولوژیکی و سنتز ترکیب‌های ثانویه در گیاه بنگ‌دانه (*Hyoscyamus niger* L.)

طیبه حیدری^۱، زهرا اسرار^۲ و فاطمه نصیبی^{۳*}

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه زیست‌شناسی، دانشگاه شهید باهنر کرمان

۲- دانشیار، گروه زیست‌شناسی، دانشگاه شهید باهنر کرمان

۳- نویسنده مسئول، استادیار، گروه زیست‌شناسی، دانشگاه شهید باهنر کرمان، پست الکترونیک: nasibi2002@yahoo.com

تاریخ پذیرش: مرداد ۱۳۹۱

تاریخ اصلاح نهایی: مرداد ۱۳۹۱

تاریخ دریافت: اسفند ۱۳۹۰

چکیده

یکی از روشهای افزایش ترکیب‌های ثانویه در گیاهان استفاده از محرک‌های غیرزیستی است. در این بررسی اثر فلز سنگین نیکل به‌عنوان یک محرک غیرزیستی بر برخی پارامترهای فیزیولوژیکی گیاه بنگ‌دانه (*Hyoscyamus niger* L.) مورد مطالعه قرار گرفت تا امکان استفاده از غلظت‌های غیرتنشی آن در مطالعات بعدی برای افزایش ترکیب‌های ثانویه مورد آزمایش قرار گیرد. این پژوهش در آزمایشگاه تحقیقاتی گروه زیست‌شناسی دانشگاه شهید باهنر کرمان در قالب یک طرح کاملاً تصادفی با سه تیمار و ۳ تکرار انجام شد. در این بررسی بذرهای گیاه بنگ دانه در ژرمیناتور و با اعمال تیمار ژیرلین جوانه زدند و بعد به گلدان‌های حاوی پیت‌ماس و شن منتقل شدند. پس از ۴۰ روز رشد، گیاهان تحت تأثیر غلظت‌های ۵۰ و ۱۰۰ میکرومولار نیکل در شرایط آبکشت قرار گرفتند (مقادیر نیکل به محلول غذایی اضافه گردید). در این بررسی رنگیزه‌های فتوسنتزی تحت تأثیر نیکل کاهش معنی‌داری را نشان دادند. اما مقدار پراکسید هیدروژن، پراکسیداسیون لیپید و فعالیت آنزیم‌های کاتالاز، گایاکول پراکسیداز و آسکوربات پراکسیداز افزایش یافت. بررسی‌های انجام شده بر روی ماکرومولکول‌های اصلی گیاه مانند پروتئین‌ها، لیپیدهای غشایی و کلروفیل نشان داد که اثر غلظت‌های ۵۰ و ۱۰۰ میکرومولار نیکل در ایجاد تنش بر این مولکول‌ها تقریباً مشابه است، اما فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیا لیاز و سنتز ترکیب‌های پلی‌فنلی از پاسخ‌های بعدی گیاه هستند که در غلظت ۱۰۰ میکرومولار نیکل مشاهده می‌شوند. بنابراین به نظر می‌رسد که غلظت‌های بالاتر نیکل (۱۰۰ میکرومولار) برای افزایش ترکیب‌های ثانویه در این گیاه مؤثرتر بوده است.

واژه‌های کلیدی: آسکوربات پراکسیداز، ترکیب‌های فنلی، تنش اکسیداتیو، رنگیزه‌های فتوسنتزی، فنیل آلانین آمونیا لیاز.

مقدمه

روشهای افزایش این ترکیب‌های ثانویه استفاده از محرک‌های زیستی و غیرزیستی در گیاهان است (Spollansky et al., 2000). از آنجایی که بسیاری از این ترکیب‌ها نقش دفاعی در گیاهان دارند و مسیرهای آنزیمی تولید آنها بسیار القایی هستند، بنابراین قرار گرفتن گیاه در معرض این تنش‌ها باعث افزایش این ترکیب‌ها می‌گردد (Ebel & Cosio, 1994). استفاده از این محرک‌ها در صورتی مفید است که آسیب جدی به

گیاهان از مهمترین منابع تولید ترکیب‌های بیوشیمیایی و دارویی هستند اما مقادیر این ترکیب‌ها اغلب در گیاهان کم می‌باشد و در بسیاری از موارد ترکیب‌های دیگری وجود ندارد که جایگزین این مشتقات گیاهی شوند (Dechoux & Boitel-Conti, 2005). بنابراین استفاده از روشهایی که بتواند مقادیر این ترکیب‌ها را در گیاهان افزایش دهد از اهمیت زیادی برخوردار است. یکی از

گیاه وارد نکند (Karimi & Khataee, 2012). این مسئله در مورد ترکیب‌های دارویی مثل آلکالوئیدها، فنیل پروپانوئیدها و ترپنوئیدها به خوبی مشخص شده است. به عنوان مثال در *Brugmansia candida* گزارش شده است که جاسمونیک اسید و آلومینیوم باعث افزایش تروپان آلکالوئیدها گردیده است (Spollansky et al., 2000). همچنین گزارش کرده اند که آلومینیوم به عنوان محرک غیرزیستی مقادیر تروپان آلکالوئیدها را در گیاه *Datura innoxia* افزایش داده است (Karimi & Khataee, 2012). آلودگی فلزات سنگین در خاک، بسیاری از فرایندهای رشد و نمو گیاهان را تحت تأثیر قرار می‌دهد و مانع بسیاری از فعالیت‌های آنزیمی و متابولیکی در گیاهان می‌شود، در عین حال ممکن است به عنوان یک محرک غیرزیستی باعث افزایش ترکیب‌های ثانویه در گیاه گردد. یکی از مهمترین فلزات سنگین از لحاظ سمیت در گیاهان و حیوانات، نیکل است (Poulik, 1999). نیکل جزو ساختار اوره‌آز است و کاهش آن باعث غیرفعال شدن اوره‌آز می‌شود، اما مقدار مصرف آن برای گیاه بسیار کم است. در بعضی از بقولات مقدار کم نیکل برای رشد گره‌های ریشه و فعالیت آنزیم هیدروژناز ضروریست (Seregin & Kozhevnikova, 2005)، اما افزایش نیکل در خاک ممکن است باعث ایجاد سمیت در گیاه شود. از اولین آثار سمی نیکل در گیاه، پراکسید شدن لیپیدهای غشایی است که این امر با تغییر ساختار غشای سلول‌ها، موجب بازدارندگی رشد گیاه می‌شود (Panda et al., 2003). محققان گزارش کرده‌اند که کاهش فتوسنتز توسط نیکل به دلیل اختلال در ساختار کلروپلاست، کلروفیل، انتقال الکترون، جلوگیری از فعالیت آنزیم‌های سیکل کلوین و کاهش نفوذ CO_2 به دلیل بسته شدن روزنه می‌باشد (Seregin & Ivanov, 2001). به نظر می‌رسد که اثرات سمی نیکل بر گیاهان ناشی از تولید انواع گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) مانند آنیون سوپراکسید (O_2^-)، پراکسید (O_2)، و رادیکال هیدروکسیل (OH^\cdot) نیز باشد (Chen et al., 2009). اما سلول‌های گیاهی برای حفاظت در مقابل آسیب‌های اکسیداتیو، مجهز به یک سیستم حفاظت‌کننده در برابر رادیکال‌های آزاد می‌باشند. این سیستم شامل آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان مانند کاتالاز (CAT) و

گیاه‌هاکول پراکسیداز (GPOX)، سوپراکسید دیسموتاز (SOD)، گلوکوتاتیون پراکسیداز (GSH-PX)، گلوکوتاتیون ردوکتاز (GR) و آسکوربات پراکسیداز (APX) و نیز سیستم غیرآنزیمی شامل توکوفرول، کاروتنوئید، فنل‌ها، اسید آسکوربیک، گلوکوتاتیون و پرولین می‌باشند (Wang et al., 2010). بنگ‌دانه با نام علمی *Hyoscyamus niger* متعلق به تیره Solanaceae است و در زمره گیاهان دارویی است. بنگ دانه دارای مخلوطی از آلکالوئیدهای مهم شامل هیوسیامین، هیوسین یا اسکوپولامین و مقدار کمی آتروپین است. ماده سمی هیوسیامین موجود در این گیاه ماده‌ای مخدر و مسکن است. برای استفاده از محرک‌های زیستی و غیرزیستی ابتدا باید اثرات آنها و محدوده استفاده از آن در هر گیاهی مورد آزمایش قرار گیرد. در این بررسی اثر فلز سنگین نیکل به عنوان یک محرک غیرزیستی بر برخی پارامترهای فیزیولوژیکی گیاه بنگ دانه مورد مطالعه قرار گرفت تا امکان استفاده از غلظت‌های غیرتنشی آن در مطالعات بعدی برای افزایش ترکیب‌های ثانویه مورد آزمایش قرار گیرد.

مواد و روشها

گیاه مورد مطالعه در این پژوهش، گیاه بنگ دانه (*Hyoscyamus niger*) بود. جوانه‌زنی بذرهای گیاه مورد نظر در ژرمیناتور با دمای ۲۶ درجه سانتی‌گراد و رطوبت ۶۰-۵۰ درصد و دوره نوری ۸-۱۶ و شدت نور تقریباً ۵۰۰۰ لوکس انجام شد. بذرهای گیاه ابتدا به مدت ۲۴ ساعت در ژیرلین با غلظت ۲۵۰ ppm خیس‌انده شدند و بعد به ظروف پتری منتقل گردیدند. بذرهای جوانه‌زده به گلدان‌های حاوی پیت ماس و شن انتقال داده شدند. پس از اینکه برگ‌های لپه‌ای کاملاً توسعه پیدا کردند، هفته‌ای یک بار با محلول غذایی لانگ اشتون با غلظت نصف محلول اصلی (یک دوم) آبیاری گردیدند. گیاهان پس از ۴۰ روز رشد برای اعمال تیمار از گلدان‌ها خارج شدند، ریشه‌های آنها با آب خوب شسته شدند و به منظور کنترل شرایط محیط کشت، گیاهان در ظروف حاوی محلول غذایی قرار گرفتند. محیط کشت این ظروف با استفاده از پمپ آکواریوم روزانه هوادهی می‌شدند. پس از ۲۴ ساعت گیاهان از محلول‌ها خارج و در محلول‌های

آنزیم برحسب مقدار سینامیک اسید تولید شده تخمین زده شد (D'cunha *et al.*, 1996). یک واحد فعالیت آنزیمی به عنوان ۱ میکرومول سینامیک اسید تولید شده در مدت ۱ دقیقه به ازای هر میلی گرم پروتئین در نظر گرفته شد. برای محاسبه مقدار سینامیک اسید تولید شده از منحنی استاندارد سینامیک اسید استفاده شد.

سنجش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان

اندازه‌گیری فعالیت آنزیم کاتالاز (CAT): فعالیت کاتالاز با روش اسپکتروفتومتری و براساس کاهش جذب پراکسید هیدروژن در مدت ۳۰ ثانیه در طول موج ۲۴۰ نانومتر اندازه‌گیری شد (Dhindsa *et al.*, 1981).

اندازه‌گیری فعالیت گایاکول پراکسیداز (GPX): فعالیت آنزیم پراکسیداز با استفاده از پیش‌ماده گایاکول اندازه‌گیری شد. افزایش جذب به دلیل اکسیداسیون گایاکول در طول موج ۴۷۰ نانومتر به مدت ۳ دقیقه اندازه‌گیری شد. مقدار تترآگایاکل تشکیل شده با استفاده از ضریب خاموشی تترآگایاکل ($25.5 \text{mM}^{-1} \text{Cm}^{-1}$) و فرمول $A = \epsilon bc$ محاسبه گردید (Plewa *et al.*, 1991).

اندازه‌گیری فعالیت آسکوربات پراکسیداز (APX)

فعالیت آسکوربات پراکسیداز با استفاده از اسپکتروفتومتر و براساس اکسیداسیون آسکوربات اندازه‌گیری شد (Nakano & Asada, 1981). در این روش مقدار آسکوربات اکسید شده با استفاده از ضریب خاموشی معادل $2.8 \text{mM}^{-1} \text{Cm}^{-1}$ محاسبه گردید.

سنجش مقدار پروتئین کل

محتوای پروتئین کل با روش Bradford (۱۹۷۶) و استفاده از آلبومین گاوی به عنوان استاندارد اندازه‌گیری شد.

سنجش محتوای پلی فنل کل (Total polyphenols)

محتوای پلی فنل کل براساس روش Gao و همکاران (۲۰۰۰) و با استفاده از معرف فولین اندازه‌گیری شد. برای محاسبه غلظت فنل‌های محلول از منحنی استاندارد اسید گالیک استفاده گردید و نتایج برحسب میلی گرم در گرم وزن تر ارائه شد.

غذایی تازه حاوی غلظت‌های ۵۰ و ۱۰۰ میکرومولار نیکل قرار گرفتند (در این مرحله گیاهان شاهد در محلول غذایی فاقد نیکل قرار گرفتند). پس از ۲۴ ساعت اعمال تنش نیکل، برگ‌های گیاهان در نیتروژن مایع فریز گردیدند و برای اندازه‌گیری‌های بعدی در فریزر -80°C قرار داده شدند.

سنجش میزان پراکسیداسیون لیپیدها

برای سنجش غلظت مالون‌دآلدئید (MDA)، 0.2 گرم از بافت تازه برگ‌گی در هاون چینی حاوی ۵ میلی لیتر تری کلرواستیک اسید (TCA) 0.1% ساییده شد. مقدار MDA به روش Heath و Packer (۱۹۶۸) اندازه‌گیری شد. برای محاسبه غلظت MDA از ضریب خاموشی معادل $1.55 \times 10^5 \text{M}^{-1} \text{Cm}^{-1}$ استفاده شد و نتایج حاصل از اندازه‌گیری بر حسب وزن تر محاسبه و ارائه گردید.

اندازه‌گیری مقدار پراکسید هیدروژن

مقدار پراکسید هیدروژن براساس واکنش پراکسید هیدروژن با دیدید پتاسیم (KI) انجام شد (Alexieva *et al.*, 2001).

اندازه‌گیری مقدار رنگیزه‌های فتوسنتزی

سنجش میزان کلروفیل و کاروتنوئید به روش Lichtenthaler (۱۹۸۷) انجام گردید.

سنجش فعالیت آنزیم‌ها

استخراج عصاره آنزیمی

0.5 گرم از برگ منجمد شده در بافر فسفات پتاسیم 50 میلی مولار ($\text{pH} = 7$) حاوی پلی وینیل پیرولیدین 1% و EDTA یک میلی مولار همگن گردیدند. همگنای حاصل در $20000 \times \text{g}$ به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفوژ گردید و بخش رویی برای سنجش آنزیم‌های مورد نظر برداشته شد.

سنجش فعالیت آنزیم فنیل آلانین آمونیا لایز (PAL)

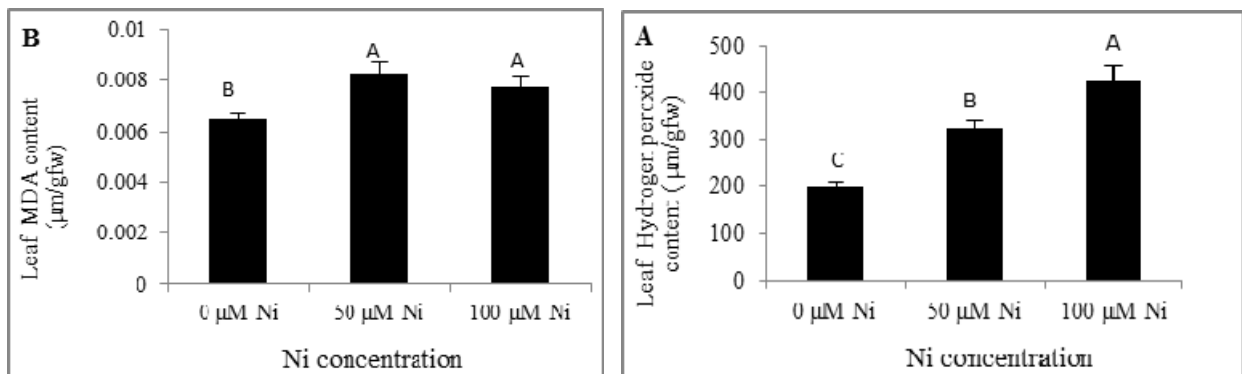
فنیل آلانین آمونیا لایز واکنش تبدیل فنیل آلانین به سینامیک اسید را کاتالیز می‌کند. در این روش از فنیل آلانین به عنوان پیش ماده آنزیم استفاده شد و فعالیت

تجزیه و تحلیل آماری

تمام تجزیه و تحلیل‌های آماری طبق طرح کاملاً تصادفی انجام گردید و تمام آزمایش‌ها با سه تکرار انجام شد. داده‌ها تحت آنالیز واریانس یک‌طرفه قرار گرفتند و اختلاف میانگین داده‌ها با آزمون دانکن و با سطح اطمینان ۹۵٪ مقایسه شدند.

نتایج

مقدار پراکسید هیدروژن و پراکسیداسیون لیپیدهای غشایی نتایج حاصل از اندازه‌گیری مقدار مالون‌دالدهید و پراکسید هیدروژن نشان داد که تیمار نیکل در غلظت‌های ۵۰ و ۱۰۰ میکرومولار باعث افزایش میزان پراکسیداسیون غشاء و تنش اکسیداتیو می‌گردد و میزان این آسیب‌ها با افزایش مقدار نیکل افزایش می‌یابد (شکل ۱).



شکل ۱- اثر غلظت‌های متفاوت نیکل بر مقدار پراکسید هیدروژن (A) و مقدار مالون‌دالدهید (B) در برگ‌های گیاه بنگ‌دانه

میانگین‌ها با آزمون دانکن مقایسه شدند. $p < 0.05$ به‌عنوان اختلاف معنی‌دار در نظر گرفته شد.

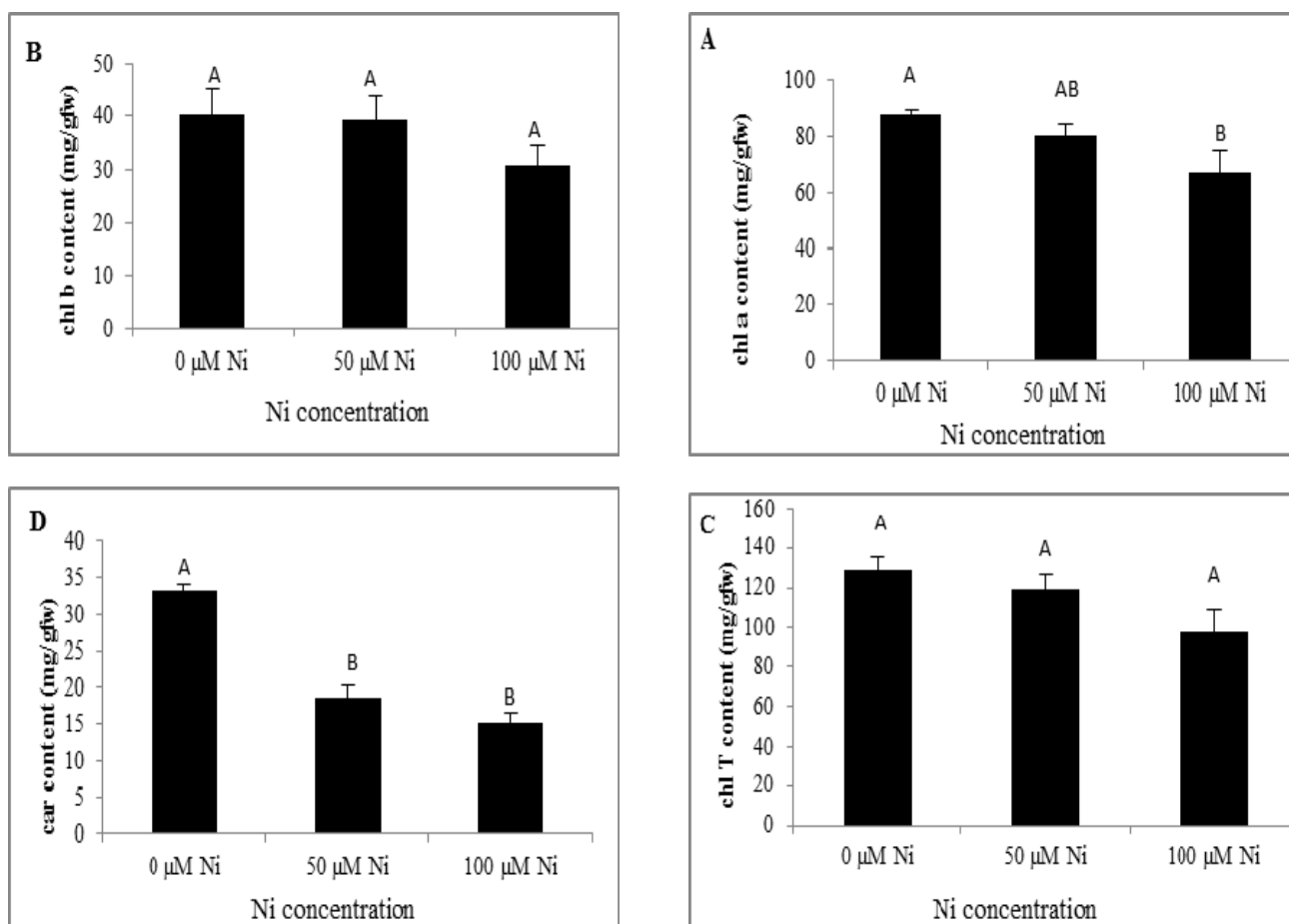
حروف متفاوت نشانه معنی‌دار بودن و حروف مشابه نشانه معنی‌دار نبودن داده‌ها در مجموعه تیمارها در مقایسه با یکدیگر است.

فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان

نتایج حاصل از اندازه‌گیری فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در شکل ۳ نشان داده شده‌است. همان‌طور که در شکل مشاهده می‌شود، تیمار گیاهان با ۵۰ میکرومولار نیکل تأثیر معنی‌داری بر فعالیت آنزیم APX نداشت اما فعالیت آنزیم‌های CAT و GPX را افزایش داد. در غلظت ۱۰۰ میکرومولار نیکل فعالیت هر سه آنزیم در گیاهان تحت تنش افزایش یافت.

محتوی کلروفیل و کاروتنوئید

همان‌طور که در شکل A-۲ مشاهده می‌شود تیمار گیاهان با فلز سنگین نیکل تنها در غلظت ۱۰۰ میکرومولار و فقط بر مقدار کلروفیل a تأثیر داشت و باعث کاهش مقدار آن گردید، اما بر محتوی کلروفیل b و کلروفیل کل تأثیر معنی‌داری نداشت. نتایج حاصل از مقایسه میانگین داده‌ها نشان داد که غلظت‌های ۵۰ و ۱۰۰ میکرومولار نیکل باعث کاهش مقدار کاروتنوئیدها در مقایسه با گیاه شاهد شده‌است.



شکل ۲- اثر غلظت‌های متفاوت نیکل بر مقدار کلروفیل a (A)، کلروفیل b (B)، کلروفیل کل (C) و کاروتنوئیدها (D)

در برگ‌های گیاه بنگ‌دانه

میانگین‌ها با آزمون دانکن مقایسه شدند. $p < 0.05$ به‌عنوان اختلاف معنی‌دار در نظر گرفته شد.

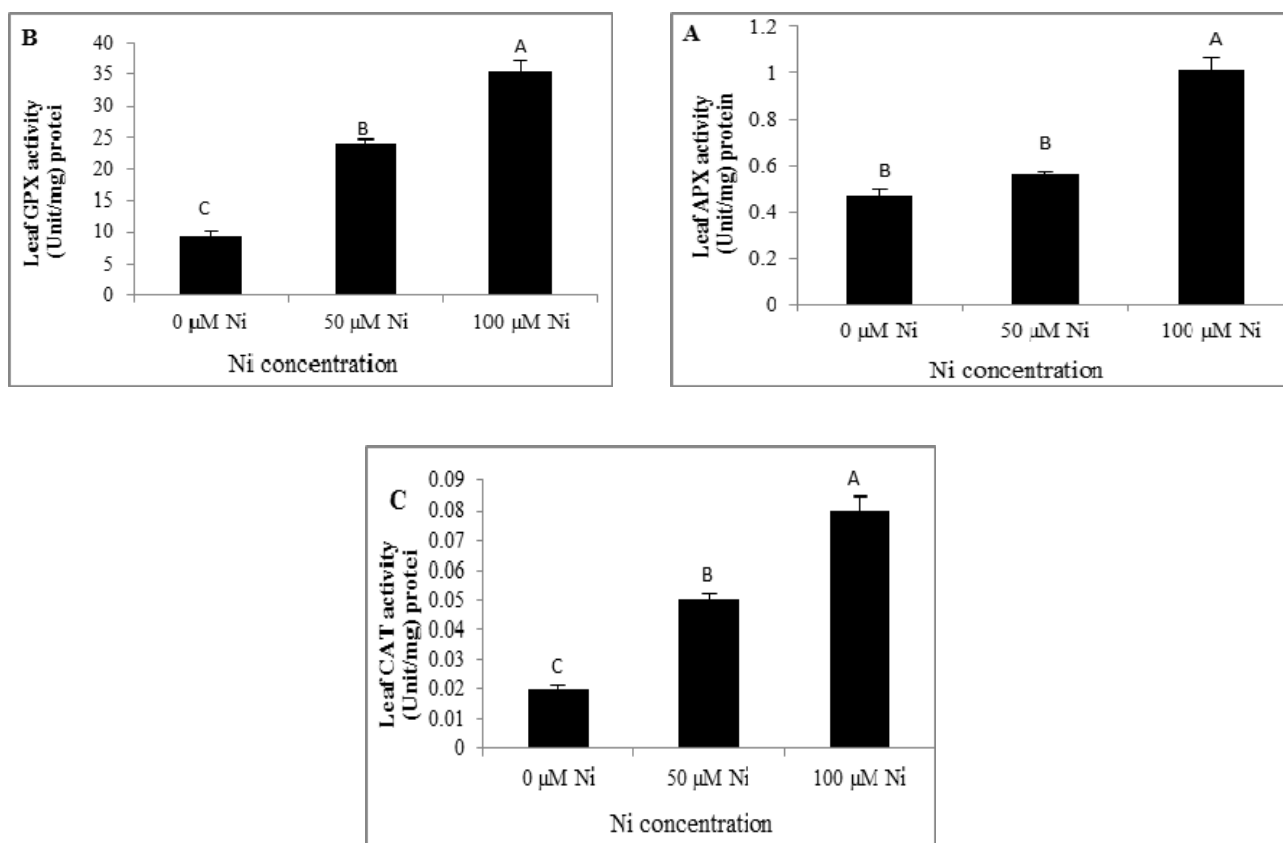
حروف متفاوت نشانه معنی‌دار بودن و حروف مشابه نشانه معنی‌دار نبودن داده‌ها در مجموعه تیمارها در مقایسه با یکدیگر است.

اندازه‌گیری مقدار پروتئین‌های محلول

همان‌طور که در شکل ۴ مشاهده می‌شود اندازه‌گیری محتوی پروتئین‌های محلول در گیاهان شاهد و تحت تیمار نیکل اختلاف معنی‌داری را نشان نداد.

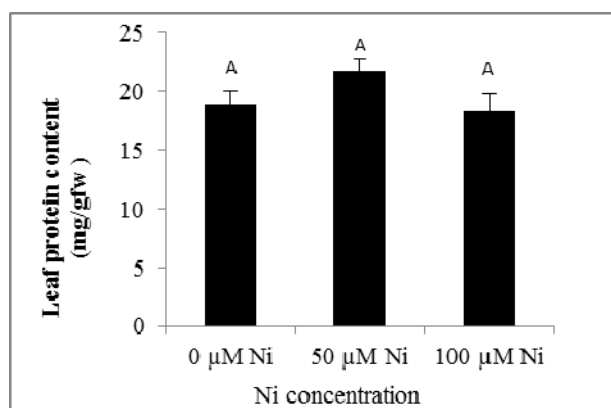
سنجش فعالیت آنزیم PAL و اندازه‌گیری ترکیب‌های پلی‌فنلی داده‌های حاصل از اندازه‌گیری ترکیب‌های فنلی و

فعالیت آنزیم PAL نشان داد که تنش نیکل در غلظت ۵۰ میکرومولار اثر معنی‌داری بر مقدار فنل‌ها و فعالیت آنزیم PAL نداشت اما در غلظت ۱۰۰ میکرومولار باعث افزایش معنی‌دار این پارامترها گردید (شکل ۵).



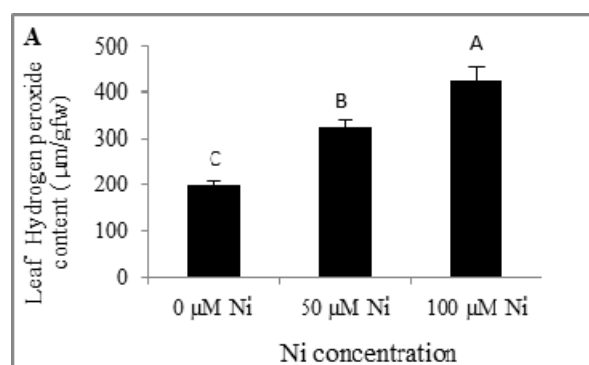
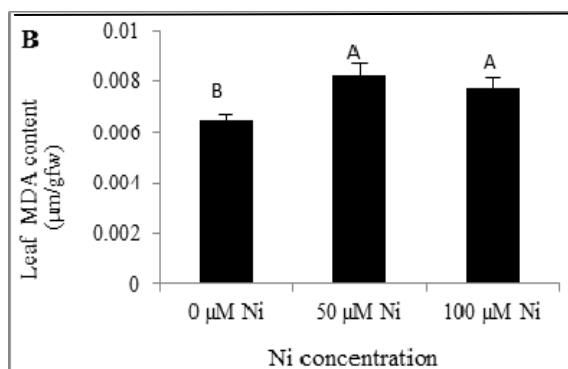
شکل ۳- اثر غلظت‌های متفاوت نیکل بر فعالیت آنزیم‌های APX، GPX و CAT در برگ‌های گیاه بنگ‌دانه

داده‌ها تحت تجزیه واریانس قرار گرفتند و میانگین‌ها با آزمون دانکن مقایسه شدند. $p < 0.05$ به‌عنوان اختلاف معنی‌دار در نظر گرفته شد. حروف متفاوت نشانه معنی‌دار بودن و حروف مشابه نشانه معنی‌دار نبودن داده‌ها در مقایسه با یکدیگر است.



شکل ۴- اثر غلظت‌های متفاوت نیکل بر مقدار پروتئین در برگ‌های گیاه بنگ‌دانه

میانگین‌ها با آزمون دانکن مقایسه شدند. $p < 0.05$ به‌عنوان اختلاف معنی‌دار در نظر گرفته شد. حروف متفاوت نشانه معنی‌دار بودن و حروف مشابه نشانه معنی‌دار نبودن داده‌ها در مجموعه تیمارها در مقایسه با یکدیگر است.



شکل ۵- اثر غلظت‌های متفاوت نیکل بر آنزیم PAL (A) و محتوی پلی فنل‌ها (B) در برگ‌های گیاه بنگ‌دانه میانگین‌ها با آزمون دانکن مقایسه شدند. $p < 0.05$ به‌عنوان اختلاف معنی‌دار در نظر گرفته شد. حروف متفاوت نشانه معنی‌دار بودن و حروف مشابه نشانه معنی‌دار نبودن داده‌ها در مجموعه تیمارها در مقایسه با یکدیگر است.

بحث

H_2O_2 در گیاه ذرت تحت تنش نیکل ۱۰۰ میکرومولار افزایش یافت (Mishra *et al.*, 2010). در تنش فلزات سنگین، اغلب خطر اکسیداتیو با تولید ROS همراه است که منجر به تجزیه غشاهای زیستی و پراکسیداسیون لیپیدهای غشایی می‌شود (Panda *et al.*, 2003). اندازه‌گیری محصولات نهایی پراکسیداسیون لیپید یکی از راه‌های تشخیص تنش اکسیداتیو است. رادیکال‌های آزاد اکسیژن با پراکسیداسیون اسیدهای چرب غیر اشباع، آلدئیدهایی مثل مالون‌دآلدئید تولید می‌کنند که این محصولات آلدئیدی معمولاً به‌عنوان شاخص تنش اکسیداتیو اندازه‌گیری می‌شوند (Shulaev & Oliver, 2006). بر طبق نظریه Baccouch و همکاران (۱۹۹۸) نیکل باعث ایجاد پراکسیداسیون لیپید می‌شود. تنش نیکل در غلظت ۵۰ و ۱۰۰ میکرومولار مقدار مالون‌دآلدئید را در گیاه مورد آزمایش افزایش داده‌است و این نشان می‌دهد که تنش نیکل در شرایط آزمایش منجر به خسارت به غشاء گردیده و پراکسیداسیون لیپیدها را تشویق نموده‌است.

فتوستنز نیز یکی از مهمترین فرایندهای فیزیولوژیکی گیاه می‌باشد که تحت تأثیر تنش‌های محیطی مانند تنش فلزات سنگین قرار می‌گیرد و زرد شدن در گیاهان معمولاً به‌عنوان یکی از علائم اصلی سمیت فلزات سنگین می‌باشد. در این پژوهش گیاهان تحت تیمار ۱۰۰

در شرایط عادی رشد، بسیاری از فرایندهای متابولیکی تولید ROS می‌کنند. گیاهان دارای سیستم‌های آنتی‌اکسیدانی پیچیده‌ای برای گریز از اثرات مضر ROS هستند. در شرایط تنش، تشکیل ROS بیشتر از توانایی گیاه برای بر طرف کردن آن است و در نتیجه منجر به صدمات اکسیداتیو، اکسید کردن رنگیزه‌های فتوستتزی و خسارت به لیپیدهای غشایی، پروتئین‌ها و اسیدهای نوکلئیک در گیاهان می‌شود (Laspina *et al.*, 2005).

پراکسید هیدروژن یکی از گونه‌های اکسیژن فعال محسوب می‌شود که به سرعت در عرض غشاء منتشر می‌شود و باعث اختلال در فرایندهای فیزیولوژیکی گیاه می‌گردد (Maksymiec, 2007).

پراکسید هیدروژن باعث اکسیداسیون گروه‌های SH و بازدارنده‌ی قوی چرخه کلوین است و در حضور کاتالیزورهای فلزی خاص یا کلاته‌های فلزی و از طریق واکنش‌های Haber-Weiss تولید رادیکال بسیار فعال OH° می‌نماید و سمیت خود را افزایش می‌دهد (Sudhakar *et al.*, 2001). در این پژوهش تیمار نیکل باعث افزایش معنی‌دار پراکسید هیدروژن در گیاه بنگ‌دانه شده‌است. افزایش پراکسید هیدروژن در گیاهان دیگر نیز تحت تأثیر تنش‌های مختلف گزارش شده‌است. به‌عنوان مثال میزان

است. برای بررسی نقش آنزیم‌های اکسیداتیو در برابر تنش در پژوهش حاضر فعالیت آنزیم‌های GPX و CAT و APX اندازه‌گیری شد. در این مطالعه مشاهده شد که تیمار نیکل باعث افزایش فعالیت این آنزیم‌ها می‌گردد. این آنزیم‌ها از خورنده‌های مهم پراکسید هیدروژن هستند. آنزیم کاتالاز در پراکسی‌زوم واقع شده و به نور حساس است بنابراین دامنه‌ی فعالیت آن برای سم‌زدایی پراکسید هیدروژن محدود است و آنزیم‌های دیگری نیز باید در سم‌زدایی سهیم باشند (Bowler *et al.*, 1994). گایاکول پراکسیداز و آسکوربات پراکسیداز از دیگر آنزیم‌هایی است که تحت شرایط تنش، در پاک‌سازی سلول از پراکسید هیدروژن شرکت می‌کنند. مشاهده شده‌است که فعالیت آنزیم‌های APX و GPX در اندام هوایی و ریشه گیاه جو تحت تنش نیکل افزایش یافته‌است (Jocsak *et al.*, 2008). همچنین گزارش شده‌است که فعالیت آنزیم‌های پراکسیداز، آسکوربات پراکسیداز و سوپراکسید دیسموتاز در گیاهان ذرت تحت تنش نیکل ۱۰۰ میکرومولار نسبت به گیاهان شاهد افزایش یافته‌است (Mishra *et al.*, 2010).

تجمع ترکیب‌های فنلی در گیاهان در پاسخ به تنش‌های زیستی و غیرزیستی متعددی گزارش شده‌است. این ترکیب‌ها به‌عنوان آنتی‌اکسیدان شناخته شده‌اند که با سازوکارهای متعددی مثل خوردگی رادیکال آزاد، دادن هیدروژن، خاموش کردن اکسیژن یکتایی، شلات کردن یون‌های فلزی و یا قرار گرفتن به‌عنوان سوبسترای آنزیم‌های پراکسیداز نقش آنتی‌اکسیدانی خود را ایفا می‌کنند. همچنین پلی‌فنل‌ها در سم‌زدایی پراکسید هیدروژن بسیار اهمیت دارند (Hamilton *et al.*, 1997)؛ (Chu *et al.*, 2000). افزایش میزان ترکیب‌های پلی‌فنلی در گیاه *Albizia procera* تحت تنش کادمیوم و آرسنیک نیز گزارش شده‌است (Pandey & Tripathi, 2011). نتایج حاصل از اندازه‌گیری فعالیت آنزیم PAL که در شکل ۵ مشاهده شد نشان می‌دهد که فعالیت آنزیم در گیاهان تحت تنش نیکل ۱۰۰ میکرومولار افزایش یافته و این با افزایش ترکیب‌های فنلی در این تیمارها همخوانی دارد. افزایش فعالیت آنزیم PAL که اولین مسیر بیوسنتز فنل‌ها است در بسیاری از تنش‌ها گزارش شده‌است (Dixon & Paiva, 1995). در گیاه بابونه تحت

میکرومولار نیکل کاهش معنی‌داری در مقدار کلروفیل a نشان دادند. اثر فلز نیکل در غلظت‌های ۵۰ و ۱۰۰ میکرومولار بر میزان کلروفیل کل و کلروفیل b معنی‌دار نبوده‌است. غلظت‌های ۵۰ و ۱۰۰ میکرومولار نیکل باعث کاهش مقدار کاروتنوئیدها در مقایسه با گیاه شاهد شده‌است. مشاهده شده که تنش مس نیز در برگ‌های جو تشکیل کلروفیل را متوقف کرده و موجب افزایش تخریب کاروتنوئیدها شده‌است (Lunna *et al.*, 1994). کاهش میزان کلروفیل می‌تواند به دلیل بازدارندگی مراحل مختلف بیوسنتز کلروفیل باشد. در سطح بیوشیمی اثر نیکل روی LHC II و گزارتوفیل‌ها و کاروتنوئیدها است. نیکل با ممانعت از بیوسنتز پروتئین‌های کمپلکس جمع‌کننده در سطح رونویسی، تشکیل این کمپلکس را مختل می‌کند (Chen *et al.*, 2009). پروتئین‌ها از دیگر ماکرومولکول‌هایی هستند که تحت تنش به سرعت تخریب می‌شوند. گزارش شده‌است که تنش فلزات سنگین باعث تولید ROS در گیاهان می‌شود و اولین پروتئین‌های هدف ROS در کلروپلاست، آنزیم‌های تیول‌دار می‌باشند که در تثبیت CO₂ نقش دارند و شامل آنزیم‌های فروکتوز-۱،۶-بیس فسفاتاز، گلیسرآلدئید فسفات دهیدروژناز و ربیولوز-۱،۵-بیس فسفات کیناز می‌باشند (Bortosz, 1997). مطالعات انجام شده در گیاهچه‌های برنج رشد یافته تحت تنش نیکل نیز نشان داده‌است که میزان پروتئین هم در اندام هوایی و هم در ریشه کاهش چشم‌گیری را نسبت به گیاهان کنترل داشته‌است (Maheshwari & Dubey, 2009). در پژوهش حاضر با وجود تنش اکسیداتیو و تخریب برخی پروتئین‌ها تفاوت معنی‌داری در مقدار پروتئین‌های برگ گیاهان تحت تنش نیکل مشاهده نشد. در این مطالعه به نظر می‌رسد که افزایش مقدار پروتئین در شرایط تنش مربوط به سنتز پروتئین‌های تنشی و برخی پروتئین‌های دفاعی مانند آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان باشد. سیستم آنتی‌اکسیدانی آنزیمی یکی از مکانیسم‌های اصلی سم‌زدایی فلزات سنگین در گیاهان می‌باشد. آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت نقش مهمی را در سازگاری و بقای گیاهان در طی دوره‌ی تنش ایفا می‌کنند (Foyer *et al.*, 1994؛ Dinakar *et al.*, 2008). میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت بسته به مدت و نوع تنش، گونه گیاهی و بخش‌های گیاه متفاوت

- Dechaux, C. and Boitel-Conti, M., 2005. A strategy for over accumulation of scopolamine in *Datura Innoxia* hairy root cultures. *Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica*, 47: 101-107.
 - Dhindsa, R.S., Dhindsa, P. and Thorpe, A.T., 1981. Leaf senescence correlated with increased levels of membrane permeability and lipid peroxidation and decrease levels of superoxide dismutase and catalase. *Journal of Experimental Botany*, 2: 93-101.
 - Dinakar, N., Nagajyothi, P.C., Suresh, S., Udaykiran, Y. and Damodharam, T., 2008. Phytotoxicity of cadmium on protein, proline and antioxidant enzyme activities in growing *Arachis hypogaea* seedlings. *Journal of Environmental Sciences*, 20(2): 199-206.
 - Dixon, R.A. and Paira, N.L., 1995. Stress induced phenylpropanoid metabolism. *Plant Cell*, 7(7): 1085-1097.
 - Ebel, J. and Cosio, E.G., 1994. Elicitors of plant defense responses: 1-36. In: Jeon, K.W. and Jarvik, J., (Eds.). *International Review of Cytology: A Survey of Cell Biology* (vol. 148). Academic Press, 319p.
 - Foyer, C.H., Descourviers, P. and Kunert, K.J., 1994. Protection against oxygen radicals: an important defense mechanism studied in transgenic plants. *Plant, Cell and Environment*, 17(5): 507-523.
 - Gao, X., Ohlander, M., Jeppsson, N., Bjork, L. and Trajkovski, V., 2000. Changes in antioxidant effects and their relationship to phytonutrients in fruit of sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* .L) during maturation. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 48(5): 1458-1490.
 - Guo, P., Cao, Y., Li, Z. and Zhao, B., 2004. Role of an endogenous nitric oxide burst in the resistance of wheat to stripe rust. *Plant, Cell and Environment*, 27(4): 473-477.
 - Hamilton, R., Kalu, C., Prisk, E., Padley, F. and Pierce, H., 1997. Chemistry of free radical in lipids. *Food Chemistry*, 60(2): 193-199.
 - Heath, R.L. and Packer, L., 1968. Photoperoxidation in isolated chloroplast: I. kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Archive of Biochemistry and Biophysics*, 125: 189-198.
 - Jocsak, I., Villanyi, V., Rabnecz, G. and Droppa, M., 2008. Investigation of nickel stress induction in terms metal accumulation and antioxidative enzyme activity in barley seedlings. *Acta Biologicae*, 52(1): 167-171.
 - Karimi, F. and Khataee, E., 2012. Aluminum elicits tropane alkaloid production and antioxidant system activity in micropropagated *Datura innoxia* plantlets. *Acta Physiologiae Plantarum*, 34(3): 1035-1041.
 - Kovacik, J. and Backor, M., 2007. Phenylalanine ammonia-lyase and phenolic compounds in chamomile tolerance to cadmium and copper excess. *Water, Air, and Soil Pollution*, 185: 185-193.
 - Laspina, N.V., Groppa, M.D., Tomaro, M.L. and Benavides, M.P., 2005. Nitric oxide protects sunflower leaves against Cd-induced oxidative stress. *Plant Sciences*, 169(2): 323-330.
 - Lichtenthaler, H.K., 1987. Chlorophylls and carotenoids, the pigments of photosynthetic
- تنش کادمیم و مس افزایش فعالیت PAL گزارش شده است (Kovacik & Backor, 2007). همکاران (۲۰۰۴) نیز افزایش فعالیت PAL را تحت تنش خشکی در برگ‌های گندم گزارش کرده‌اند. به‌عنوان نتیجه‌گیری کلی می‌توان گفت نتایج حاصل از این بررسی نشان می‌دهد که غلظت‌های انتخاب شده در این پژوهش ایجاد تنش اکسیداتیو نموده و دستگاه حمایتی گیاه در برابر آن واکنش داده‌است. با بررسی‌های انجام شده بر ماکرومولکول‌های اصلی گیاه مانند پروتئین‌ها، لیپیدهای غشایی و کلروفیل مشاهده شده‌است که اثر غلظت‌های ۵۰ و ۱۰۰ میکرومولار نیکل تفاوت زیادی در ایجاد تنش بر این مولکول‌ها ندارند، اما به نظر می‌رسد که فعالیت آنزیم PAL و سنتز ترکیب‌های ثانویه از پاسخ‌های بعدی گیاه هستند که در غلظت‌های بالاتر نیکل مشاهده می‌شوند. بنابراین به نظر می‌رسد که برای افزایش ترکیب‌های ثانویه در این گیاه غلظت ۱۰۰ میکرومولار مؤثرتر بوده‌است.

منابع مورد استفاده

- Alexieva, V., Sergiev, I., Mapelli, S. and Karanov, E., 2001. The effect of drought and ultraviolet radiation on growth and stress markers in pea and wheat. *Plant Cell Environment*, 24(12): 1337-1344.
- Baccouch, S., Chaoui, A. and El Fergani, E., 1998. Nickel-induced oxidative damage and antioxidant responses in *Zea mays* shoots. *Plant Physiology and Biochemistry*, 36(9): 689-694.
- Bortosz, G., 1997. Oxidative stress in plants. *Acta Physiologiae Plantarum*, 19: 47-64.
- Bowler, C., Van Camp, W., Van Montagu, M., Inze, D. and Asada, K., 1994. Super oxide dismutase in plants. *Critical Review in Plant Sciences*, 13(3): 199-218.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72: 248-254.
- Chen, C., Huang, D. and Liu, J., 2009. Functions and toxicity of nickel in plants: recent advances and future prospects. *Clean-Soil, Air, Water*, 37(4-5): 304-313.
- Chu, Y.H., Chang, C.L. and Hsu, H.F., 2000. Flavonoid content of several vegetable and their antioxidant activity. *Journal of Sciences of Food and Agriculture*, 80(5): 561-566.
- D'cunha, G.B., Satyanarayan, V. and Nair, P.M., 1996. Purification of phenylalanine ammonia lyase from *Rhodotorula glutinis*. *Phytochemistry*, 42: 17-20.

- activation of aromatic amines into mutagens by inhibiting tobacco cell peroxidase. *Mutation Research/ Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 247: 57-64.
- Poulik, Z., 1999. Influence of nickel contaminated soils on lettuce and tomatoes. *Scientiae Horticultural*, 81(3): 243-250.
 - Seregin, I.V. and Ivanov, V.B., 2001. Physiological aspects of cadmium and lead toxic effects on higher plants. *Russian Journal of Plant Physiology*, 48(4): 523-544.
 - Seregin, I.V. and Kozhevnikova, A.D., 2005. Physiological role of nickel and its toxic effect on higher plants. *Russian Journal of Plant Physiology*, 53(2): 257-277.
 - Shulaev, V. and Oliver, D.J., 2006. Metabolic and proteomic markers for oxidative stress. new tools for reactive oxygen species research. *Plant Physiology*, 141(2): 367-372.
 - Spollansky, T., Pitta-Alvarez, S.I. and Giulietti, A.M., 2000. Effect of jasmonic acid and aluminum on production of tropane alkaloids in hairy root cultures of *Brugmansia candida*. *Electronic Journal of Biotechnology*, 3: 72-75.
 - Sudhakar, C., Lakshmi, A. and Giridarakumar, S., 2001. Changes in the antioxidant enzyme efficacy in two high yielding genotypes of mulberry (*Morus alba* L.) under NaCl salinity. *Plant Sciences*, 161(3): 613-619.
 - Wang, S., He, X.J. and An, R.D., 2010. Responses of growth and antioxidant metabolism to nickel toxicity in *Luffa cylindrical* seedlings. *Journal of Animal and Plant Sciences*, 7(2): 810-821.
 - biomembranes. *Methods in Enzymology*, 148: 350-382.
 - Lunna, C.M., Gonzalez, C.A. and Trippi, V.S., 1994. Oxidative damage caused by an excess of copper in oat leaves. *Plant and Cell Physiology*, 35: 11-15.
 - Maheshwari, R. and Dubey, R.S., 2009. Nickel-induced oxidative stress and the role of antioxidant defense in rice seedlings. *Plant Growth Regulation*, 59: 37-49.
 - Maksymiec, W., 2007. Signaling responses in plants to heavy metal stress. *Acta Physiologiae Plantarum*, 29(3): 177-187.
 - Mishra, S., Panjwani, D., Mishra, B. and Sharma, P.N., 2010. Effect of excess nickel on induction of oxidative stress in *Zea mays* L. plants grown in solution culture. *International Journal of Toxicological and Pharmacological research*, 2: 10-16.
 - Nakano, Y. and Asada, K., 1981. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplast. *Plant and Cell Physiology*, 22(5): 867-880.
 - Panda, S.K., Chaudhury, I. and Khan, M.H., 2003. Heavy metal induced lipid peroxidation affects antioxidants in wheat leaves. *Biologiae Plantarum*, 46(2): 289-294.
 - Pandey, P. and Tripathi, A.K., 2011. Effect of heavy metals on morphological and biochemical characteristics of *Albizia procera* benth seedlings. *International Journal of Environmental Sciences*, 1(5): 1009-1018.
 - Plewa, M.J., Smith, S.R. and Wagner, E.D., 1991. Diethyldithiocarbamate suppresses the plant

Effect of different nickel amounts on some physiological parameters and secondary metabolite synthesis in *Hyoscyamus niger* L.

T. Heidari¹, Z. Asrar² and F. Nasibi^{3*}

1- MSc. Student, Department of Biology, Faculty of Sciences, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran

2- Department of Biology, Faculty of Sciences, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran

3*- Corresponding author, Biology Department, Faculty of Sciences, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran

E-mail: nasibi2002@yahoo.com

Received: March 2012

Revised: August 2012

Accepted: August 2012

Abstract

One of the methods employed to enhance plant secondary metabolite production is the use of abiotic elicitors in plants. In this research, the effect of heavy metal nickel as abiotic elicitors was studied on some physiological parameters in *Hyoscyamus niger* L. to investigate the use of unstressful concentration of this metal in order to increase secondary metabolite synthesis in later researches. This research was carried out in the Department of Biology of Shahid Bahonar University of Kerman in a complete randomized design with three treatments and three replicates. The seeds of *Hyoscyamus* germinated in germinator under gibberellin treatment and then were transferred to the pots of sand and peat. After 40 days of growth, the plants were treated with 50 and 100 μM nickel in hydroponics condition (nickel amounts were added to nutrient solution). According to the obtained results, photosynthetic pigments reduced under Ni treatment while hydrogen peroxide, lipid peroxidation and antioxidant enzymes activity increased. Investigation of Ni stress on main macromolecules such as protein, membrane lipids and chlorophyll showed that the effects of 50 and 100 μM Ni was same, while the PAL activity and polyphenols synthesis were the second responses of plants to stress observed in 100 μM concentrations. Therefore, it seems that the higher concentration of Ni (100 μM) was more effective for the increment of secondary metabolite in this plant.

Key words: Ascorbate peroxidase, phenolic compound, oxidative stress, photosynthetic pigments, phenylalanine ammonia lyase.