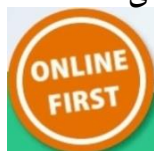


پاسخ انباشت عناصر و بیان ژن آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان گیاه رازیانه (*Foeniculum vulgare*) به اکسید نیکل نانو و توده ای

هیلتا بشارت^۱، رمضانعلی خاوری نژاد^۱، هما محمودزاده^{۲*} و خدیجه نژاد شاهرخ آبادی^۲



^۱ ایران، تهران، دانشگاه آزاداسلامی واحد علوم و تحقیقات، گروه زیست‌شناسی

^۲ ایران، مشهد، دانشگاه آزاداسلامی واحد مشهد، گروه زیست‌شناسی

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۷/۱۵ تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۱/۱۰

چکیده

استفاده گسترده و نامحدود از نانوذرات توجه محققان را به بررسی آثار محیطی آن‌ها جلب کرده است. در این پژوهش اثر اکسید نیکل نانو و توده‌ای بر انباشت عناصر و بیان ژن گیاه رازیانه بررسی شد. پس از کاشت گیاهان در شرایط گلخانه ای و تیماردهی با اکسید نیکل نانو و توده‌ای (۰، ۲۰، ۱۰۰، ۴۰۰ و ۸۰۰ ppm)، میزان عناصر مختلف در ریشه و برگ گیاه و بیان ژن زیر واحدهای آنزیم NADH-دهیدروژناز (ndhH, ndhD) با روش Real-Time PCR بررسی شد. نتایج نشان داد بیش‌ترین انباشت عناصر در گیاهان شاهد اتفاق افتاده و تیمارهای اعمال شده به خصوص ۲۰ ppm نانو از حرکت عناصر به برگ ممانعت نکرده و در این غلظت جابجایی عناصر به جز کلسیم و سدیم به برگ قابل توجه بود. همچنین اکسید نیکل توده‌ای اثر کاهشی بیش‌تری بر جذب عناصر نشان داد. افزایش بیان ژن ndhH در تمامی غلظت‌های نانو و توده‌ای در مقایسه با گروه شاهد مشاهده شد و بیش‌ترین افزایش مربوط به ۸۰۰ ppm بود. در رابطه با ژن ndh D کاهش بیان ژن، در غلظت‌های مختلف نانو و توده‌ای نسبت به شاهد مشاهده گردید که احتمالاً بدلیل دخالت مسیرهای سم‌زدائی دیگری در مقابل تنش ایجاد شده است. با توجه به موارد ذکر شده به نظر می‌رسد گیاه رازیانه پتانسیل مقاومت به اکسید نیکل نانو و توده‌ای را دارا می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: اکسید نیکل نانو، اکسید نیکل توده‌ای، Real-Time PCR، *Foeniculum vulgare*

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۵۱۳۸۴۳۵۰۵۰، پست الکترونیکی: h.mahmoodzadeh@mshdiau.ac.ir

مقدمه

بواسطه مدیریت بهینه مواد غذایی در کشاورزی است (۲۶). نانو ذرات با ورود و تجمع در توده زیستی گیاه، در محیط زیست انتقال می‌یابند، همچنین ممکن است به ریشه‌های گیاهان بچسبند و موجب سمیت فیزیکی و شیمیایی در گیاهان گردند (۱۳و۵).

غلظت بالای نیکل در محیط کشت گیاه با جذب بسیاری از مواد غذایی ضروری کم مصرف و پرمصرف مداخله می‌کند. هنگامی که گیاهان تحت تنش نیکل قرار می‌گیرند، ممکن است جذب مقادیر N، P، K و S را کاهش دهند. چنین کمبود مواد غذایی انتخابی می‌تواند فرآیندهای

موضوع اصلی که کشاورزی در جهان با آن مواجه می‌باشد، فقدان زمین حاصلخیز بدلیل آلودگی، بیابان‌زایی و تغییرات اقلیمی است. با توجه به ویژگی‌های فیزیکی-شیمیایی مواد نانو، تعجب آور نیست که تلاش برای بهبود کشاورزی، با استفاده از فناوری نانو و مواد نانو رو به گسترش است (۲۹). هدف ویژه استفاده از انواع مختلف مواد نانو ساخته شده از اکسیدهای فلزی، سرامیک‌ها، سیلیکات‌ها، مواد مغناطیسی، دندریمرها و امولسیون‌ها (۲۲) کاهش مقدار کاربرد محصولات محافظت از گیاه، به حداقل رساندن از دست دادن مواد مغذی در طول باروری و افزایش بازده

در سال ۲۰۲۰ چهاردولی و همکاران اثر نانوذرات اکسید نیکل را بر سیستم آنتی‌اکسیدانی سیاهدانه (*Nigella arvensis*) بررسی کردند و دریافتند با افزایش غلظت این ماده تا ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر، فعالیت آنتی‌اکسیدانی گیاه کاهش می‌یابد (۸). در تحقیقی دیگر بررسی تاثیر نانوذرات اکسید نیکل و اکسید نیکل توده ای بر دو گیاه *Spirodela polyrhiza* و *Lemna minor* نشان داد اثرات منفی نانو ذرات نیکل به ویژه در غلظت های بالا در هر دو گیاه بیشتر از ماده توده ای است (۳۱). Chung و همکاران (۲۰۱۹) در بررسی اثر نانو ذرات نیکل بر ویژگی های فیزیولوژیکی و تغییرات در سطح مولکولی گیاه *Brassica rapa* مشاهده کردند فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدان و بیان ژن های مرتبط با این آنزیم ها در غلظت های مختلف این نانو ذره افزایش یافت (۹).

رازیانه (*Foeniculum vulgare* Mill.) یک گیاه دارویی بسیار مهم می‌باشد. این گیاه متعلق به خانواده چتریان (Apiaceae) است. رازیانه به طور موثر در کنترل بسیاری از بیماری های عفونی، باکتریایی، قارچی، ویروسی، مایکوباکتریوم و پروتوزوا موثر است (۸). در سال‌های اخیر علاقه به کاشت رازیانه، به دلیل خاصیت دارویی و اسانس های آن، در مقیاس وسیع افزایش یافته است. به دلیل بررسی تاثیر نانوذرات بر ویژگی های گیاهان دارویی و از آنجایی که تاکنون مطالعات زیادی در ارتباط با تاثیر نانوذرات نیکل و اکسید نیکل توده ای بر این گیاهان انجام نشده است در این پژوهش آثار نانوذرات اکسید نیکل و اکسید نیکل توده ای بر تجمع عناصر و بیان ژن های آنزیم های آنتی اکسیدان گیاه رازیانه مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روشها

مواد گیاهی: بذرهای گیاه رازیانه (کد PBF-64) از شرکت پاکان بذر اصفهان تهیه شد. نانوذره NiO (کد US3355) از شرکت US Research Nanomaterials و NiO توده ای از شرکت Merck (کد ۱۱۲۲۷۷) تهیه گردید.

متابولیسم را متوقف کند و در نهایت باعث ایجاد سمیت نیکل در گیاهان شود (۱۲). هم‌چنین گزارش دادند که تنش نیکل می‌تواند به طور قابل توجهی جذب و انتقال کاتیون Na را در بافت گیاه کاهش دهد. علاوه بر این، نیکل به طور رقابتی یون‌های کلسیم را از جایگاه اتصال آن در کمپلکس اکسیژن حذف کرده و جایگزین یون Mg در رنگدانه کلروفیل می‌شود (۱۸).

برخی از فلزات مثل Fe، Cu، Zn و Mn به متالوآنزیم‌های خاصی نظیر سوپراکسید دیسموتاز (SOD) و کاتالاز (CAT) متصل هستند. بنابراین رقابت نیکل با عناصر دیگر ممکن است موجب کاهش بیوستز آنها شود (۳ و ۲۸). نیکل بعنوان یک فلز غیر فعال احیایی شناخته شده است. بنابراین، نمی‌تواند به طور مستقیم ROS تولید کند (۱۲). با این حال، فعالیت بسیاری از آنتی‌اکسیدان‌های غیرآنزیمی مانند گلوکاتایون و آنتی‌اکسیدان‌های آنزیمی نظیر سوپراکسید دیسموتاز (SOD)، کاتالاز (CAT)، آسکوربات پراکسیداز (APX) و گلوکاتایون S-ترانسفراز (GST)، توسط تنش نیکل افزایش یافته است. در پژوهشی مشاهده شد کاهش فعالیت در آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی مانند SOD و CAT ناشی از تنش نیکل ایجاد شد و افزایش معنی‌داری در فعالیت APX و POD در همان شرایط مشاهده شد. با این حال، پراکسیداسیون لیپید در غشای سلول‌های برگ پس از اعمال نیکل تغییر نیافت. این نشان می‌دهد که APX و POD ممکن است ROS را به طور موثری از بین ببرند، در نتیجه مانع از پراکسیداسیون لیپید غشاهای زیستی شوند. نتایج حاصل از تحقیقات فوق روشن می‌سازد که سیستم آنزیمی آنتی‌اکسیدانی تحت تنش نیکل تحریک می‌شود و در شرایط سطوح بالای نیکل، نقش مهمی در کمک به گیاهان زراعی ایفا می‌کند (۶ و ۱). پروفایل‌های بیان ژن پس از قرار گرفتن در معرض نانوذرات و دیگر تنش‌های محیطی کم‌تر مقایسه شده‌اند و اثرشان بر دفاع گیاهی اغلب بررسی نشده است (۹ و ۱۴).

تعیین مشخصات نانوذرات اکسید نیکل و اکسید نیکل

توده ای: دستگاه آنالیز اندازه ذرات جهت بررسی اندازه ذرات، پتانسیل زتا و وزن ملکولی مورد استفاده قرار گرفت. پراش پرتو X (XRD)، برای مطالعه ساختار بلوری ذرات و میکروسکوپ نیروی اتمی (AFM) جهت بررسی ابعاد ذره مورد استفاده قرار گرفت. مراحل مختلف این آزمایش‌ها، در آزمایشگاه مرکزی دانشگاه فردوسی مشهد انجام شد.

آزمایش‌های کاشت و تیماردهی: این آزمایش در شرایط گلخانه ای بصورت طرح کاملا تصادفی با ۵ غلظت از نانوذرات اکسید نیکل و اکسید نیکل توده ای (۰، ۲۰، ۱۰۰، ۴۰۰ و ۸۰۰ ppm) انجام شد. هر غلظت شامل ۵ گلدان ۵ کیلویی حاوی خاک لوم رسی و هر گلدان حاوی ۱۰ عدد بذر رازیانه بود که در عمق یک سانتی‌متری خاک کاشته شدند. دمای گلخانه حدود ۲۵ تا ۳۰ درجه سانتی‌گراد متغیر بود و فتوپریود شامل ۱۶ ساعت نور و ۸ ساعت تاریکی بود. پس از یک ماه و نیم از کاشت، اسپری برگی انجام شد. برای گروه شاهد از آب مقطر استفاده گردید. اسپری برگی بصورت هفتگی انجام شد. طول دوره آزمایش ۸۲ روز و در مجموع ۵ مرحله اسپری برگی انجام شد.

سنجش غلظت عناصر منگنز، مس، آهن، روی، سدیم، پتاسیم، منیزیم و کلسیم در برگ و ریشه: برای سنجش انباشتگی عناصر در ریشه و برگ، ابتدا نمونه‌های ریشه و برگ شاهد و کلیه تیمارها در آون ۷۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۷۲ ساعت قرار گرفته و پس از خشک شدن کامل، با آسیاب پودر شدند. به ۱۰۰ میلی گرم پودر ریشه و ۵۰۰ میلی گرم از پودر برگ، بصورت جداگانه ۵ میلی‌لیتر اسید نیتریک غلیظ افزوده شد و تا هضم کامل بافت‌ها در ارلن‌های درب بسته، به مدت یک شب قرار گرفتند. پس از این مدت، ارلن‌ها به مدت یک ساعت در آون ۹۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند تا به شدت هضم بافت‌ها افزوده گردد.

پس از سرد شدن یک میلی‌لیتر محلول پراکسید هیدروژن (H_2O_2) ۳۰٪ به مخلوط واکنش افزوده شد. جهت هضم کامل بافت‌ها، ارلن‌ها روی اجاق برقی قرار داده شدند و حرارت دهی تا خشک شدن تقریبی ادامه یافت. در انتها، با استفاده از آب دیونیزه حجم اندک محلول باقی مانده برای نمونه‌های ریشه به ۱۰۰ میلی‌لیتر و برای نمونه‌های برگ به ۲۵ میلی‌لیتر رسانده شد و در نهایت خاکستر تر گیاهی بدست آمد (۱۰). محتوای عناصر منگنز، مس، آهن، روی، کلسیم و منیزیم با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر جذب اتمی (Hitachi Z2000 Atomic Absorption Spectrophotometer) و محتوای عناصر سدیم و پتاسیم با دستگاه نشر اتمی (JENWAY PFP7 Flame Photometer) اندازه‌گیری شد.

محاسبه فاکتور انتقال عناصر از ریشه به برگ: پس از سنجش میزان عناصر در ریشه و برگ، فاکتور انتقال عناصر از ریشه به برگ گیاهان شاهد و تیمار با فرمول زیر محاسبه شد:

$$TF = \text{میزان عناصر ریشه} / \text{میزان عناصر برگ}$$

۱- مطالعات بیان ژن: در این پژوهش اثر غلظت‌های مختلف نانو و توده‌ای اکسید نیکل بر بیان دو ژن $ndh H$ و $ndh D$ که ایزوآنزیم‌های آنزیم پلی فنل اکسیداز و گایاکول پراکسیداز هستند، مورد بررسی قرار گرفت. انتخاب ژن‌ها بر اساس دسترسی به توالی ژن و تایید سنتز پرایمرها برای بیان مناسب بود.

بعد از برداشت نمونه‌های گلدانی، شستشو و جدا کردن ریشه‌ها از بخش هوایی، نمونه‌ها در پاکت‌های پلاستیکی به طور جداگانه بسته بندی و در فریزر ۲۰- درجه قرار داده شد. بعد از چهار روز، ۱۰۰ میلی‌گرم از بافت برگ برای هر تیمار با ترازو اندازه‌گیری و جهت استخراج RNA استفاده گردید.

استخراج RNA از بافت برگ: جهت استخراج از کیت

سنتز cDNA: سنتز cDNA توسط کیت سنتز cDNA شرکت پارس توس انجام شد. پرایمرهای اختصاصی ژن *ndh H* و *ndh D* و ژن *RPL 20* بعنوان ژن خانه دار با استفاده از نرم افزار الیگو ۷ طراحی و توسط برنامه BLAST در NCBI مورد تأیید قرار گرفت. ویژگی‌های کامل پرایمرهای طراحی شده در جدول ۱ آمده است.

استخراج RNA (plant tissue RNA isolation kit (50)) (کمپانی Favorgen تایوان) استفاده شد. با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر مدل Epoch از کمیته RNA استخراج شده و صحیح بودن آن اطمینان حاصل شد. بررسی کیفیت RNA استخراج شده (الکتروفورز بر روی ژل آگارز): جهت سنجش کیفیت RNA های استخراج شده از بافت برگ، الکتروفورز بر روی ژل آگارز انجام شد.

جدول ۱- توالی پرایمر مورد استفاده برای بررسی بیان ژن

Gene Name	Primer Sequence	Tm
ndh D	Forward: 5'-GAAACGTCTTTACTCGGCTA-3'	53
	Reverse: 5'-AACCATATAAACCGACACC-3'	
ndh H	Forward: 5'-TTTATCGGGACCAATGCTAC-3'	54
	Reverse: 5'-TCCCAATCAAATTCATCGT-3'	
RPL20	Forward: 5'-GCAAAAAGAGAAATTTTCGC-3'	50
	Reverse: 5'-CTATTTCCCGAATTACTGC-3'	

ژن‌ها قابل ردیابی بود، تحت عنوان Ct نامیده و Ct های حاصل نسبت به Ct مربوط به بیان ژن *RPL 20* مورد ارزیابی قرار گرفت. از روش $2^{-\Delta\Delta Ct}$ برای بررسی تفاوت بیان ژن‌ها استفاده گردید و از ژن *RPL 20* به عنوان ژن شاهد استفاده شد (۳۰).

روش‌های آماری: تجزیه و تحلیل داده‌ها توسط نرم افزار SPSS انجام گرفت. مقایسه میانگین‌ها براساس آزمون ANOVA و تست Duncan صورت گرفت و رسم نمودارها به کمک نرم افزار Excel انجام شد.

نتایج

نتایج آنالیز اندازه ذرات: این نتایج در جدول ۱ آمده است.

Real-Time PCR: جهت انجام آزمایش ریل تایم (مدل Bio Rad) به هر یک از میکروتیوپ‌ها، ۱۰ میکرولیتر محلول سایبرگرین، ۲ میکرولیتر نمونه cDNA، ۱ میکرولیتر پرایمر Forward و ۱ میکرولیتر پرایمر Reverse، ۶ میکرولیتر آب مقطر اضافه شد. حجم محلول در مجموع به ۲۰ میکرولیتر رسید. ۴۸ خانه اول برای ژن *H*، ۴۸ خانه برای ژن خانه نگهدار، ۴۸ خانه برای ژن *D*، در دستگاه قرار گرفتند. تمامی نمونه‌ها بصورت دوتایی (دوپلیکیت) قرار داده شد.

Quantitative Real-Time PCR تکنیک بکار رفته در این پژوهش بود که با این تکنیک میزان بیان ژن‌های مورد نظر با روش کمی نسبی و با استفاده از رنگ Syber Green ارزیابی گردید و میزان تکثیر در چرخه‌ای که بیان

جدول ۱- مشخصات نانوذره اکسید نیکل و اکسید نیکل توده ای

نوع ماده	ثابت دی الکتریک	میانگین حرکت ذرات ($\mu\text{M/s/V/cm}$)	میانگین زتا (mV)	قطر هیدرودینامیکی (nm)	شاخص پراکندگی	قطر ذره (nm)
نانوذره اکسید نیکل	۷۹/۵۸	۰/۵۸	۹/۳۷	۱۸۹/۶۸	۰/۳۸	۴۷/۳۶
اکسید نیکل توده ای	۷۹/۴۴	-۱/۸۶	-۲۵/۱۰	۳۵۹/۲۹	۰/۱۵۵	۲۲۰/۹۲

معنی داری نشان نداد بجز غلظت ۱۰۰ که افزایش معنی دار داشت و منیزیم در غلظت‌های مختلف نانو فاقد اختلاف معنی دار با شاهد بود (جدول ۲).

در غلظت‌های مختلف اکسید نیکل توده ای، عناصر مس، سدیم و کلسیم برگ کاهش معنی دار نشان دادند، عناصر منگنز، آهن و روی در غلظت ۲۰ توده ای کاهش معنی دار داشتند و پتاسیم در غلظت‌های کمتر از ۴۰۰ توده ای فاقد اختلاف معنی دار با شاهد بود (جدول ۲).

جذب، انباشته شدن و انتقال عناصر: نتایج نشان داد محتوای انباشت عناصر مس، پتاسیم و کلسیم در برگ گیاهان رازیانه تیمار شده با غلظت‌های مختلف اکسید نیکل نانو کاهش معنی داری در مقایسه با گروه شاهد داشتند، همچنین محتوای عناصر آهن و روی در غلظت ۲۰ نانو کاهش معنی دار نسبت به محتوای این عناصر در گیاهان گروه شاهد داشتند، محتوای سدیم در همه غلظت‌های نانو افزایش معنی دار در مقایسه با گروه شاهد داشت، اما محتوای منگنز در گیاهان تیمار شده با گروه شاهد اختلاف

جدول ۲- اثر نانوذرات اکسید نیکل و اکسید نیکل توده ای بر میزان جذب و انباشت عناصر در بخش هوایی گیاه رازیانه. داده ها میانگین سه تکرار \pm انحراف معیار هستند. آنالیزها بر اساس آنوای یک طرفه همراه با آزمون دانکن انجام شده اند. حروف متفاوت نشان دهنده ی وجود اختلاف معنی دار است ($P \leq 0.05$).

سدیم	پتاسیم	کلسیم	منیزیم	آهن	مس	روی	منگنز	نانوذره اکسید نیکل (ppm)
$^{c}1/483 \pm 0/047$	$^{a}1405/68 \pm 18/18$	$^{a}67/76 \pm 2/05$	$^{ab}870 \pm 5/62$	$^{a}4/02 \pm 0/069$	$^{a}0/145 \pm 0/014$	$^{a}5/99 \pm 0/813$	$^{bc}0/992 \pm 0/11$	۰
$^{a}1/722 \pm 0/239$	$^{d}1083 \pm 31/88$	$^{cd}53/49 \pm 1/87$	$^{ab}866/39 \pm 10/22$	$^{bc}3/52 \pm 0/057$	$^{b}0/176 \pm 0/005$	$^{bc}4/09 \pm 0/005$	$^{c}0/939 \pm 0/048$	۲۰
$^{b}1/626 \pm 0/071$	$^{c}1196 \pm 18/15$	$^{ab}61/35 \pm 2/94$	$^{a}924/31 \pm 12/09$	$^{a}4/07 \pm 0/149$	$^{b}0/135 \pm 0/001$	$^{ab}5/41 \pm 0/437$	$^{a}1/156 \pm 0/035$	۱۰۰
$^{c}1/483 \pm 0$	$^{b}1222 \pm 0$	$^{d}49/58 \pm 3/04$	$^{ab}880/58 \pm 12/31$	$^{ab}3/96 \pm 0/271$	$^{b}0/139 \pm 0/013$	$^{a}5/81 \pm 0/905$	$^{ab}1/099 \pm 0/044$	۴۰۰
$^{d}1/387 \pm 0$	$^{c}1178 \pm 18/18$	$^{d}48/52 \pm 1/88$	$^{ab}846/87 \pm 0$	$^{abc}3/81 \pm 0$	$^{b}0/117 \pm 0/021$	$^{a}6/132 \pm 1/755$	$^{c}0/925 \pm 0$	۸۰۰
اکسید نیکل توده ای (ppm)								
$^{c}1/483 \pm 0/047$	$^{a}1405/68 \pm 18/18$	$^{a}67/76 \pm 2/05$	$^{ab}870 \pm 5/62$	$^{a}4/02 \pm 0/069$	$^{a}0/145 \pm 0/014$	$^{a}5/99 \pm 0/813$	$^{bc}0/992 \pm 0/11$	۰
$^{d}1/363 \pm 0$	$^{d}1056 \pm 22/68$	$^{c}35/06 \pm 0/87$	$^{a}937/045 \pm 140/28$	$^{c}3/36 \pm 0/371$	$^{b}0/165 \pm 0/038$	$^{c}3/567 \pm 1/441$	$^{d}0/705 \pm 0/142$	۲۰
$^{f}1/220 \pm 0/0478$	$^{d}1069 \pm 9/90$	$^{d}47/54 \pm 3/21$	$^{a}930/125 \pm 12/53$	$^{abc}3/718 \pm 0/604$	$^{b}0/141 \pm 0$	$^{a}6/06 \pm 0/293$	$^{bc}0/981 \pm 0/142$	۱۰۰
$^{c}1/291 \pm 0/0478$	$^{c}1178 \pm 18/15$	$^{bc}58/14 \pm 0$	$^{a}821/62 \pm 0$	$^{c}3/34 \pm 0$	$^{b}0/121 \pm 0$	$^{ab}5/271 \pm 0$	$^{c}0/923 \pm 0$	۴۰۰
$^{ef}1/244 \pm 0$	$^{d}1060 \pm 0$	$^{bc}57/53 \pm 0$	$^{a}940/37 \pm 0$	$^{ab}3/87 \pm 0$	$^{b}0/159 \pm 0/062$	$^{abc}4/781 \pm 0$	$^{c}0/892 \pm 0$	۸۰۰

بود (شکل ۷)، عناصر منگنز، آهن و کلسیم کاهش معنی دار در غلظت‌های ۲۰ و ۴۰۰ توده ای در مقایسه با شاهد و عناصر روی، پتاسیم و منیزیم افزایش معنی دار در غلظت‌های بالاتر یعنی ۴۰۰ و ۸۰۰ نشان دادند و سدیم در همه غلظت‌های توده ای کاهش معنی دار در مقایسه با شاهد داشت (جدول ۳).

عناصر منگنز، مس، روی، منیزیم و کلسیم در ریشه گیاهان رازیانه در غلظت‌های مختلف نانو اکسید نیکل اختلاف معنی داری با شاهد نشان ندادند، آهن در غلظت ۲۰ نانو کاهش معنی دار داشت، در مورد سدیم همه غلظت‌های نانو موجب کاهش معنی دار در مقایسه با شاهد شدند (جدول ۳).

در رابطه با غلظت‌های اکسید نیکل توده ای، عنصر مس در ریشه فاقد اختلاف معنی دار در تمامی غلظت‌ها

جدول ۳- اثر نانوذرات اکسید نیکل و اکسید نیکل توده ای بر میزان جذب و انباشت عناصر در ریشه گیاه رازیانه. داده ها میانگین سه تکرار \pm انحراف معیار هستند. آنالیزها براساس آنوای یک طرفه همراه با آزمون دانکن انجام شده اند. حروف متفاوت نشان دهنده ی وجود اختلاف معنی دار است ($P \leq 0.05$).

سولیم	پتاسیم	کلسیم	منیزیم	آهن	مس	روی	منگنز	نانوذره اکسید نیکل (ppm)
$1/31 \pm 0/23$	$41/87 \pm 0/18$	$4/89 \pm 1/53$	$42/04 \pm 1/87$	$1/889 \pm 0/035$	$0/111 \pm 0/043$	$129 \pm 0/118$	$0/229 \pm 0/006$	۰
$1/24 \pm 0/047$	$48/96 \pm 0/36$	$4/16 \pm 0/99$	$42/62 \pm 0/04$	$1/812 \pm 0/005$	$0/111 \pm 0/032$	$0/375 \pm 0/363$	$0/228 \pm 0/002$	۲۰
$1/17 \pm 0/023$	$47/32 \pm 0/54$	$3/87 \pm 0/1$	$41/78 \pm 2/78$	$1/833 \pm 0/083$	$0/081 \pm 0/006$	$0/347 \pm 0/242$	$0/229 \pm 0/005$	۱۰۰
$1/19 \pm 0$	$48/05 \pm 0/9$	$3/49 \pm 0/24$	$37/24 \pm 3/37$	$1/844 \pm 0/012$	$0/083 \pm 0/005$	$1/07 \pm 0/075$	$0/230 \pm 0/002$	۴۰۰
$1/1 \pm 0$	$45/69 \pm 1/45$	$5/94 \pm 0/045$	$35/71 \pm 0/02$	$1/841 \pm 0/01$	$0/083 \pm 0/001$	$0/263 \pm 0/004$	$0/231 \pm 0/001$	۸۰۰
اکسید نیکل توده ای (ppm)								
$1/31 \pm 0/23$	$41/87 \pm 0/18$	$4/89 \pm 1/53$	$42/04 \pm 1/87$	$1/889 \pm 0/039$	$0/111 \pm 0/043$	$129 \pm 0/118$	$0/229 \pm 0/006$	۰
$1/01 \pm 0/049$	$44/23 \pm 1/08$	$3/55 \pm 0/76$	$37/19 \pm 3/04$	$1/742 \pm 0/012$	$0/093 \pm 0/008$	$0/314 \pm 0/212$	$0/221 \pm 0/006$	۲۰
$1/98 \pm 0/023$	$45/87 \pm 0/9$	$5/15 \pm 0/04$	$42/82 \pm 1/14$	$1/798 \pm 0/027$	$0/085 \pm 0/001$	$1/59 \pm 0/13$	$0/225 \pm 0/002$	۱۰۰
$1/885 \pm 0/023$	$42/78 \pm 1/81$	$3/08 \pm 0$	$31/59 \pm 0$	$1/747 \pm 0$	$0/090 \pm 0$	$0/413 \pm 0$	$0/220 \pm 0$	۴۰۰
$1/78 \pm 0/023$	$40/97 \pm 0$	$6/19 \pm 0/66$	$31/56 \pm 0/05$	$1/846 \pm 0/13$	$0/085 \pm 0/005$	$0/767 \pm 0/63$	$0/230 \pm 0/004$	۸۰۰

پتاسیم در ریشه نسبت به برگ می باشد. تیمار ۴۰۰ ppm توده‌ای، دارای بیشترین انباشت عنصر کلسیم در ریشه نسبت به برگ می باشد. تیمار ۸۰۰ ppm نانو دارای کمترین انباشت عنصر منگنز و کلسیم و بیشترین انباشت عنصر منیزیم در ریشه نسبت به برگ می باشد. تیمار ۸۰۰ توده‌ای دارای کمترین انباشت عنصر روی و بیشترین انباشت عنصر منیزیم و سدیم در ریشه نسبت به برگ می باشد (جدول ۴).

اثر غلظت‌های مختلف نانو و توده‌ای اکسید نیکل بر میزان فاکتور انتقال عناصر گیاه رازیانه: تیمار ۲۰ ppm نانو، دارای کمترین انباشت عنصر روی، مس، آهن، منیزیم و پتاسیم و تیمار ۲۰ ppm توده‌ای کمترین انباشت عنصر منگنز، مس و آهن در ریشه نسبت به برگ می باشد. تیمار ۱۰۰ ppm نانو، دارای بیشترین انباشت عنصر منگنز، آهن، کلسیم و سدیم در ریشه نسبت به برگ می باشد. تیمار ۱۰۰ ppm توده‌ای، دارای کمترین انباشت عنصر کلسیم و

جدول ۴- فاکتور انتقال عناصر در گیاهان رازیانه تحت تیمار اکسید نیکل نانو و توده ای

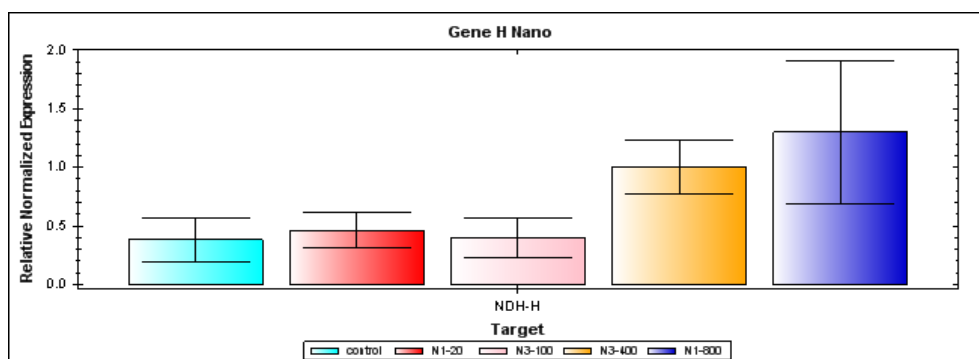
تیمار عناصر	شاهد	۲۰		۱۰۰		۴۰۰		۸۰۰
		نانو	توده ای	نانو	توده ای	نانو	توده ای	
منگنز	0/2312	0/2439	0/3221	0/1986	0/2337	0/2097	0/2388	0/2581
روی	0/0200	0/0917	0/1189	0/0668	0/0264	0/0201	0/0783	0/1604
مس	0/4133	0/7586	0/8207	0/4598	0/5353	0/6153	0/6383	0/7090
آهن	0/4697	0/5150	0/5224	0/4493	0/4933	0/4663	0/5219	0/4759
منیزیم	0/0473	0/0492	0/0406	0/0451	0/0461	0/0423	0/0384	0/0335
کلسیم	0/0710	0/0776	0/1048	0/0634	0/1088	0/10705	0/0531	0/1225
پتاسیم	0/0297	0/0452	0/0419	0/0395	0/0428	0/0386	0/0363	0/0386
سدیم	0/8880	0/7222	0/7424	0/7212	0/8065	0/8069	0/6851	0/6345

به شاهد دیده شد. همانطور که انتظار می‌رود بیشترین میزان افزایش در ۸۰۰ ppm نانو مشاهده گردید.

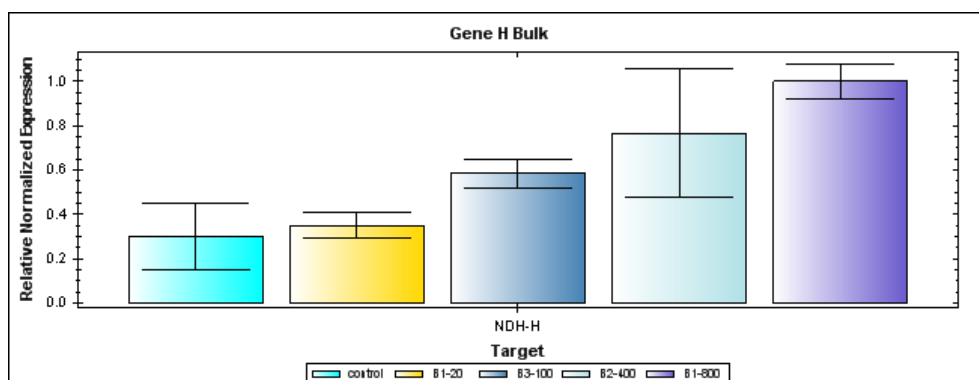
بررسی نتایج بیان ژن H نشان داد که افزایش بیان ژن نسبت به شاهد در تمامی نمونه‌ها دیده شد. بیشترین میزان بیان ژن مربوط به ۸۰۰ ppm توده‌ای بود (شکل ۱).

بیان ژن ndh H به روش RT-PCR در گروه‌های مورد مطالعه: شکل ۱ مقایسه میزان بیان ژن ndh H را در بین گروه‌های نانو مورد مطالعه نشان می‌دهد نمودارها با استفاده از نرم افزار BioRad رسم شده است. نتایج ریل تایم نشان داد که افزایش نسبی در همه مقادیر نانو نسبت

الف



ب



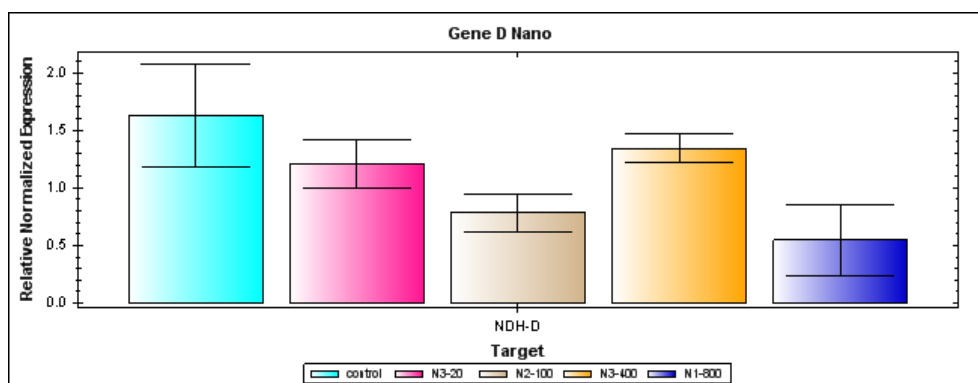
شکل ۱- مقایسه میزان بیان ژن ndh H در بین گروه‌های نانو (الف) و توده‌ای (ب) مورد آزمایش. ستون اول شاهد، ستون دوم تا پنجم بترتیب نمونه‌های نانو و توده‌ای با غلظت‌های ۲۰، ۱۰۰، ۴۰۰ و ۸۰۰ ppm نشان می‌دهد.

که نسبت به بقیه بیان بالاتری نشان داد غلظت ۴۰۰ ppm نانو بود (شکل ۲). در تمامی نمونه‌ها کاهش بیان ژن نسبت به شاهد مشاهده شد. در غلظت ۲۰ ppm، نمونه نانو و توده‌ای تفاوت مشخصی نداشتند. غلظت ۱۰۰ و ۸۰۰ ppm نانو نسبت به توده‌ای کاهش داشتند. غلظت ۴۰۰ ppm افزایش نانو در مقایسه با توده‌ای مشاهده گردید (شکل ۲).

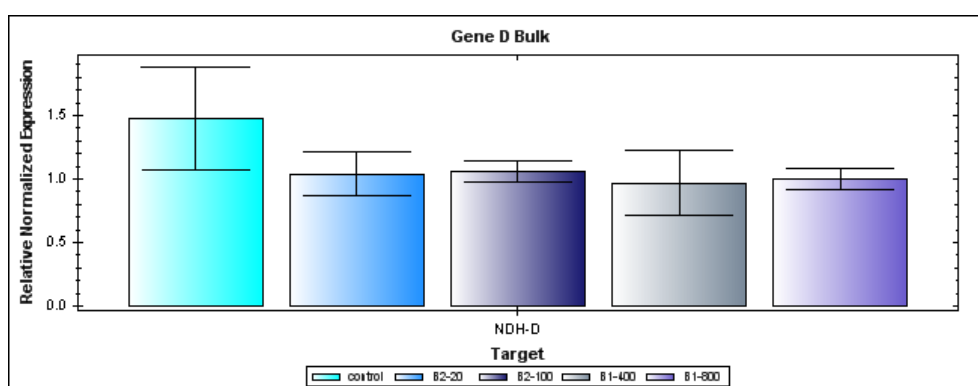
در تمامی نمونه‌ها افزایش بیان ژن نسبت به شاهد مشاهده گردید. در غلظت ۲۰ و ۴۰۰ ppm تفاوت بیان ژن بین غلظت‌های نانو و توده‌ای وجود نداشت. در غلظت ۱۰۰ و ۸۰۰ ppm میزان نانو نسبت به توده‌ای هم غلظت، افزایش بیشتری نشان داد.

مقایسه میزان بیان ژن ndh D در بین گروه‌های مورد آزمایش: نمودار بیان ژن D در غلظت‌های نانو نشان دهنده کاهش تمامی نمونه‌ها نسبت به شاهد است. تنها غلظتی

الف



ب



شکل ۲- مقایسه میزان بیان ژن *ndh D* در بین گروه‌های نانو (الف) و توده ای (ب) مورد آزمایش. ستون اول شاهد، ستون دوم تا پنجم بترتیب نمونه‌های نانو و توده ای با غلظت‌های ۲۰، ۱۰۰، ۴۰۰ و ۸۰۰ ppm را نشان می‌دهد.

بحث و نتیجه‌گیری

همانطور که در نتایج پژوهش حاضر مشاهده می‌شود، تیمار گیاه رازیانه با اکسید نیکل نانو و توده‌ای دارای آثار معنی‌دار بر محتوای عناصر مورد مطالعه برگ و ریشه، بود. در پژوهش‌هایی (۱۵ و ۲۲) که اثر نیکل بر مقدار عناصر غذایی پر مصرف و کم مصرف در گیاهان انجام شده، این نتایج بدست آمده است: در جو خوراکی (*Hordeum vulgare L.*)، در بخش‌های هوایی، اثر سولفات نیکل موجب کاهش آهن شد که با نتایج بدست آمده در این پژوهش مطابقت داشت. کاربرد کلرید نیکل در بخش‌های هوایی و ریشه برنج خوراکی (*Oryza sativa L.*) موجب کاهش پتاسیم، کلسیم و منیزیم گردید که همسو با پژوهش

حاضر بود. تیمار گیاه لوبیای خوراکی (*Phaseolus vulgaris L.*) با نیترات نیکل موجب افزایش پتاسیم، آهن و مس ریشه شد که افزایش پتاسیم هماهنگ با این تحقیق است، در حالی که در برگ‌ها تغییری در جذب پتاسیم، کلسیم، منیزیم، آهن، منگنز و روی مشاهده نشد که در مورد منیزیم با پژوهش حاضر مطابقت دارد. اثر سولفات نیکل بر برگ‌ها و ریشه‌های گندم خوراکی (*Triticum aestivum L.*) موجب کاهش پتاسیم شد که کاهش آن در برگ مطابق با پژوهش حاضر است. در گندم خوراکی تیمار برگ‌ها با نیکل موجب افزایش کلسیم و منیزیم شد که مغایر با این پژوهش است ولی کاهش آهن، منگنز و روی همسو با تحقیق حاضر است. تحقیقات کمتری در ارتباط با عناصر بصورت توده‌ای و نانو و مقایسه آنها روی

کرد. علاوه بر این نانو ذرات مس موجب افزایش بیان ژن سوپراکسید دیسموتاز در گیاه خیار گردیدند. در این تحقیق نیز افزایش بیان ژن اکسیدوردکتاز $ndh\ H$ در تیمارهای اکسید نیکل نانو و توده‌ای مشاهده شد.

در تحقیق حاضر گرچه به نظر می‌رسد هر دو ژن H, D در یک مسیر اکسیدوردکتازی فعالیت می‌کنند، اما نتایج بیان ژن نشان داد که دو ژن بصورت کاملاً متفاوتی نسبت به اکسید نیکل نانو و توده‌ای پاسخ دادند. تمامی غلظت‌های نانو و توده‌ای اکسید نیکل موجب افزایش بیان ژن H و کاهش بیان ژن D در مقایسه با شاهد شدند. این موضوع مخصوصاً بیانگر تفاوت مسیرهای مولکولی بیان ژن و اثر آن در مسیرهای فیزیولوژیکی است.

در تحقیق دیگر (۱۵) اثر نانولوله‌های کربن بر بیان ژن در ریشه‌های گوجه فرنگی و برگ‌های اولیه آن با تحلیل ریزآرایه ارزیابی گردید. اکثر ژن‌های فرانتظیم شده در فرآیندهای مربوط به تنش دخالت داشتند.

شن و همکاران (۲۷) در پژوهشی اثر نانولوله کربن بر بیان ژن‌های کدکننده آنزیم‌های جاروب‌کننده H_2O_2 در آراییدوپسیس تالیانا را تعیین کردند. مشاهده شد که میزان بالای رونویسی آسکوربات پراکسیداز و سوپراکسید دیسموتاز میتوکندریایی بعد از تزریق نانولوله‌های کربن تک‌جداره‌ای در برگ‌ها بیان شد.

پاسخ‌های اولیه به تنش‌های غیرزیستی شامل افزایش موقت کلسیم سیتوپلاسمی، افزایش پیام‌رسان‌های ثانویه بین سلولی مثل اینوزیتول پلی فسفات، انواع اکسیژن فعال (مثل ROS) (مثل یون‌های اکسیژن و پراکسید) و آبسزیک اسید و افزایش مسیرهای پروتئین کیناز فعال شونده با میتوزن ($MAPK$) هستند (۳ و ۴). در سطح بعدی پاسخ به تنش، پروتئین‌های تنظیمی هستند که مستقیماً در حفاظت از آسیب سلولی و افزایش و کاهش تنظیم ژن‌های خاص تنش دخالت دارند (۲۸ و ۹). متابولیت‌های ثانویه در گیاهان در پاسخ به تنش-های غیرزیستی نیز اهمیت دارند. این ترکیبات در پایداری

جذب عناصر دیگر صورت گرفته است. با توجه به داده‌های پژوهش حاضر می‌توان بطور کلی نتیجه گرفت اکسید نیکل توده‌ای اثر کاهشی بیشتری بر جذب عناصر در مقایسه با اکسید نیکل نانو داشت. بنابراین استفاده از اکسید نیکل نانو در غلظت‌های مشخص شده می‌تواند راه‌کار مناسبی برای جذب بهتر عناصر باشد.

در بررسی فاکتور انتقال مشخص شد در شاهد بیشترین انباشت عناصر وجود دارد و تیمارهای اعمال شده مخصوصاً $20\ ppm$ نانو از حرکت عناصر به برگ ممانعت نکرده و در این غلظت جابجایی عناصر به جز کلسیم و سدیم به برگ قابل توجه بوده است. بنابراین با استفاده از تیمارهای کم نانو می‌توان حرکت برخی از عناصر از ریشه به برگ‌ها را افزایش داد.

نتایج بیان ژن $ndh\ H$ حاصل از این پژوهش نشان داد، افزایش بیان ژن نسبت به شاهد در تمامی نمونه‌های نانو و توده‌ای وجود دارد. با افزایش غلظت تیمارها، بیان ژن نیز بیشتر گردید. بین غلظت‌های اعمال شده نانو و توده‌ای ($20\ ppm$ ، 100 ، 400 و 800)، بیشترین بیان ژن مربوط به غلظت $800\ ppm$ بود. در کلیه تیمارها، غلظت‌های نانو نسبت به توده‌ای موجب افزایش بیشتری در بیان ژن شدند که این تفاوت در غلظت $800\ ppm$ بیشتر بود. بر خلاف ژن H نتایج بیان ژن $ndh\ D$ در این مطالعه نشان داد که بیان ژن در تمامی نمونه‌های نانو و توده‌ای نسبت به شاهد کاهش داشت. در غلظت $20\ ppm$ اکسید نیکل نانو و توده‌ای تقریباً بیان ژن مشابه و در غلظت‌های 100 و $800\ ppm$ تیمار نانو نسبت به توده‌ای موجب کاهش بیان ژن و فقط در تیمار $400\ ppm$ نانو نسبت به توده‌ای افزایش بیان این ژن مشاهده گردید.

در پژوهشی که توسط موسا و همکاران (۱۰) انجام گرفت اثر نانوذرات مس، در گیاه خیار (*Cucumis sativus*) بررسی شد. این گیاه نانوذرات را با مقادیر وابسته به غلظت در بافت‌های خود و با بالاترین مقدار در ریشه انباشت

حاصل از افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در شرایط تنشی همسو می‌باشد. در رابطه با ژن *ndh D* کاهش در بیان ژن، در غلظت‌های مختلف نانو و توده‌ای نسبت به شاهد مشاهده گردید که احتمالاً بدلیل دخالت مسیره‌های سم‌زدائی دیگری در مقابل تنش ایجاد شده بوده است. از جمله این مسیره‌ها می‌توان به افزایش آنتی‌اکسیدان‌های گیاهی نظیر توکوفرول‌ها، اسید فولیک، اسید آسکوربیک، رنگیزه‌های کاروتنوئیدی، فنیل آکرلیک اسیدها و پلی‌فنل‌ها اشاره کرد که بزرگ‌ترین گروه فنل‌های طبیعی را شامل می‌شوند. به‌طور کلی این آنتی‌اکسیدان‌ها قادرند به اشکال مختلف از جمله پاک‌سازی رادیکال‌های آزاد، کلات‌کنندگی، احیاء‌کنندگی و یا فعال‌کنندگی آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی سلول عمل نموده و موجب کاهش و یا رفع آسیب‌های ناشی از رادیکال‌های آزاد در سیستم‌های زیستی گردند (۹). با توجه به مطالعات بیان ژن به نظر می‌رسد اولین سطح پاسخ گیاه در تولید و تغییر آنزیم‌ها، واکنش سلولی، پاسخ دفاعی گیاه و عوامل دیگر مربوط به بیان ژن‌های مربوطه می‌باشد و در مسیره‌های بعدی آبشارهای پیام‌رسان سلولی بر سطح بیان ژن اثر گذار می‌باشند.

سپاسگزاری

نویسندگان این مقاله از مسئولین آزمایشگاه مرکزی دانشگاه فردوسی مشهد جهت انجام آزمایشات XRD، زتا سائزر و نانوپارٹیکل سائزر و همچنین آزمایشگاه تحقیقاتی دانشکده علوم دانشگاه آزاد اسلامی واحد مشهد جهت همکاری برای انجام مراحل مختلف آزمایشات تشکر و قدردانی می‌نمایند.

۲- یوسف زایی، ف.، پوراکبر، ل.، فرهادی، خ. و مولایی، ر.، ۱۳۹۶، بررسی تاثیر نانوذرات مس و محلول کلرید مس بر جوانه زنی و برخی فاکتورهای مورفولوژیکی و فیزیولوژیکی گیاه ریحان

ساختارها، حفاظت نوری، حفاظت در برابر آنتی‌اکسیدان‌ها و آنتی‌رادیکال‌ها، ترانس‌سانی‌علامت و تجمع پلی‌آمین‌ها که برخی پیش‌ساز هورمون‌های گیاهی هستند و در ترانس‌سانی‌علامت هورمون‌ها نقش دارند (۲۱ و ۳۱).

با وقوع تنش‌های زیستی و غیرزیستی، دیواره سلولی اولیه درک تنش است و در سازگاری گیاه نقش پویا و مکانیکی دارد. پراکسیدازهای برون سلولی تعدیل‌کننده‌های دیواره سلولی و تولیدکننده سوپراکسید و هیدروژن پراکسید هستند که در زمان وقوع تنش، انفجار اکسیداتیو ایجاد می‌کنند (۸ و ۲۳). انفجار اکسیداتیو، تولید ROS، تجمع آنزیم‌های بیوستنز فنیل پروپانوئید (نوعی متابولیت ثانویه) و تغییر بیان ژن طی پاسخ دفاع گیاه را القا می‌کند (۲۵ و ۸).

نانو ذرات به علت کاربرد وسیع در محیط‌رها می‌شوند و اثرات سمی مخصوص به اندازه‌شان را بر موجودات زنده می‌گذارند. از آنجائی‌که نانوذرات ویژگی‌های اصلی ترکیب توده‌ای خود را حفظ می‌کنند بنابراین در مطالعه تأثیر متقابل نانوذرات در محیط باید اثر ترکیب توده‌ای نیز در نظر گرفته شود. در ارتباط با انباشت عناصر، نتایج این تحقیق نشان داد در شاهد بیش‌ترین انباشت عناصر اتفاق افتاده و تیمارهای اعمال شده بخصوص ۲۰ ppm نانو از حرکت عناصر به برگ ممانعت نکرده و در این غلظت جابجایی عناصر بجز کلسیم و سدیم به برگ قابل توجه بوده و اکسید نیکل توده‌ای اثر کاهشی بیشتری بر جذب عناصر نشان داد.

در تحقیق حاضر ژن *ndh H* در تمامی غلظت‌های بکار رفته نانو و توده‌ای اکسید نیکل در مقایسه با گروه شاهد افزایش بیان ژن داشت و بیشترین افزایش در گروه نانو و توده‌ای مربوط به غلظت ۸۰۰ ppm بود. این نتایج با نتایج

منابع

۱- موسوی کوهی، م.، لاهوتی، م.، و گنجعلی، ع. ۱۳۹۹. تغییرات جذب عناصر معدنی در گیاه کلزا تحت تیمار نانوذرات اکسید روی، مجله پژوهش‌های گیاهی، ۳۳، صفحات ۳۷۴-۳۸۵.

صفحات ۲۲۱-۲۳۱.

- 3-Ahmad, MSA, Ashraf, M, Hussain, M. 2011. Phytotoxic effects of nickel on yield and concentration of macro-and micro-nutrients in sunflower (*Helianthus annuus* L.) achenes. *Journal of Hazardous Materials*, 185(2-3):1295-1303.
- 4- Baskar, V, Safia, N, Preethy, K, Dhivya, S, Thiruvengadam, M. 2021. A comparative study of phytotoxic effects of metal oxide (CuO, ZnO and NiO) nanoparticles on in-vitro grown *Abelmoschus esculentus*. *Plant Biosystems*, 155(2): 374-383.
- 5-Bateley, GE, Kirby, JK, McLaughlin, MJ. 2013. Fate and risks of nanomaterials in aquatic and terrestrial environments. *Accounts of chemical research*, 46(3): 854-862.
- 6-Baxter, A, Mittler, R, Suzuki, N. 2014. ROS as key players in plant stress signaling. *Journal of experimental botany*, 65(5): 1229-1240.
- 7-Boominathan, R, Doran, PM. 2002. Ni-induced oxidative stress in roots of the Ni hyperaccumulator, *Alyssum bertolonii*. *New phytologist*, 156(2): 205-215.
- 8-Chahardoli, A, Karimi, N, Ma, X *et al.* 2020. Effects of engineered aluminum and nickel oxide nanoparticles on the growth and antioxidant defense systems of *Nigella arvensis* L. *Science Reports*, 10: 3847.
- 9-Chung, M., Baskar, V., Thiruvengadam, M. (2019). Nickel oxide nanoparticles cause substantial physiological, phytochemical, and molecular-level changes in Chinese cabbage seedlings. *Plant Physiology and Biochemistry*. 139:92-101.
- 10-Daudi, A, Cheng, Z, O'Brien, JA, Mammarella, N, Khan, S, Ausubel, FM, Bolwell, GP. 2012. The apoplastic oxidative burst peroxidase in *Arabidopsis* is a major component of pattern-triggered immunity. *The Plant Cell*, 24(1): 275-287.
- 11-Dua, A, Garg, G, Mahajan, R. 2013. Polyphenols, flavonoids and antimicrobial properties of methanolic extract of fennel (*Foeniculum vulgare* Mill). *Eur. J. Exp. Biol*, 3(4): 203-208.
- 12-García-Sánchez, S, Bernales, I, Cristobal, S. 2015. Early response to nanoparticles in the *Arabidopsis* transcriptome compromises plant defence and root-hair development through salicylic acid signalling. *BMC genomics*, 16(1): 1-17.
- 13-Gonçalves, SC, Portugal, A, Gonçalves, MT, Vieira, R, Martins-Loução, MA, Freitas, H. 2007. Genetic diversity and differential in vitro responses to Ni in *Cenococcum geophilum* isolates from serpentine soils in Portugal. *Mycorrhiza*, 17(8): 677-686.
- 14-Jiang, HS, Qiu, XN, Li, GB, Li, W, Yin, LY. 2014. Silver nanoparticles induced accumulation of reactive oxygen species and alteration of antioxidant systems in the aquatic plant *Spirodela polyrhiza*. *Environmental toxicology and chemistry*, 33(6): 1398-1405.
- 15-Kalra, Y. ed. 1997. *Handbook of reference methods for plant analysis*. CRC press.
- 16-Khodakovskaya, MV, De Silva, K, Biris, AS, Dervishi, E, Villagarcia, H. 2012. Carbon nanotubes induce growth enhancement of tobacco cells. *ACS nano*, 6(3): 2128-2135.
- 17-Landa, P, Vankova, R, Andrlova, J, Hodek, J, Marsik, P, Storchova, H, White, JC, Vanek, T. 2012. Nanoparticle-specific changes in *Arabidopsis thaliana* gene expression after exposure to ZnO, TiO₂, and fullerene soot. *Journal of hazardous materials*, 241: 55-62.
- 18-Liu, D, Kottke, I. 2003. Subcellular localization of chromium and nickel in root cells of *Allium cepa* by EELS and ESI. *Cell Biology and Toxicology*, 19(5): 299-311.
- 19-Liu, WX, Liu, JW, Wu, MZ, Li, Y, Zhao, Y, Li, SR. 2009. Accumulation and translocation of toxic heavy metals in winter wheat (*Triticum aestivum* L.) growing in agricultural soil of Zhengzhou, China. *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, 82(3): 343-347.
- 20-Mahalingam, R, Fedoroff, N. 2003. Stress response, cell death and signalling: the many faces of reactive oxygen species. *Physiologia Plantarum*, 119(1): 56-68.
- 21-Mosa, KA, El-Nagggar, M, Ramamoorthy, K, Alawadhi, H, Elnagggar, A, Wartanian, S, Ibrahim, E, Hani, H. 2018. Copper nanoparticles induced genotoxicity, oxidative stress, and changes in Superoxide Dismutase (SOD) gene expression in cucumber (*Cucumis sativus*) plants. *Frontiers in Plant Science*, 9: 872.
- 22-Oh, MM, Trick, HN, Rajashekar, CB. 2009. Secondary metabolism and antioxidants are involved in environmental adaptation and stress tolerance in lettuce. *Journal of Plant Physiology*, 166(2): 180-191.
- 23-Pinto, M, Soares, C, Pinto, A, Fidalgo, F. 2019.

- Phytotoxic effects of bulk and nano-sized Ni on *Lycium barbarum* L. grown *in vitro* – Oxidative damage and antioxidant response. *Chemosphere*, 218: 507-516
- 24-Priester, JH, Ge, Y, Mielke, RE, Horst, AM, Moritz, SC, Espinosa, K, Gelb, J, Walker, SL, Nisbet, RM, An, YJ, Schimel, JP. 2012. Soybean susceptibility to manufactured nanomaterials with evidence for food quality and soil fertility interruption. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(37): E2451-E2456.
- 25-Saleh, A, Hassan, YM, Selim, S, Elgawad, H. 2019. NiO-nanoparticles induce reduced phytotoxic hazards in wheat (*Triticum aestivum* L.) grown under future climate CO₂. *Chemosphere*, 220: 1047-1057
- 26-Seregin, I, Kozhevnikova, AD. 2006. Physiological role of nickel and its toxic effects on higher plants. *Russian Journal of Plant Physiology*, 53(2): 257-277.
- 27-Servin, AD, Morales, MI, Castillo-Michel, H, Hernandez-Viezcas, JA, Munoz, B, Zhao, L, Nunez, JE, Peralta-Videa, JR, Gardea-Torresdey, JL. 2013. Synchrotron verification of TiO₂ accumulation in cucumber fruit: a possible pathway of TiO₂ nanoparticle transfer from soil into the food chain. *Environmental Science & Technology*, 47(20): 11592-11598.
- 28-Shen, CX, Zhang, QF, Li, J, Bi, FC, Yao, N. 2010. Induction of programmed cell death in *Arabidopsis* and rice by single-wall carbon nanotubes. *American Journal of Botany*, 97(10): 1602-1609.
- 29-Shukla, R, Gopal, R. 2009. Excess nickel alters growth, metabolism, and translocation of certain nutrients in potato. *Journal of plant nutrition*, 32(6): 1005-1014.
- 30-Singh, A, Singh, N, Hussain, I, Singh, H, Singh, S. 2015. Plant-nanoparticle interaction: an approach to improve agricultural practices and plant productivity. *Int J Pharm Sci Invent*, 4(8): 25-40.
- 31- Torbati, S. 2018. Phytotoxicological Effects of Bulk-NiO and NiO Nanoparticles on Lesser and Giant Duckweeds as Model Macrophytes: Changes in the Plants Physiological Responses. *Iranian Journal of Toxicology*, 12(4): 31-39.
- 32-Udvardi, M.K., Czechowski, T., Scheible, W.R. 2008. Eleven golden rules of quantitative RT-PCR. *The Plant Cell*, 20(7): 1736-1737.

Response of nutrient accumulation and antioxidant enzymes gene expression of fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.) to nano and bulk NiO₂

Besharat H.¹, KhavariNejad R.¹, Mahmoodzadeh H.^{2*} and NejadShahrokhAbadi Kh.²

¹ Dept. of Biology, Islamic Azad University, Science and Research Branch, Tehran, I.R. of Iran

² Dept. of Biology, Islamic Azad University, Mashhad Branch, Mashhad, I. R. of Iran

Abstract

Extensive and unlimited use of nanoparticles has attracted the attention of researchers to study their environmental effects. In this study, the effects of nano and bulk nickel oxide treatments on nutrients accumulation and gene expression of fennel were investigated. After planting the plants in greenhouse conditions and treatment with nano and bulk NiO, the content of different nutrients in the roots and leaves of the plant and antioxidant enzymes gene expression (ndhH, ndhD) by Real-Time PCR, were investigated. The results showed that in the control the highest accumulation of elements occurred and the applied treatments, especially 20 ppm nano, did not prevent the movement of elements to the leaf and at this concentration the displacement of elements except Ca and Na to the leaf was significant. Bulk NiO showed a greater decreasing effect on element uptake. Increased expression of ndhH gene was observed in all nano and bulk concentrations in comparison with the control and the highest increase was related to 800 ppm. In relation to ndhD gene, a decrease in gene expression was observed in different concentrations of nano and bulk NiO compared to the control, which is probably due to the involvement of other detoxification pathways against stress. According to the mentioned cases, fennel plant seems to have the potential for resistance to nano and bulk NiO.

Key words: Nano NiO, Bulk NiO, Real-Time PCR, *Foeniculum vulgare*