مقاله پژوهشی، صفحات ۱۲۷-۱۱۵

تجمع نیکل و تاثیر آن بر فعالیت آنتی اکسیدانی گیاه *Alyssum bracteatum* L. و *A. longistylum* در شرایط کشت در شیشه

اکرم گلچین، علی اکبر احسانپور* و مرضیه تقی زاده

ایران، اصفهان، دانشگاه اصفهان، دانشکده علوم و فناوری‌های زیستی، گروه زیست شناسی گیاهی و جانوری

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۶/۰۹ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۹/۰۷

چکیده

هدف از انجام این پژوهش بررسی مقدار تجمع فلز نیکل در بخش‌های هوایی و ریشه، وزن خشک و فعالیت برخی آنزیم‌های آنتی اکسیدانی در گیاهچه‌های حاصل از کشت در غلظت‌های مختلف فلز نیکل (۰، ۲۵، ۵۰، ۷۵، ۱۰۰ و ۲۵۰ میلی‌گرم در لیتر) در دو جمعیت سرپنتین هرسین و غیر سرپنتین سمیرم گونه *A. bracteatum* و جمعیت سرپنتین دیزج گونه *A. longistylum* در شرایط کشت *درون شیشه‌ایی* بود. نتایج نشان داد با افزایش غلظت نیکل میزان انباشتگی این عنصر در بخش‌های هوایی و ریشه هر سه جمعیت افزایش یافت، اما در غلظت ۲۵۰ میلی‌گرم در لیتر مقدار انباشتگی این عنصر در ریشه بیشتر از بخش هوایی بود. وزن خشک بخش هوایی در تمامی غلظت‌ها کاهش یافت. بررسی فعالیت آنزیم‌های کاتالاز و آسکوربات پراکسیداز و مقدار تجمع پرولین در بخش‌های هوایی در هر سه جمعیت نشان داد که با افزایش تیمارهای نیکل مقدار فعالیت آنزیم‌های کاتالاز و آسکوربات پراکسیداز و هم‌چنین مقدار تجمع پرولین در بخش‌های هوایی افزایش یافت. در غلظت ۲۵۰ میلی‌گرم بر لیتر، در هر سه جمعیت بیشترین کاهش وزن خشک و فعالیت آنزیم کاتالاز و آسکوربات پراکسیداز مشاهده شد که در جمعیت هرسین نسبت به بقیه این کاهش کمتر بود. بنابراین بر اساس نتایج به‌دست آمده به نظر می‌رسد که جمعیت سرپنتین نسبت به جمعیت غیر سرپنتین مقاومت بیشتری نسبت به افزایش غلظت نیکل در محیط نشان داد. جمعیت غیر سرپنتین سمیرم نیز رفتار تقریباً مشابه با جمعیت‌های سرپنتین هرسین و دیزج در شرایط کشت درون شیشه‌ایی نشان می‌دهد و قادر به جذب و تجمع مقادیر بالایی از نیکل می‌باشد. احتمالا این نتیجه بدلیل شرایط درون شیشه و متفاوت با شرایط طبیعت می باشد.

واژه های کلیدی: سرپنتین، فلزات سنگین، کشت بافت گیاهی، نیکل.

* نویسنده مسئول، پست الکترونیکی: ehsanpou@sci.ui.ac.ir

مقدمه

فلزات سنگین موادی هستند که به طور طبیعی در خاک وجود داشته و یا در نتیجه فعالیت‌های انسان وارد خاک می‌شوند (۲۴). بالا رفتن غلظت فلزات سنگین در خاک باعث ایجاد سمیت و توقف رشد و نابودی بسیاری از گیاهان می‌شود. فلزات سنگین به عنوان آلاینده محسوب می‌شوند زیرا در خاک غیر قابل تجزیه هستند، توسط گیاهان جذب و وارد زنجیره‌های غذایی می‌شوند و در نهایت سلامتی انسان را به مخاطره می‌اندازند (۳۴ و ۳۷). وجود مقادیر سمی فلزات سنگین در محیط موجب کاهش رشد گیاهان و در حالت شدیدتر باعث از بین رفتن گیاهان می‌گردد. احتمالاً علائم سمیت به واسطه گستره‌ای از روابط متقابل در سطح سلولی ملکولی باشد (۱۲). سمیت ممکن است ناشی از پیوند فلزات با گروه‌های سولفیدریل پروتئین‌ها باشد که مانع از فعالیت آن‌ها می‌شود یا باعث تغییر و تخریب ساختمان آن‌ها می‌گردد، یا در نتیجه جایگزینی فلز سمی به جای یک عنصر ضروری مانند جایگزینی کادمیوم به جای روی می باشد (۶و ۱۸).

عنصر نیکل دارای عدد اتمی ۲۸ و عدد جرمی ۵۸/۶۹ می‌باشد و جزء عناصر حد واسط محسوب می‌شود. عنصر نیکل می‌تواند جایگزین عناصر در متالوآنزیم‌ها شده و مسیرهای متابولسمی را بر هم بزند. میزان نیکل در خاک‌های معمولی کمتر از ۱۰۰ میکروگرم در گرم می‌باشد ولی میزان آن در خاک‌های غنی از این فلز تا بیش از ۲۵۰۰ میکروگرم در گرم هم گزارش شده است (۶). اساس نیاز گیاهان به نیکل هنوز مشخص نیست، اما ممکن است این عنصر با تحریک نیتروژن در دوره جوانه‌زنی بذر در ارتباط باشد. مشخص شده است که نیکل جزئی از ساختمان دو آنزیم است: اوره آز و هیدروژناز. اوره آز، اوره را به NH_3 تبدیل می‌کند و در سلسله گیاهان به وفور یافت می‌شود (۳۶). به طور کلی اساس سمیت یون‌های فلزات سنگین از جمله نیکل توانایی آن‌ها برای اتصال محکم به اتم‌های اکسیژن، ازت و فسفر است. این اتم‌ها به ویژه در ساختار پروتئین به فراوانی وجود داشته و عموماً تأثیر این فلزات بر روی ساختارهای پروتئینی به ویژه آنزیم‌ها است (۱۳).

Alyssum یک گیاه علفی یک ساله، دو ساله، چند ساله است که اغلب گونه‌ها در جاهای خشک، صخره ای، سنگی یا شنی یا روی تخته سنگ‌ها واقع می‌شوند. این جنس در ایران دارای ۲۹ گونه است که ۵ گونه ی آن اندمیک این کشور می باشد. اولین بار در سال ۱۹۴۸ گونه *A. bertolonii* Desv که بیش از ۱٪ نیکل را در برگ های خود تجمع داده بود از مناطق سرپنتین ایتالیا گزارش گردید و بعنوان اولین بیش تجمع دهنده نیکل شناخته شد (۲۹). گیاهان بومی مناطق سرپنتینی به بالاترین سطح فلزات سنگینی مانند نیکل مقاوم هستند که آن‌ها را فلزدوست (metallophyte) می‌نامند. این گیاهان بر اساس میزان انباشت فلز در اندام-های هوایی و زیرزمینی به ترتیب به عنوان بیش تجمع دهنده (Hyperaccumulator) و محدودکننده(Excluders) معرفی شده‌اند (۳۱). چند سال بعد در سال ۱۹۶۱ دومین بیش تجمع دهنده نیکل به نام *A. murale* با بیش از ۱٪ نیکل در برگ هایش گزارش شد (۵). گونه *A. bracteatum* یک گیاه بومی ایران بوده که در نقاط مختلف کشور در روی خاک‌های سرپنتین و غیرسرپنتین یافت می‌شود (۵). بر اساس نتایج حاصله، این دو گونه قادرند نیکل را به ترتیب تا بیش از ۸۰۵۰ و ۲۳۰۰ میکروگرم بر گرم تجمع دهند. گونه *A. longistylum* فقط بر خاک‌های سرپنتین آذربایجان غربی یافت شد ولی گونه *A. bracteatum* به طور گسترده بر روی خاک‌های سرپنتین استان کرمانشاه (هرسین) و آذربایجان غربی (دیزج) یافت شد (۱۷).

تا کنون گزارش‌های معدودی در زمینه تاثیر فلزات سنگین بر رشد گیاهان در شرایط کشت در شیشه منتشر شده است، به عنوان مثال اثر کادمیوم بر روی فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانت (۳۰ و ۳۲)، باززایی گیاه مقاوم به فلز سنگین *Arabidopsis halleri* (۱۲)، اثر تنش کادمیوم روی کالوس نیشکر (۱۶)، اثر نیکل روی فعالیت آنزیم اوره‌آز و کاهش استرس‌های متابولیکی (۳۷). با این وجود این، هیچ‌گونه اطلاعاتی روی گونه *A. bractatum* در شرایط کشت در شیشه وجود ندارد. با توجه به مطالعات اولیه مبنی بر قابلیت بالای گیاه*A. bractatum* در جذب و تجمع نیکل، بنابراین هدف این پژوهش بکار گیری روش کشت بافت به عنوان یک مدل سریع و کاملا کنترل شده برای مطالعات فیزیولوژیکی اثر نیکل بر گیاه *Alyssum* و پاسخ گیاه در برابر نیکل از قبیل مقدار جذب فلز نیکل توسط گیاه و تغییرات پرولین و برخی آنزیم‌های آنتی اکسیدانی می‌باشد. نتایج حاصل از این بررسی می‌تواند در جهت بررسی اثرات نیکل و پاسخ فیزیولوژیکی گیاه *Alyssum* و مقایسه بین دو گونه سرپنتین و غیر سرپنتین به منظور استفاده از این گیاهان در زدایش آلودگی‌های فلزی و همچنین احیای پوشش گیاهی مراتع به ویژه در خاک‌های آلوده به فلزات سنگین مورد استفاده قرار گیرد.

مواد و روشها

بذر گونه‌های مختلف شامل *A. bractaetum* از دو جمعیت سرپنتین هرسین و غیرسرپنتین سمیرم و گونه ی

A. longistylum پس از شستشوی اولیه با آب، به مدت ۳-۲ دقیقه در الکل ۷۰٪ قرار داده شد. بعد توسط محلول سدیم هیپوکلریت ۱۰٪ حجمی به مدت ۱۵ دقیقه ضدعفونی سپس با آب مقطر استریل ۳ بار شسته و بر روی محیط کشت (MS) (۲۵) و در شرایط در شیشه کشت و تکثیر گردید. جهت تیمار با نیکل از نمک سولفات نیکل $6H_2O$. $Ni(SO_4)$ استفاده شد. به منظوراعمال تیمار، از گیاهان تکثیر شده قطعات ساقه با ۳-۲ جوانه جانبی جدا و در هر شیشه کشت حاوی غلظت‌های مختلف نیکل (۰، ۲۵، ۵۰، ۱۰۰ و ۲۵۰ میلی‌گرم در لیتر)، با تعداد ۵ قطعه جدا کشت و حداقل ۵ تکرار در اطاق کشت با دمای ۲۵ درجه سانتیگراد و تحت تابش نور ۲۰۰۰ لوکس با فتوپریود ۱۶ ساعت نور و ۸ ساعت تاریکی به مدت ۴ هفته رشد داده شدند.

اندازه گیری نیکل: اندازه‌گیری میزان فلز نیکل موجود در اندام هوائی و ریشه از روش Reeves و همکارانش (۲۹) استفاده شد. بر اساس این روش،۵۰ میلی‌گرم اندام هوائی و ریشه به طور جداگانه از هر یک از جمعیت‌ها وزن و درون لوله آزمایش ۱۰mL ریخته و به هر لوله ۲mL نیتریک اسید (۶۵٪) اضافه گردید. سپس نمونه‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای آزمایشگاه و زیر هود نگهداری شدند. در مرحله بعد نمونه‌ها به مدت ۴-۳ ساعت در کوره شنی با دمای ۱۰۰-۹۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. پس از سرد شدن، مقدار ۱mL از H_2O_2 (۳۵٪) به هر یک از لوله‌ها اضافه و نمونه‌ها مجدداً به مدت ۱ ساعت در کوره شنی با دمای ۹۰-۱۰۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. پس از سرد شدن هر یک از لوله‌ها توسط آب مقطر به حجم ۱۰mL رسانده شد و سپس مقدار عنصر در آن‌ها توسط دستگاه طیف‌سنج جذب اتمی(Atomic Absorption Spectrophotometer مدل Shimadzu 6200 آنالیز شد.

اندازه‌گیری میزان پرولین: برای اندازه‌گیری پرولین، ابتدا ۴۰ میلی‌گرم از بافت‌های گیاهی با ۱/۷ml اسید سولفوسالیسیلیک ۳٪ (W/V) به‌خوبی ساییده شد تا به‌طور کامل یکنواخت گردید. عصاره‌های حاصل به مدت ۲۰ دقیقه در ۱۴۰۰۰rpm سانتریفوژ شدند. در مرحله‌ی بعدی به ۱ml سوپرنوتانت هر نمونه، ۱ml اسید استیک گلاسیال و ۱ml معرف نین‌هیدرین اضافه شد و به مدت ۱ ساعت در دمای ۱۰۵-۱۰۰ درجه سانتی‌گراد داخل بن‌ماری حرارت داده شدند. پس خنک شدن به هر لوله ۲ml تولوئن اضافه شد. سپس لوله‌ها به مدت ۳۰ دقیقه در دمای آزمایشگاه ثابت نگه داشته شدند. در طی این مدت زمان دو فاز آلی (صورتی در بالا) و فاز آبی(بیرنگ و شفاف در پایین) در هر لوله تشکیل شد. از هر لوله ۱ml از فاز بالایی برداشته و داخل کوت کوارتز ریخته شد.سپس جذب ترکیب رنگی هر نمونه در طول موج ۵۲۰ نانومتر خوانده شد (۱۰).

اندازه‌گیری

میزان فعالیت آنزیم کاتالاز و آسکوربات پراکسیداز: ابتدا ۰/۱ گرم از نمونه‌های اندام هوائی و ریشه جداگانه آماده شده و در ۱۵۰۰ میکرولیتر بافر فسفات (۰/۰۲ گرم KH_2PO_4، ۰/۱۴ گرم Na_2HPO_4، ۰/۸ گرم NaCl، ۰/۰۲ گرم KCl، ۱ گرم) حاوی پلی وینیل پیرولیدن(PVP) در pH برابر ۷/۴ عصاره گیری شدند (۱۸). سپس، در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه در ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد و به وسیله دستگاه اسپکتروفتومتری میزان فعالیت آنزیم تعیین شد.

برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیم کاتالاز و آسکوربات پراکسیداز ابتدا محلول واکنش مورد نیاز آنزیم بر اساس روش Nakano and Asada تهیه گردید و سپس توسط دستگاه اسپکتروفتومتری در طول موج ۲۴۰ و ۲۹۰ نانومتر قرائت گردید (۲۶ و ۲۸). میزان فعالیت آنزیم با استفاده از فرمول زیر محاسبه گردید:

$$EA = [\Delta OD \times (1000/A) \times B] / EC \times C$$

EA: میزان فعالیت آنزیم

EC: ضریب خاموشی پراکسید هیدروژن برابر با ۰/۰۳۹ و ضریب خاموشی آسکوربات برابر با ۲/۶ میکرومول بر سانتیمتر است.

A: مقدار نمونه اضافه شده به کوت

B: مقدار بافر فسفات اضافه‌شده به نمونه جهت ساییدن

C: وزن بافت انتخابی جهت ساییدن

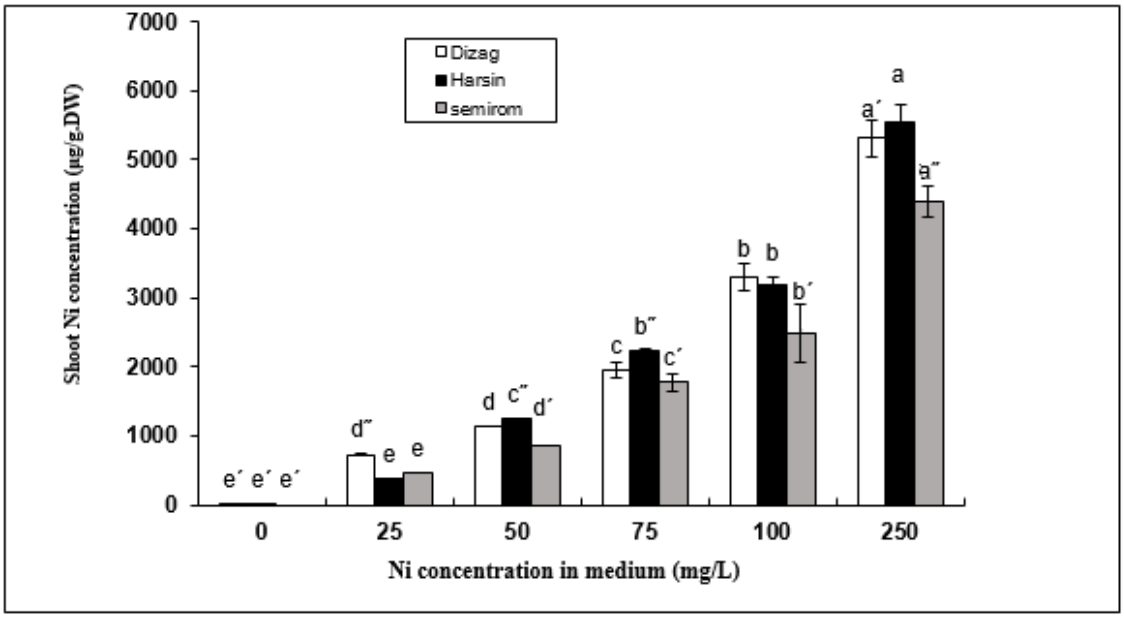
آنالیز آماری داده‌ها: آنالیز واریانس دو راهه (Two Way ANOVA) بر روی داده‌های حاصل از بررسی تیمارهای مختلف بر مقدار تجمع فلز در بخش‌های هوایی و ریشه، وزن خشک و میزان فعالیت آنزیم در هر دو گونه با نرم افزار SPSS، در قالب طرح فاکتوریل کاملا تصادفی با پنج تکرار انجام گرفت. جهت بررسی معنی‌دار بودن میانگین‌ها از آزمون دانکن در سطح $P\leq 0/05$ استفاده شد.

نتایج

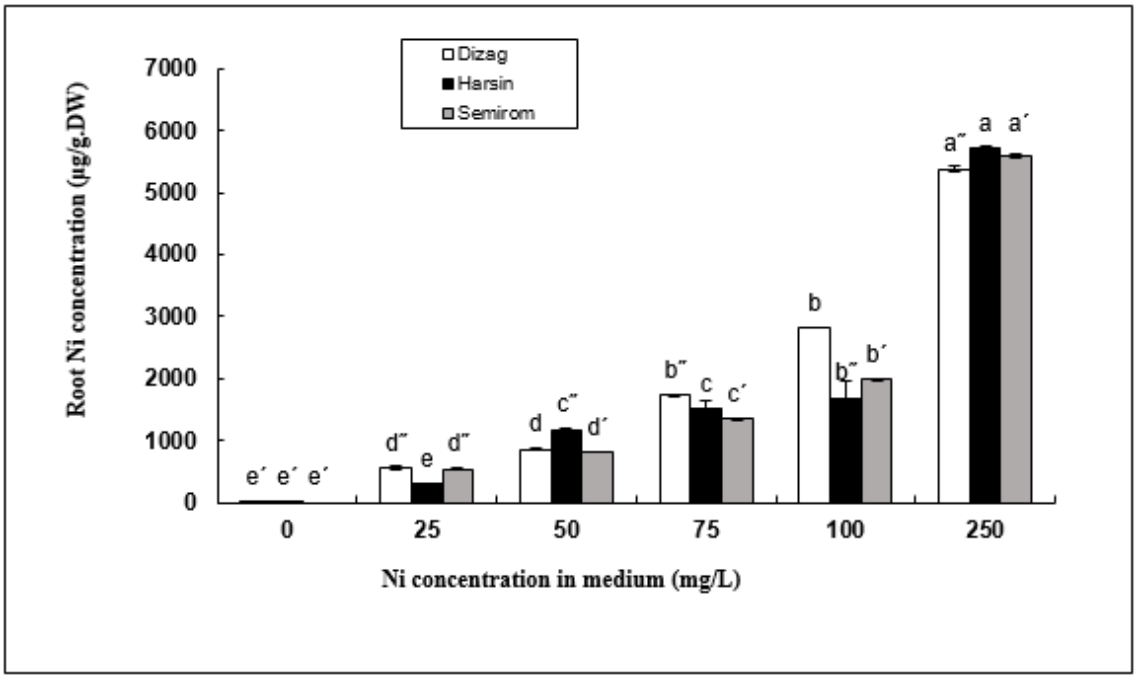
مقدار انباشتگی نیکل در بخش‌های هوایی: نتایج حاصل از میزان نیکل تجمع یافته تحت اثر غلظت‌های مختلف نیکل (۰، ۲۵، ۵۰، ۷۵ ،۱۰۰ و ۲۵۰ میلی‌گرم در لیتر) در بخش‌های هوایی دو جمعیت از گونه *A. bractaetum* (جمعیت سرپنتین هرسین و غیرسرپنتین سمیرم) و گونه *A. longistylum* از جمعیت سرپنتین دیزج (نمودار ۱) نشان می‌دهد که مقدار فلز تجمع یافته تحت اثر غلظت‌های مختلف نیکل در بخش‌های هوایی گیاه در سطح ۵ درصد معنی‌دار می‌باشد و با افزایش غلظت نیکل سه جمعیت به طور معنی‌داری بر میزان فلز جذب شده و تجمع یافته در بخش‌های هوایی گیاه افزوده شده است. بر اساس نتایج به دست آمده، در هر سه جمعیت کمترین و بیشترین مقدار تجمع نیکل به ترتیب در غلظت‌های ۲۵ و ۲۵۰ میلی گرم برلیتر نیکل مشاهده شد. مقدار فلز تجمع یافته در بخش‌های هوایی در جمعیت سرپنتین دیزج بین حداقل ۷۲۴/۴۳ میکرو گرم در گرم وزن خشک در غلظت ۲۵ میلی‌گرم در لیتر نیکل و حداکثر ۵۳۰۸ میکروگرم در گرم وزن خشک در غلظت ۲۵۰ میلی‌گرم در لیتر نیکل بود. هچنین تجمع نیکل در جمعیت سرپنتین هرسین بین حداقل ۳۷۲/۵۷ میکرو گرم در گرم وزن خشک در غلظت ۲۵ میلی‌گرم در لیتر نیکل و حداکثر ۵۵۵۷ میکروگرم در گرم وزن خشک در غلظت ۲۵۰ میلی گرم در لیتر نیکل مشاهده شد. در جمعیت غیرسرپنتین سمیرم، تجمع نیکل بین حداقل ۴۵۶/۹۵ میکروگرم در گرم وزن خشک در غلظت ۲۵ میلی‌گرم در لیتر نیکل و حداکثر ۴۳۹۰ میکروگرم در گرم وزن خشک در غلظت ۲۵۰ میلی‌گرم در لیتر نیکل متغیر بود. کمترین و بیشترین مقدار تجمع نیکل در بخش هوایی بین جمعیت‌های مختلف، به ترتیب در جمعیت سرپنتین هریسین در غلظت ۲۵ و ۲۵۰ میلی‌گرم در لیتر نیکل مشاهده شد. بر اساس نتایج، جمعیت غیر سرپنتین سمیرم کمترین مقدار تجمع نیکل در بخش هوایی را در تمامی غلظت‌های نیکل در مقایسه با سایر جمعیت‌ها نشان داد.

مقدار انباشتگی نیکل در ریشه: نتایج مقدار نیکل تجمع یافته تحت اثر غلظت‌های مختلف (۰، ۲۵، ۵۰، ۷۵ ،۱۰۰و ۲۵۰ میلی‌گرم در لیتر) در ریشه (نمودار ۲) نشان می‌دهد که مقدار فلز تجمع یافته تحت اثر غلظت‌های مختلف در ریشه گیاه در سطح ۵ درصد معنی‌دار می‌باشد و با افزایش غلظت نیکل به طور معنی‌داری بر میزان فلز جذب شده در ریشه گیاه افزوده شده است ($P<$ ۰/۰۵). بر اساس نتایج بدست آمده، مقدار فلز تجمع یافته در ریشه در تیمارهای اعمال شده، در جمعیت سرپنتین دیزج بین حداقل ۵۵۴/۳۷ میکروگرم در گرم وزن خشک در غلظت ۲۵ میلی‌گرم در لیتر نیکل و حداکثر ۵۳۸۵ میکروگرم در گرم وزن خشک در غلظت ۲۵۰ میلی‌گرم در لیتر نیکل مشاهده شد. همچنین، در جمعیت سرپنتین هرسین بین حداقل ۲۹۱/۶۸ میکروگرم در گرم وزن خشک در غلظت ۲۵ میلی‌گرم در لیتر نیکل و حداکثر ۶۷۲۹ میکروگرم در گرم وزن خشک در غلظت ۲۵۰ میلی‌گرم در لیتر نیکل و در جمعیت غیرسرپنتین سمیرم بین حداقل ۵۴۰/۹۴ میکروگرم در گرم

وزن خشک در غلظت ۵ میلی‌گرم در لیتر نیکل و حداکثر ۵۵۹۳ میکروگرم در گرم وزن خشک در غلظت ۲۵۰ میلی- گرم در لیتر نیکل متغیر بوده است.



نمودار ۱: مقدار نیکل تجمع یافته در بخش‌های هوایی گیاه*A. bractaetum* از دو جمعیت سرپنتین هرسین و غیرسرپنتین سمیرم و گونه ی *A. longistylum* جمعیت سرپنتین دیزج تحت تیمار غلظت‌های ۰، ۲۵، ۵۰، ۷۵، ۱۰۰ و ۲۵۰ میلی‌گرم در لیتر نیکل در شرایط کشت درون شیشه ایی. مقادیر میانگین پنج تکرار از هر جمعیت ± انحراف معیار می‌باشد. حروف متفاوت در هر ستون از هر جمعیت بیانگر معنی‌دار بودن داده ها، با استفاده از آزمونDuncan می‌باشد ($P<۰/۰۵$).

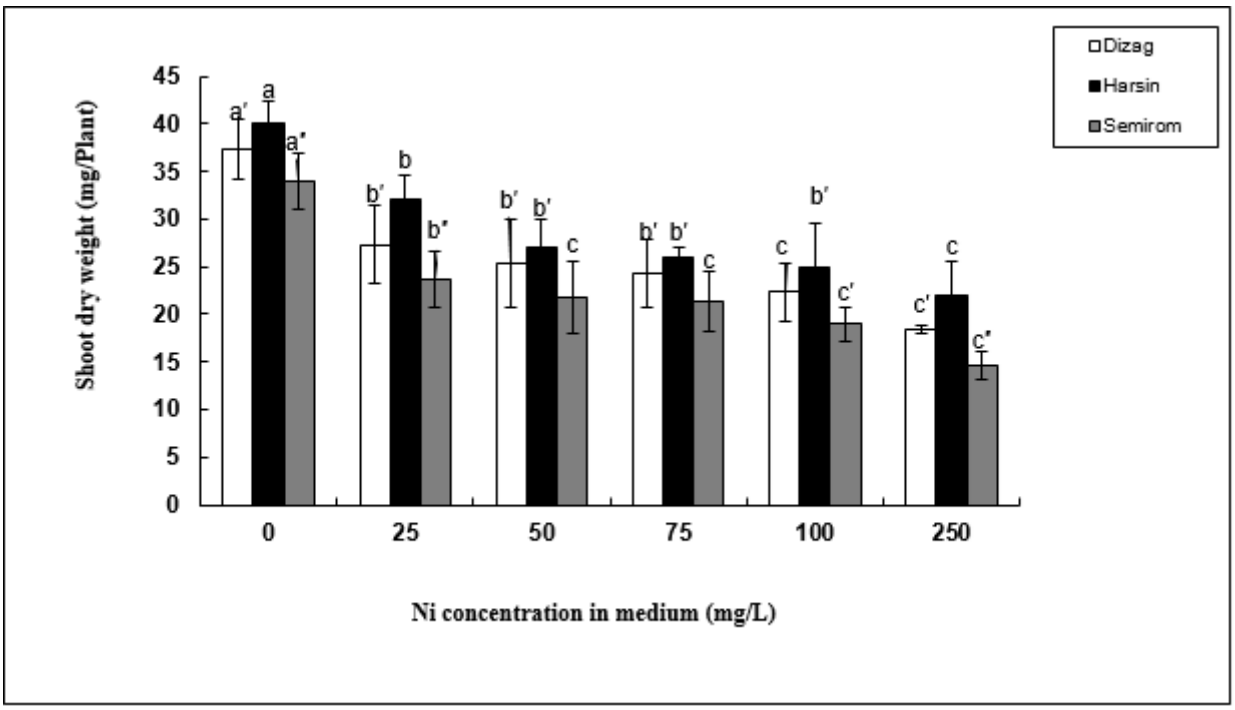


نمودار ۲: مقدار نیکل تجمع یافته در ریشه گیاه*A. bractaetum* از دو جمعیت سرپنتین هرسین و غیرسرپنتین سمیرم و گونه ی *A. longistylum* جمعیت سرپنتین دیزج تحت تیمار غلظت‌های ۰، ۲۵، ۵۰، ۷۵، ۱۰۰ و ۲۵۰ میلی‌گرم در لیتر نیکل در شرایط کشت درون شیشه ایی. مقادیر میانگین پنج تکرار از هر جمعیت ± انحراف معیار می‌باشد. حروف متفاوت در هر ستون از هر جمعیت بیانگر معنی‌دار بودن داده‌ها، با استفاده از آزمونDuncan می‌باشد ($P<۰/۰۵$).

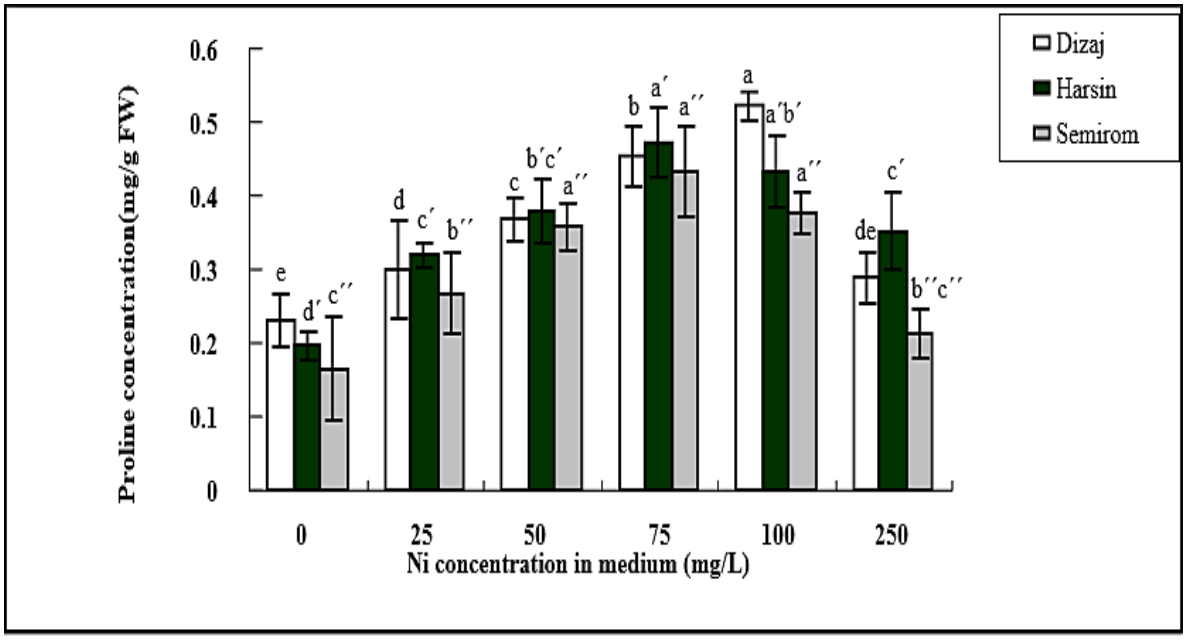
از نظر آماری بین سه جمعیت مذکور از نظر میزان انباشتگی نیکل در ریشه در غلظت‌های مختلف نیکل تفاوت معنی‌داری وجود دارد (P<۰/۰۵). کمترین و بیشترین مقدار تجمع نیکل در ریشه بین جمعیت‌های مختلف، به ترتیب در جمعیت سرپنتین هریسین در غلظت۲۵ و ۲۵۰ میلی‌گرم در لیتر نیکل مشاهده شد.

وزن خشک: نتایج حاصل از اندازه گیری وزن خشک تحت اثر غلظت‌های مختلف نیکل (۰، ۲۵، ۵۰، ۷۵، ۱۰۰ و ۲۵۰ میلی گرم در لیتر) در بخش‌های هوایی هر سه جمعیت (نمودار ۳) نشان می‌دهد که با افزایش غلظت نیکل به طور معنی‌داری مقدار وزن خشک در بخش هوایی کاهش یافته است (P< ۰/۰۵). بر اساس نتایج بدست آمده، کمترین وزن خشک بخش هوایی بین جمعیت‌های مختلف، در جمعیت غیرسرپنتین سمیرم در غلظت۲۵۰ میلی‌گرم در لیتر نیکل مشاهده شد.

اندازه‌گیری مقدار پرولین: نتایج حاصل از اندازه گیری مقدار پرولین تحت اثر غلظت‌های مختلف نیکل (۰، ۲۵، ۵۰، ۷۵، ۱۰۰ و ۲۵۰ میلی گرم در لیتر) در بخش‌های هوایی گیاه در سطح ۵ درصد معنی‌دار می‌باشد و با افزایش غلظت نیکل به طور معنی‌داری بر مقدار تجمع پرولین در بخش‌های هوایی گیاه افزوده شده است (نمودار ۳). در جمعیت سرپنتین دیزج با افزایش غلظت نیکل در محیط کشت تا غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر میزان پرولین به تدریج افزایش یافته است، اما در غلظت ۲۵۰ میلی‌گرم در لیتر نیکل در محیط کشت میزان پرولین کاهش می‌یابد.



نمودار۳: وزن خشک بخش هوایی گیاه*A. bractaetum* از دو جمعیت سرپنتین هرسین و غیرسرپنتین سمیرم و گونه ی *A. longistylum* جمعیت سرپنتین دیزج تحت تیمار غلظت‌های ۰، ۲۵، ۵۰، ۷۵، ۱۰۰ و ۲۵۰ میلی‌گرم در لیتر نیکل در شرایط کشت درون شیشه ایی. مقادیر میانگین پنج تکرار از هر جمعیت ± انحراف معیار می‌باشد. حروف متفاوت در هر ستون از هر جمعیت بیانگر معنی‌دار بودن داده ها، با استفاده از آزمونDuncan می‌باشد (P<۰/۰۵).



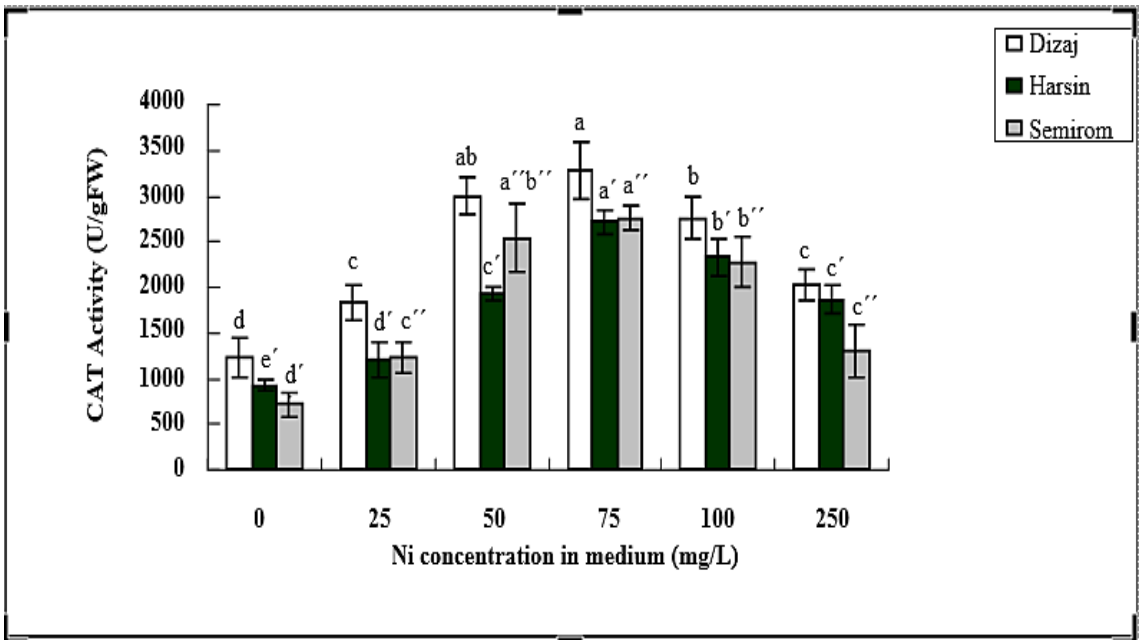
نمودار ۳: اثر غلظت‌های ۰، ۲۵، ۵۰، ۷۵، ۱۰۰ و ۲۵۰ میلی‌گرم در لیتر نیکل بر مقدار پرولین بخش‌های هوایی گیاه*A. bractaetum* از دو جمعیت سرپنتین هرسین و غیرسرپنتین سمیرم و گونه ی *A. longistylum* جمعیت سرپنتین دیزج در شرایط کشت درون شیشه ایی. مقادیر میانگین پنج تکرار از هر جمعیت ± انحراف معیار می‌باشد. حروف متفاوت در هر ستون از هر جمعیت بیانگر معنی‌دار بودن داده ها، با استفاده از آزمون Duncan می‌باشد ($P<۰/۰۵$).

در جمعیت سرپنتین هرسین وغیرسرپنتین سمیرم هم با افزایش غلظت نیکل میزان پرولین به تدریج افزایش یافته است به طوری‌که بیشترین مقدار پرولین در تیمار ۷۵ و ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر نیکل است و با افزایش غلظت نیکل محیط میزان پرولین کاهش می‌یابد. بیشترین مقدار پرولین در جمعیت سرپنتین دیزج در غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر نیکل مشاهده شد.

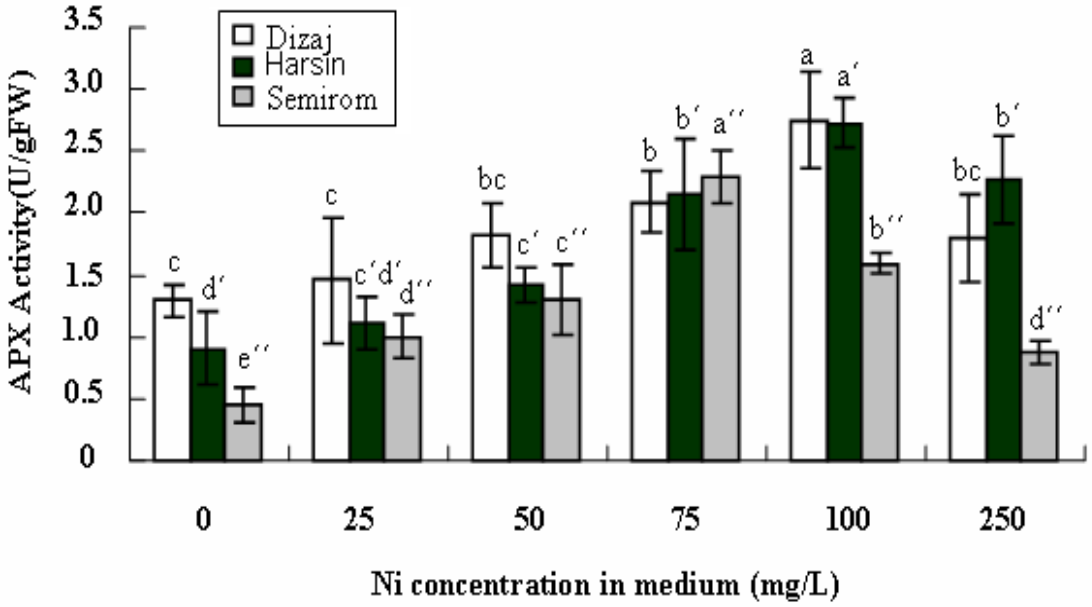
اندازه‌گیری میزان فعالیت آنزیم کاتالاز: نتایج آنالیز میزان فعالیت آنزیم کاتالاز تحت اثر غلظت‌های مختلف نیکل (۰، ۲۵، ۵۰، ۷۵، ۱۰۰ و ۲۵۰ میلی گرم در لیتر) در بخش‌های هوایی هر سه جمعیت دیزج، هرسین و سمیرم در شرایطکشت در شیشه نشان می‌دهد که با افزایش غلظت نیکل به طور معنی‌داری بر میزان فعالیت آنزیم در بخش‌های هوایی گیاه افزوده شده است (نمودار ۴). میزان فعالیت آنزیم کاتالاز در تمام غلظت‌های اثر داده شده نسبت به کنترل اختلاف معنی‌داری دارد. در هر سه جمعیت بیشترین میزان فعالیت آنزیم در تیمار ۷۵ میلی‌گرم در لیتر نیکل مشاهده شد و با افزایش غلظت نیکل محیط میزان فعالیت آنزیم کاتالاز کاهش می‌یابد. بیشترین میزان فعالیت آنزیم کاتالاز در جمعیت سرپنتین دیزج و در تیمار ۷۵ میلی‌گرم در لیتر نیکل مشاهده شد.

اندازه‌گیری میزان فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز: نتایج اندازه‌گیری میزان فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز تحت اثر غلظت‌های مختلف نیکل در بخش‌های هوایی هر سه جمعیت دیزج، هرسین و سمیرم در شرایط کشت در شیشه نشان می‌دهد (نمودار ۵) که اثر تیمارهای مختلف نیکل بر میزان فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز در بخش‌های هوایی گیاه در سطح ۵ درصد معنی‌دار می‌باشد. در هر دو جمعیت سرپنتین دیزج و هرسین با افزایش غلظت نیکل در محیط کشت تا غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر میزان فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز به تدریج افزایش یافته است، اما در غلظت ۲۵۰ میلی‌گرم در لیتر نیکل در محیط کشت میزان فعالیت این آنزیم کاهش یافته است.

مقاله پژوهشی، صفحات ۱۲۷-۱۱۵



نمودار ۴: اثر غلظت‌های ۰، ۲۵، ۵۰، ۷۵، ۱۰۰ و ۲۵۰ میلی‌گرم در لیتر نیکل بر فعالیت آنزیم کاتالاز بخش‌های هوایی گیاه*A. bractaetum* از دو جمعیت سرپنتین هرسین و غیرسرپنتین سمیرم و گونه ی *A. longistylum* جمعیت سرپنتین دیزج در شرایط کشت درون شیشه ایی. مقادیر میانگین پنج تکرار از هر جمعیت ± انحراف معیار می‌باشد. حروف متفاوت در هر ستون از هر جمعیت بیانگر معنی‌دار بودن داده‌ها، با استفاده از آزمون Duncan می‌باشد ($P<۰/۰۵$).



نمودار ۵: اثر غلظت‌های ۰، ۲۵، ۵۰، ۷۵، ۱۰۰ و ۲۵۰ میلی‌گرم در لیتر نیکل بر فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز بخش‌های هوایی گیاه *A. bractaetum* از دو جمعیت سرپنتین هرسین و غیرسرپنتین سمیرم و گونه ی *A. longistylum* جمعیت سرپنتین دیزج در شرایط کشت درون شیشه ایی. مقادیر میانگین پنج تکرار از هر جمعیت ± انحراف معیار می‌باشد. حروف متفاوت در هر ستون از هر جمعیت بیانگر معنی‌دار بودن داده ها، با استفاده از آزمون Duncan می‌باشد ($P<۰/۰۵$).

در جمعیت غیرسرپنتین سمیرم با افزایش غلظت نیکل محیط کشت میزان فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز افزایش یافته است، به‌طوری‌که بیشترین میزان فعـــــالیت این آنـزیم در تیمار ۷۵ میلی‌گرم در لیتر نیکل مشاهده شد. از این نظر بین تمام تیمارها و کنترل اختلاف معنی‌داری مشاهده می‌شود ($P<۰/۰۵$). بیشترین فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز در جمعیت سرپنتین دیزج تحت تیمار ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر نیکل مشاهده شد.

بحث

غلظت بالای نیکل در خاک‌های سرپنتین یکی از تنش‌های مهم برای گیاهان محسوب می‌شود. با این وجود برخی گیاهان سازگاری های متفاوتی برای رویارویی با این تنش محیطی کسب کرده‌اند. یکی از مهم‌ترین پارامترهایی که در گیاهان تحت تأثیر تنش‌های مختلف از جمله سمیت نیکل دچار تغییر شده، وزن خشک می‌باشد. بدیهی است که گیاهان مقاوم در چنین شرایطی قادر به رشد و نمو و حفظ عملکرد خود می‌باشند (۲۲). بررسی و مقایسه نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد که با افزایش غلظت نیکل در محیط کشت وزن خشک بخش‌های هوایی در هر سه جمعیت به طور معنی‌داری کاهش یافت، و از این نظر بین تمام تیمارها و کنترل اختلاف معنی‌داری وجود دارد. در تیمار با بالاترین غلظت نیکل (۲۵۰ میلی‌گرم در لیتر نیکل) وزن خشک به شدت کاهش نشان داد که دلیل آن می‌تواند سمیت نیکل در مقادیر بالا باشد که باعث مرگ گیاهچه‌ها شده است. همچنین کاهش رشد جمعیت‌های سرپنتین نسبت به جمعیت غیر سرپنتین کمتر بوده است. بنابراین، پاسخ رشد جمعیت‌های سرپنتین دیزج و هرسین نسبت به افزایش نیکل در محیط کشت نشان دهنده مقاومت بیشتر این گیاهان نسبت به جمعیت غیر سرپنتین سمیرم است. این نتایج همسو با گزاراشات پیشین می‌باشد **(۲۰)**. نتایج حاصل از آنالیز مقدار فلز تجمع یافته در بخش‌های هوایی و ریشه گیاهچه‌های هر سه جمعیت دیزج، هرسین و سمیرم نشان می‌دهد که در تمامی غلظت‌های به غیر از غلظت ۲۵۰ میلی‌گرم بر لیتر نیکل، در هر سه جمعیت سرپنتین دیزج، هرسین و سمیرم مقدار نیکل تجمع یافته در بخش‌های هوایی نسبت به ریشه بیشتر است، که این افزایش مقدار در جمعیت‌های سرپنتین هرسین و دیزج بسیار بیشتر از جمعیت غیر سرپنتین سیمرم است. دلیل این امر، احتمالا وجود مکانیسم‌های موثر انتقال نیکل از ریشه به ساقه موجود در جمعیت‌های سرپنتین است که منجر به انباشتگی این فلز در بخش هوایی شده است که این امر توسط دیگر پژوهشگران نیز گزارش شده است (۲۷). بنابراین تصور می‌شود سازوکارهای سمیت زدایی در افزایش تحمل این گیاهان نسبت به افزایش غلظت نیکل در محیط کشت نقش داشته باشد. بر اساس نتایج این پژوهش و با توجه به این‌که گیاهی که توانایی انباشته کردن بیشتر فلزات را در اندام های هوایی نسبت به ریشه دارد توانایی و استعداد بالاتری به عنوان انباشت‌ساز دارد، بنابراین می-توان نتیجه گرفت که هر سه جمعیت هم می‌تواند کاندید مناسبی جهت پالایش محیط از فلز سنگین نیکل باشد و جمعیت غیر سرپنتین سمیرم نیز مشابه یک گونه سرپنتین قادر به تجمع مقادیر بالایی از نیکل در بافت‌های خود است. در غلظت ۲۵۰ میلی‌گرم برلیتر هر سه جمعیت رفتاری متفاوت با غلظت‌های کمتر نشان دادند. مقدار تجمع نیکل در ریشه و بخش هوایی در جمعیت سرپنتین دیزج تقریبا با هم برابر است. تجمع نیکل در ریشه دو جمعیت هرسین و سمیرم در غلظت ۲۵۰ میلی‌گرم بر لیتر، بیشتر از مقدار آن در بخش هوایی است. بنابراین بر اساس تعریفی که Baker ارائه داده است (۵)، در غلظت ۲۵۰ میلی‌گرم دو جمعیت سرپنتین هرسین و غیر سرپنتین سمیرم رفتاری مشابه با یک گیاه سد کننده انتقال نیکل به بخش هوایی را نشان دادند که در غلظت بالای نیکل انتقال فلزات سنگین از جمله نیکل از ریشه به بخش هوایی را محدود می‌کند، که یکی از دلایل آن می‌تواند دارا بودن صفات ژنتیکی و استعداد ذاتی گیاهان این گونه برای

جذب نیکل در غلظت‌های بالا باشد (۲۰). همچنین با توجه به این‌که در مقایسه با کشت گلدانی، در شرایط *in vitro* فلزات سنگین به طور کامل در دسترس گیاهان می‌باشند لذا این امر می‌تواند دلیل دیگری برای تغیر رفتار هر سه جمعیت در غلظت ۲۵۰ میلی‌گرم بر لیتر نیکل باشد.

یکی از مهم‌ترین اثرات سمی فلزات سنگین گیاهان تولید گونه‌های فعال اکسیژن است که شامل رادیکال‌های سوپراکسید، رادیکال‌های هیدروکسیل و هیدروژن پراکسید می‌باشد، غلظت بالای گونه‌های فعال اکسیژن باعث ایجاد تنش‌های اکسیداتیو می‌شود که منجر به آسیب دیدن ماکرومولکولها (لیپیدها، پروتئین‌ها و نوکلئیک اسیدها) می‌گردد (۴، ۱۵و ۳۷). در این حالت سیستم دفاع آنتی اکسیدانی در گیاهان از بروز این اثرات ممانعت می‌کند. این سیستم باعث حذف گونه‌های فعال اکسیژن از داخل سلول می‌شود و از بروز استرس‌های اکسیداتیو جلوگیری می‌کند. کاتالاز از جمله آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی است که میزان فعالیت آن در اغلب گیاهان در استرس نیکل افزایش می‌یابد (۷، ۹، ۱۹ و ۳۸). نتایج نشان می‌دهد که در هر سه جمعیت دیزج، هرسین و سمیرم با افزایش غلظت نیکل در محیط، میزان فعالیت آنزیم کاتالاز و آسکوربات پراکسیداز در بخش‌های هوایی افزایش یافته است. بیشترین مقدار فعالیت آنزیم کاتالاز و آسکوربات پراکسیداز مربوط به جمعیت سرپنتین دیزج و هرسین است. افزایش تولید گونه‌های فعال اکسیژن و به دنبال آن افزایش در فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدان کاتالاز، آسکوربات پراکسیداز و سوپراکسید دیسموتاز تحت تنش نیکل در گیاه در گیاه *Zea mays* (۱۵) *Cicer arietinum* مشاهده شد (۲۱). در غلظت ۲۵۰ میلی‌گرم در لیتر نیکل میزان فعالیت آنزیم کاتالاز و آسکوربات پراکسیداز در بخش‌های هوایی هر سه جمعیت به خصوص جمعیت سیمرم کاهش یافت، که علت این امر می‌تواند کاهش رشد و فعالیت بسیار کم و یا مرگ گیاهان به دلیل سمیت بالای نیکل در این غلظت باشد (۱۱). تیمار جمعیت‌های سرپنتین و غیرسرپنتین گونه‌های *Pistacia* با غلظت‌های مختلف نیکل نشان داد فعالیت آنزیم کاتالاز در همه گونه‌های تحت تیمار باغلظت‌های مختلف نیکل افزایش یافت اما با افزایش غلظت نیکل به ۱/۵ میلی مولار فعالیت این آنزیم کاهش یافت (۳). مقایسه فعالیت این دو آنزیم نشان می‌دهد که فعالیت آنزیم کاتالاز تحت تنش نیکل در هر سه جمعیت بسیار بالاتر از فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز است. به عبارت دیگر آنزیم کاتالاز در مقابله با استرس اکسیداتیو ناشی از وجود نیکل، نقش بسیار مهم‌تری نسبت به آنزیم آسکوربات پراکسیداز دارد. در مطالعه‌ایی مشابه با نتایج این پژوهش، فعالیت آنزیم کاتالاز در گیاه *Pistacia* تحت تیمار با غلظت‌های مختلف نیکل بسیار بیشتر از فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز بوده است (۳). دلیل چنین عکس العملی را می‌توان به قدرت کم میل ترکیبی (low affinity) آنزیم کاتالاز با سوبسترا و زیاد بودن میل ترکیبی (high affinity) آنزیم آسکوربات پراکسیداز در نظر گرفت. به عبارت دیگر تنش تجمع نیکل به میزان زیادی آب اکسیژنه تولید نموده که توانسته فعالیت آنزیم کاتالاز را بیشتر از آسکوربات پراکسیداز القاء نماید.

یکی دیگر از اثرات نیکل در گیاهان تجمع پرولین است که نقش حفاظتی دارد و البته نتیجه افزایش مستقیم فلز نیست، بلکه نتیجه بهم خوردن تعادل آب است که به سبب ورود فلز سنگین به وجود آمده است (۳و۳۵). بنابراین پرولین به عنوان یک اسمولیت سازگار در تنظیم اسمزی فضای داخل سلول‌های تحت استرس نیکل نقش دارد. پیشنهاد شده است که پرولین دارای نقش‌های محافظتی در سلول‌ها در برخورد با استرس نیکل مانند جمع نمودن رادیکال‌های آزاد، تنظیم اسمزی و حفظ وپایداری ماکرومولکول‌ها و ساختارهای سلولی و محافظت از آنزیم‌ها در مقابل آسیب‌های ناشی از نیکل می‌باشد (۴). بنابراین میزان تجمع پرولین در بخش‌های هوایی گونه *A. bractaetum* از جمعیت سرپنتین هرسین و جمعیت غیرسرپنتین سمیرم و گونه *A. longistylum* از جمعیت سرپنتین دیزج مورد

بررسی و مقایسه قرار گرفته است. با توجه به نقش پرولین به عنوان یک اسمولیت سازگار در تنظیم اسمزی، افزایش سنتز پرولین در غلظت‌های بالای فلز سنگین پدیده‌ای عادی می‌باشد. اما در تیمار با بالاترین غلظت نیکل (۲۵۰ میلی گرم در لیتر) میزان پرولین در بخش‌های هوایی هر سه جمعیت کاهش یافت، که علت این امر می‌تواند کاهش شدید رشد و فعالیت بسیار کم و یا مرگ گیاهان به دلیل سمیت بالای نیکل در این غلظت باشد. علاوه براین مشخص شده که پرولین خود نیز به عنوان یک آنتی اکسیدان در سلول‌های تحت تنش عمل می کند (۲۳). بنابراین می توان حداقل بخشی از افزایش میزان پرولین را در گیاهان تحت تنش نیکل به این دلیل دانست. هم جهت با نتایج این پژوهش، تیمار گیاه *Cicer arietinum* با غلظت-های مختلف سرب و روی سبب افزایش مقدار پرولین در بخش‌های هوایی گیاه نسبت به گیاه شاهد شد(۸).

نتیجه‌گیری کلی:

با افزایش غلظت نیکل میزان انباشتگی این عنصر در بخش‌های هوایی و ریشه هر سه جمعیت افزایش یافت. نیکل به دلیل القا استرس اکسیداتیو و افزایش تولید رادیکال‌های آزاد در دو جمعیت سرپنتین و یک جمعیت غیرسرپنتین سمیرم سبب افزایش مقدار پرولین، فعالیت آنزیم‌های کاتالاز و آسکوربات پراکسیداز در بخش‌های هوایی شد. به نظر می‌رسد که جمعیت غیر سرپنتین سمیرم نیز رفتار تقریباً مشابه با جمعیت‌های سرپنتین هرسین و دیزج نشان می‌دهد و قادر به جذب و تجمع مقادیر بالایی از نیکل می‌باشد. بر حسب انتظار، جمعیت سرپنتین در مقایسه با جمعیت غیر سرپنتین مقاومت بیشتری در مقابل افزایش غلظت نیکل محیط نشان داد و به نظر می‌رشد از میان این جمعیت‌ها، جمعیت سرپنتین هرسین می‌تواند گزینه مناسبی برای استفاده جهت پالایش آلودگی نیکل در محیط باشد.

قدردانی

نویسندگان مقاله از دانشگاه اصفهان و قطب آنتی اکسیدان های گیاهی دانشگاه اصفهان تشکر می نمایند.

منابع

۱- سرمد، ج. زمانی، م. فلاح، ف. ۱۳۹۷. بررسی تأثیر کوتاه مدت تنش کادمیوم برشاخص‌های آنزیم فعالیت و رشد های آنتی در اکسیدانی ریز جلبک *Anabaena* sp . مجله پژوهش‌های گیاهی دوره ۳۱، شماره ۳، ۶۲۵-۶۱۱.

۲- فاطمی. ح. و اسماعیل پور، ب. ۱۳۹۸. بررسی برهمکنش تیمارهای زیستی و غیر زیستی بر تغییرات آنتی اکسیدان‌های آنزیمی و غیرآنزیمی در گیاه گشنیز (*Coriandrum sativum*) تحت تنش سرب. مجله پژوهش‌های گیاهی دوره ۳۴، شماره ۳، ۵۹۲-۶۰۴.

۳- قادریان. س. م. و پاکدامن. ن. ۱۳۹۳. اثر غلظت‌های مختلف نیکل در محیط کشت بر رشد گیاه، انباشتگی نیکل و فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدان در برخی گونه‌های *Pistacia*. مجله فرآیند و کارکرد گیاهی دوره ۳، شماره ۸، ۱-۱۲.

4- Adejumo. S. A. Awoyemi. V. Togun. A. 2020. Exogenous proline and hormone in combination with compost improves growth and tolerance of maize under heavy metal stress. Plant Cell Environ 2: 40-53.

5- Baker. A.J. R. Brooks. 1989. Terrestrial higher plants which hyperaccumulate metallic elements. A review of their distribution, ecology and phytochemistry. Biorecovery 1(2):81-126.

6- Bani. A. A. Imeri. G. Echevarria. D. Pavlova. R.D. Reeves. J.L. Morel. et al. 2013. Nickel hyperaccumulation in the serpentine flora of Albania. Fresenius Environmental Bulletin 22(6):1792-801.

7- Bhaduri. A.M. M. Fulekar. 2012. Antioxidant enzyme responses of plants to heavy metal stress. Reviews in Environmental Science and Bio/Technology 11(1):55-69.

8- Bhagyawant, S. S. Narvekar. D. Gupta. N. Bhadkaria. A. et al.2019. Variations in the antioxidant and free radical scavenging under induced heavy metal stress expressed as proline content in chickpea. Physiology and Molecular Biology of Plants. 25(3): 683-696.

9- Bhalerao. S.A. A.S. Sharma. A.C. Poojari. 2015. Toxicity of nickel in plants. International Journal of Pure and Applied Bioscience 3(2):345-55.

10- Carillo. P. Y. Gibon. 2011. Protocol: extraction and determination of proline. PrometheusWiki 2011.

11- Cortés-Eslava. J. Gómez-Arroyo. S. Risueño. M. Testillano. P 2018. The effects of organophosphorus insecticides and heavy metals on DNA damage and programmed cell death in two plant models. Environmental pollution. 240: 77-86

12- Dal Corso. G. L. Borgato. A. Furini. 2005. In vitro plant regeneration of the heavy metal tolerant and hyperaccumulator *Arabidopsis halleri* (Brassicaceae). Plant cell, tissue and organ culture 82(3):267-70.

13- Dietz. K-J. M. Baier. U. Kraemer. 1999. Free radicals and reactive oxygen species as mediators of damage during heavy metal stress. Heavy Metal Stress in Plants: Molecules to Ecosystem. p. 73-97.

14- Feigl. G. Varga. V. Molnar. A. et al. 2020. Different Nitro-Oxidative Response of Odontarrhena lesbiaca Plants from Geographically Separated Habitats to Excess Nickel. Antioxidants. 9(9): 837.

15- Fiala. R. Fialova. I. Vakulic. M. Luxova. M. 2021. Effect of Silicon on the Young Maize Plants Exposed to Nickel Stress. Plant Physiology and Biochemistry.

16- Fornazier. R.F. R.R. Ferreira. G.J. Pereira. S.M. Molina. R.J. Smith. P.J. Lea. et al. 2002. Cadmium stress in sugar cane callus cultures: effect on antioxidant enzymes. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 71(2):125-31.

17- Ghaderian. S.M. A. Mohtadi. M.R. Rahiminejad. A.J.M. Baker. 2007. Nickel and other metal uptake and accumulation by species of *Alyssum* (Brassicaceae) from the ultramafics of Iran. Environmental Pollution 145(1):293-8.

18- Gill. M. 2014. Heavy metal stress in plants: a review. International Journal of Advanced Research 2(6):1043-55.

19- Jaskulak. M. A. Rorat. A. Grobelak. M. Kacprzak. 2018. Antioxidative enzymes and expression of rbcL gene as tools to monitor heavy metal-related stress in plants. Journal of environmental management 218:71-8.

20- Konečná. V. Yant. L. Kolar. F. 2020. The evolutionary genomics of serpentine adaptation. Frontiers in plant science. 11: 2004.

21- Kumar. A. Dubey. A. K. Kumar. V. et al. 2020. Over-expression of chickpea glutaredoxin (CaGrx) provides tolerance to heavy metals by reducing metal accumulation and improved physiological and antioxidant defence system. Ecotoxicology and environmental safety. 192: 110252.

22- Kumar. A. Maleva. M. Borisova. G. Chukina. N. et al. 2021. Nickel and copper accumulation strategies in Odontarrhena obovata growing on copper smelter-influenced and non-influenced serpentine soils: a comparative field study. Environmental geochemistry and health. 43(4): 1401-1413.

23- Malar. S. S.S. Vikram P.J. Favas. V. Perumal. 2016. Lead heavy metal toxicity induced changes on growth and antioxidative enzymes level in water hyacinths [*Eichhornia crassipes* (Mart.)]. Botanical studies 55(1):1-11.

24- Meharg. A. A. 2005. Mechanisms of plant resistance to metal and metalloid ions and potential biotechnological applications. Plant and Soil 274(1):163-74.

25- Murashige. T. and F.A. Skoog.1962. revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. Physiologia plantarum 15(3):473-97.

26- Nakano, Y. and K. Asada. 1981. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. Plant and cell physiology. 22(5): 867-880.

27- Page. V. Le. R-C. Bayon. U. Feller. 2006. Partitioning of zinc, cadmium, manganese and cobalt in wheat (*Triticum aestivum*) and lupin (*Lupinus albus*) and further release into the soil. Environmental and experimental Botany 58(1-3):269-78.

28- Passonneau. J.V. and O.H. Lowry. 1983. Enzymatic analysis: a practical guide: Springer Science & Business Media 1993.

29- Reeves R, Baker A, Borhidi A, Berazain R. 1999. Nickel hyperaccumulation in the serpentine flora of Cuba. Annals of Botany.83:29-38.

30-Robinson. B.H. T.M. Mills. D. Petit. L.E. Fung. S.R. Green. B.E. Clothier. 2000. Natural and induced cadmium-accumulation in poplar and willow: Implications for phytoremediation. Plant and Soil 227(1):301-6.

31. Rosatto, S., et al. 2021. Root and Shoot Response to Nickel in Hyperaccumulator and Non-Hyperaccumulator Species. Plants 10(3): 508.

32- Scebba. F. I. Arduini. L. Ercoli. L. Sebastiani. 2006. Cadmium effects on growth and antioxidant enzymes activities in *Miscanthus sinensis*. Biologia Plantarum 50(4):688-92.

33- Schat. H. R. Vooijs. W. Bookum. 1997. Genetics of adaptive heavy metal tolerance in *Silene vulgaris*: few genes and little intergenic variation. Journal of Experimental Botany 48:101-2.

34- Sharmila. P. Saradhi. 2002. Proline accumulation in heavy metal stressed plants: an adaptive strategy. Physiology and biochemistry of metal toxicity and tolerance in plants: Springer p. 179-99.

35- Shaw. B. 1995. Effects of mercury and cadmium on the activities of antioxidative enzymes in the seedlings of *Phaseolus aureus*. Biologia Plantarum 37(4):587.

36- Siedlecka. A. Z. Krupa. 2002. Functions of enzymes in heavy metal treated plants. Physiology and biochemistry of metal toxicity and tolerance in plants 303-24.

مقاله پژوهشی، صفحات ۱۲۷-۱۱۵

37- Singh. J. M. Singh. A. Jain. S. Bhardwaj. A. Singh. D. Singh. et al. 2013. An introduction of plant nutrients and foliar fertilization: a review. Precision farming: a new approach, New Delhi: Daya Publishing Company :252-320.

38- Sirhindi. G. M.A. Mir. E.F. Abd-Allah. P. Ahmad. S. Gucel. 2016. Jasmonic acid modulates the physio-biochemical attributes, antioxidant enzyme activity, and gene expression in *Glycine max* under nickel toxicity. Frontiers in Plant Science 7:591.

Nickel accumulation and its impact on antioxidant activity of *Alyssum bracteatum* and *A. longistylum* under *in vitro* culture

[1]Acram Gholchin, [2]Ali Akbar Ehsanpour, [3]Marzieh Taghizadeh

[1-] MSc, Department of Plant and Animal Biology, Faculty of Biological Science and Technology, University of Isfahan, Isfahan, Iran.

[2-] Professor, Department of Plant and Animal Biology, Faculty of Biological Science and Technology, University of Isfahan, Isfahan, Iran.

[3-] Assistant Professor. Department of Plant and Animal Biology, Faculty of Biological Science and Technology, University of Isfahan, Isfahan, Iran.

Abstract

This study aimed to investigate the effects of different concentrations of Ni (0, 25, 50, 75, 100, and 250 mg. l^{-1}), on the growth, some enzymatic antioxidant activity of two populations of serpentine and non-serpentine of *Alyssum bracteatum*, and the serpentine population of *A. longistylum* under *in vitro* culture. The uptake and accumulation of Ni in roots and shoots of three populations were determined. The results showed that the accumulation of Ni in all populations increased with the increase of Ni concentration in the MS medium. In all treatments, the amounts of Ni in the shoots were higher than roots, but in MS + 250 mg. l^{-1} Ni, it was the opposite. The results showed that in all populations, by increasing of Ni concentration in the medium, dry weight was decreased, and the activity of catalase (CAT), ascorbate peroxidase (APX), and proline accumulation in shoots increased significantly compared to the control. Overall, based on the obtained results, it seems that serpentine populations were more resistant to Ni concentrations than the non-serpentine population. The non-serpentine of *A. bracteatum* also behaves almost similarly to the serpentine populations of *A. longistylum* under *in vitro* culture and can absorb and accumulate high amounts of nickel, which might be due to the *in vitro* culture that is different from the natural field condition of the plant.

Keywords: Heavy metals, Nickel, Plant tissue culture, Serpentine