DOR: 20.1001.1.23832592.1401.35.3.2.0
مقاله پژوهشی

بررسی بیان ژن RBOH و پاسخ های فیزیولوژیک گیاه هندوانه وحشی (*Citrullus colocynthis*) در شرایط تنش نیکل

آرزوسادات خافی[۱]، علیرضا ایرانبخش[۱*]، اکبر صفی پور افشار[۲**] و رمضانعلی خاوری نژاد[۱]

[۱] ایران، تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات تهران، گروه زیست شناسی

[۲] ایران، تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد نیشابور، گروه زیست شناسی

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۰۹/۲۲ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۱۲/۱۷

چکیده

همولوگ اکسیداز انفجار تنفسی (RBOH) با تولید ملکول های اکسیژن واکنش گر در درک و پاسخ به تنش های محیطی در گیاهان نقش دارد. در تحقیق حاضر میزان بیان ژن RBOH و پارامترهای مورفوفیزیولوژیکی گیاه هندوانه وحشی در غلظت‌های مختلف کلرید نیکل بررسی شد. دانه رست های ۱۵ روزه با غلظت‌های مختلف کلرید نیکل (صفر، ۱۵۰، ۳۰۰ و ۴۵۰ میکرومولار) تیمار شدند. نتایج نشان داد که با افزایش غلظت کلرید نیکل، طول اندام هوایی و ریشه، وزن خشک اندام هوایی و ریشه و میزان آب نسبی کاهش یافت و فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز و کاتالاز، میزان پرولین، مالون دآلدئید و پراکسید هیدروژن در مقایسه با گروه کنترل به طور معنی داری افزایش یافت. هم چنین در گیاهان تیمار شده میزان جذب عناصر از جمله منگنز و روی کاهش یافت. میزان بیان ژن RBOH نیز با افزایش میزان کلرید نیکل، نسبت به گیاهان تیمار نشده افزایش یافت. بنابر نتایج این تحقیق، تنش فلزی نیکل، باعث القای بیان ژن RBOH در گیاه هندوانه وحشی می شود.

واژه های کلیدی: نیکل، هندوانه وحشی، منگنز، روی، بیان ژن

* نویسنده مسئول: (بخش فیزیولوژی)، پست الکترونیکی: iranbakhsh@iau.ac.ir

** نویسنده مسئول: (بخش ملکولی)، پست الکترونیکی: asafshar@iau-neyshabur.ac.ir

مقدمه

محصول پروتئینی ژن همولوگ اکسیداز انفجار تنفسی (RBOH) یک آنزیم غشایی است که در شرایط نرمال غیر فعال است اما در شرایط انفجار تنفسی فعال شده و تجمع آن نیز افزایش می یابد. این آنزیم با انتقال الکترون به ملکول اکسیژن سبب تولید رادیکال سوپراکسید در آپوپلاست می شود که ملکول سیگنال مهمی در پیام رسانی در شرایط تنش است (۹). تنظیم بیان و فعالیت این آنزیم در کنترل سطح ایمن رادیکالهای آزاد در سلول حیاتی است. تنش های محیطی می توانند با افزایش رادیکالهای آزاد به ساختارهای سلولی آسیب وارد کنند. از جمله این تنشهای محیطی می توان به فلزات سنگین اشاره کرد (۵).

از جمله فلزات سنگینی که به عنوان آلاینده های مهم مطرح هستند می توان نیکل، روی و منگنز را نام برد که در غلظت های بهینه برای رشد گیاه ضروری هستند و در غلظت های بیشتر می توانند از رشد و متابولیسم طبیعی گیاه جلوگیری کنند (۳۲). نیکل در انسان سبب بروز مشکلات سلامتی جدی از قبیل حساسیت های آلرژیکی، بیماریهای پوستی و آسیب های سیستم عصبی و ریوی می گردد (۱۴، ۲۲ و ۳۱). نیکل عنصری ضروری برای بسیاری از فعالیت های متابولیکی گیاه است (۸ و ۳۱) اما درغلظت های زیاد باعث مهار جوانه زنی دانه، کاهش رشد، تخریب کلروفیل و تداخل در فعالیت سیستم نوری

DOR: 20.1001.1.23832592.1401.35.3.2.0
مقاله پژوهشی

می¬شود (۳۲). برطبق مطالعات انجام شده، فلز نیکل بر جذب دیگر عناصر تاثیر گذار است؛ به عنوان مثال کاهش جذب آهن و روی در گیاه سورگوم و آفتاب گردان تحت تاثیر فلز نیکل مشاهده شده است (۳۳).

گزارش هایی مبنی بر افزایش مقدار یا فعالیت آنزیم همولوگ اکسیداز انفجار تنفسی در تنش فلزات سنگین وجود دارد (۱۶). بعلاوه این آنزیم می تواند بطور غیر مستقیم پمپ پروتونی را در غشا سلول فعال کند که سلول با برقراری شیب پروتون از آن برای خروج یون های فلزی استفاده کند (۱۵). بنابر مطالعه قبلی ما مشخص شد که بیان ژن RBOH در هندوانه وحشی در پاسخ به تنش خشکی افزایش می‌یابد (۱). تشخیص این که آیا این ژن در پاسخ به شرایط تنش نیکل هم موثر است، می تواند در شناخت مکانیسم عمل آن مفید باشد. بدین منظور در این تحقیق اثر کلرید نیکل بر بیان ژن RBOH، رشد، خصوصیات فیزیولوژیک و اثرات متقابل آن بر میزان جذب فلزات دیگر مانند Zn و Mn در گیاه هندوانه وحشی بررسی شد.

مواد و روشها

بذرها از شرکت پاکان بذر اصفهان تهیه و پس از ضدعفونی در داخل گلدان¬های حاوی ماسه کشت شدند. آزمایش به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملا تصادفی در شرایط گلخانه ای انجام شد. دانه رست ها به مدت ۱۵ روز در اتاق کشت با دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی (دما ۲۷ درجه سانتی‌گراد) و ۸ ساعت تاریکی (دما ۲۲ درجه سانتی‌گراد) قرار گرفتند. گیاهان در این بازه زمانی کشت، تنها با محلول هوگلند بدون اعمال نیکل و بعد از گذشت ۱۵ روز، با غلظت¬های مختلف کلرید نیکل تیمار شدند. تیمارگیاهان بصورت یک روز در میان با آب مقطر و محلول هوگلند حاوی غلظت های مختلف کلرید نیکل (صفر، ۱۵۰، ۳۰۰ و ۴۵۰ میکرومولار) به مدت سه هفته انجام شد. در پایان گیاهان جمع آوری و جهت سنجش های ملکولی به فریزر منفی ۸۰ درجه سانتی گراد منتقل شدند.

محاسبه پارامتر های رشدی و فیزیولوژی در اندام هوایی و ریشه: جهت بررسی پارامترهای رشد و فیزیولوژی، گیاهان پس از ۳۵ روز از گلدان خارج شدند. به منظور به دست آوردن وزن خشک، بخش های مختلف گیاهی از جمله اندام هوایی و ریشه پس از نگهداری در آون۸۰ درجه به مدت ۲۴ ساعت به سرعت توزین و طول ساقه و ریشه برحسب میلی متر اندازه گیری شد. سنجش RWC و همچنین سنجش پرولین، SOD، MDA، کاتالاز و H2O2 نیز انجام شد.

سنجش میزان جذب فلزات در اندام هوایی و ریشه: جهت آنالیز سنجش میزان نیکل در نمونه های گیاهی، ریشه و اندام هوایی گیاهان بعد از جدا کردن با آب مقطر شسته و به مدت ۴۸ ساعت در آون ۸۰ درجه سانتیگراد قرار داده شدند. نمونه های گیاهی آسیاب شده به کمک اسید نیتریک و آب اکسیژنه عصاره گیری و غلظت نیکل، روی و منگنز در آن ها توسط دستگاه جذب اتمی (VARIAN AA240, Agilent Technologies, Australia)اندازه گیری گردید.

سنجش میزان بیان ژن RBOH : در ابتدا استخراج RNA کل با استفاده از کیت RNXTM-Plus (سیناکلون، ایران) صورت گرفت. برای این منظور طبق دستورالعمل شرکت سازنده ۱۰۰ میلی گرم از بافت تازه برگ استفاده شد و در نهایت کمیت و کیفیت RNA استخراج شده توسط دستگاه نانودراپ (WPA-biowave II, UK) بررسی شد. از RNA استخراج شده برای ساخت cDNA با استفاده از کیت Thermo Scientific (USA) استفاده شد. ابتدا ۱ تا ۲ میکروگرم RNA کل استخراجی که با DNase تیمار شده و در نهایت حجم آن با آب بدون RNAse به ۱۰ میکرولیتر رسیده بود با ۱ میکرولیتر (۱۸) Oligo dT مخلوط و به‌مدت ۵ دقیقه در دمای ۷۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. سپس

DOR: 20.1001.1.23832592.1401.35.3.2.0

۱ میکرولیتر RNase inhibitor (10 U/µl)، ۴ میکرولیتر X ۵ RT buffer، ۲ میکرولیتر dNTP (10 mM)، ۲ میکرولیتر DTT (0.1M) و ۰/۵ میکرولیتر Avian Virus Reverse Transcriptase enzyme (AMV RT) (10u/ µl) به‌ترتیب روی یخ به ویال‌ها افزوده و برای چند ثانیه اسپین شدند. مخلوط فوق به‌مدت ۶۰ دقیقه در ۴۲ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت (برای فعالیت آنزیم RT). واکنش با قرار دادن تیوب‌ها به‌مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد متوقف و نمونه روی یخ سرد شد.

مقایسات کمی بیان ژن RBOH با روش Real time PCR- SYBER Green و با استفاده از دستگاه ABI Step-One (USA) (Applied Biosystems انجام شد. پرایمرهای مورد استفاده بر اساس نواحی حفاظت شده توالی ژن RBOH هندوانه وحشی (EU580727.۲) با استفاده از نرم افزار Oligo 7.5 طراحی شدند. توالی پرایمرهای استفاده شده برای ژن RBOHدر جدول زیر مشخص شده است.

جدول ۱- توالی و خصوصیات آغازگرهای مورد استفاده

نام اغازگر	توالی '3-'5	طول الیگونوکلئوتید (bp)	طول قطعه سنتز شده (bp)
Rboh (Forward)	GAGCGTGTACGAGGAAGG	18	90
Rboh (Reverse)	CGAGTCCCTGATACCACAT	19	
ACT (Forward)	CAACATACATAGCAGGCACA	20	90
ACT (Reverse)	TGACTGAGGCTCCACTCAAC	20	

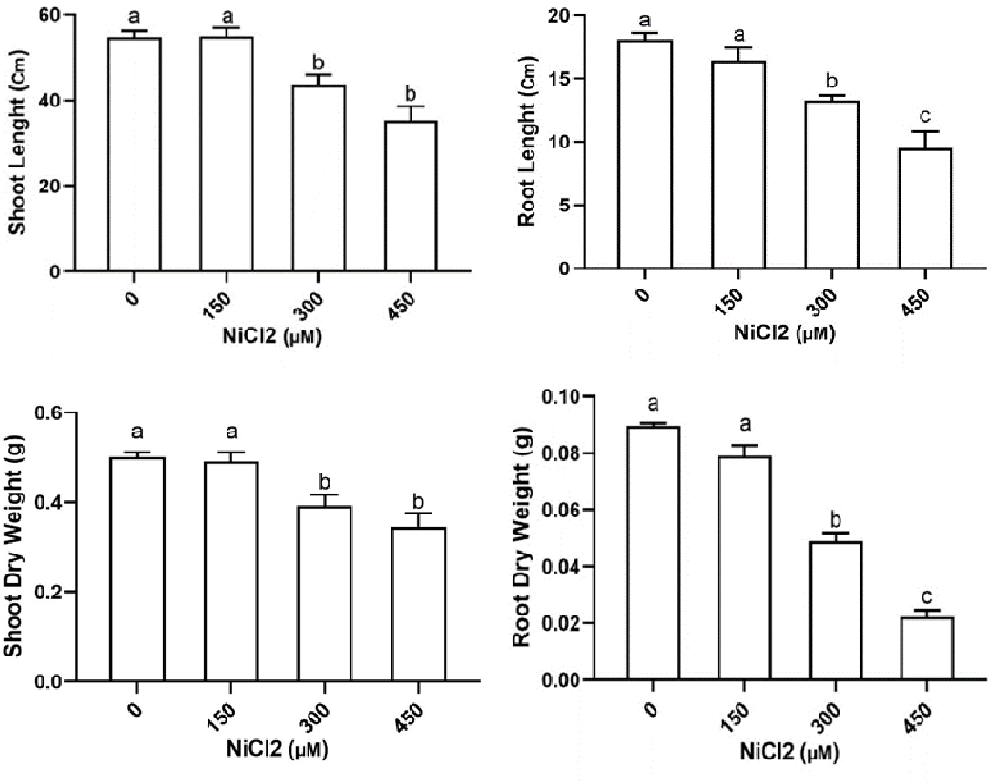
حجم مخلوط واکنش برای هر نمونه، ۲۰ میکرولیتر شامل ۱۰ میکرولیتر مخلوط Green SYBER،۳ میکرولیتر از cDNA ساخته شده، ۰/۴ میکرولیتر از هریک از آغازگرهای اختصاصی پیشرو و پیرو با غلظت ۱۰ میکرومول، ۶/۲ میکرولیتر آب مقطر استریل فاقدRNase بود که پس از آماده و لود شدن در چاهک های پلیت مخصوص به دستگاه ABI منتقل گردید. واکنش زنجیره ای پلی مراز با شرایط ۱۰ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتی گراد و ۴۰ تکرار با چرخه های ۱۵ ثانیه در دمای ۹۵ درجه سانتیگراد، ۱۵ ثانیه در دمای ۶۰ درجه سانتیگراد جهت اتصال پرایمرها به الگو و ۳۰ ثانیه در دمای ۷۲ درجه سانتیگراد جهت سنتز محصول PCR انجام شد. کمیت سنجی بیان نیز به روش ΔΔCT انجام شد.

آنالیز آماری: برای تجزیه واریانس داده های به دست آمده از نرم افزار SAS نسخه ۹/۲ استفاده شد. جهت مقایسه میانگین ها از آزمون LSD استفاده شد و سطح معنی داری p≤۰/۰۵ لحاظ گردید. رسم نمودارها توسط نرم افزار Excel انجام شد. جهت آنالیز داده های حاصل از qRT-PCR از نرم افزار دستگاه استفاده شد.

نتایج

همچنانکه که در شکل ۱ مشاهده می¬شود با افزایش غلظت نیکل اغلب پارامترهای رشدی کاهش پیدا کردند. میانگین طول ساقه و ریشه گیاه در تیمارهای ۱۵۰، ۳۰۰ و ۴۵۰ میکرومولار نیکل نسبت به شاهد کاهش چشمگیری را نشان دادند. همچنین در تیمارهای مختلف کلرید نیکل تغییرات وزنی مشاهده شده در اندام هوایی معنی‌دار بود و وزن خشک اندام هوایی و ریشه نسبت به شاهد کاهش نشان داد. بیشترین مقدار وزن خشک مربوط به گروه شاهد می‌باشد.

DOR: 20.1001.1.23832592.1401.35.3.2.0



شکل ۱ – اثرات غلظت‌های مختلف کلرید نیکل بر میانگین طول ساقه و ریشه و میانگین وزن خشک اندام هوایی و ریشه در هندوانه وحشی (*C. colocynthis*). میانگین ها حاصل ۳ تکرار و حروف غیر مشترک نشانه اختلاف معنی دار در سطح پنج درصد بر اساس آزمون LSD است. بارها نشاندهنده خطای استاندارد می‌باشند.

همانطور که در شکل ۲ مشاهده می شود با افزایش غلظت نیکل، میزان RWC کاهش می یابد. میانگین غلظت RWC گیاه در تیمارهای ۱۵۰، ۳۰۰ و ۴۵۰ میکرومولار نسبت به شاهد کاهش چشمگیری را نشان دادند.

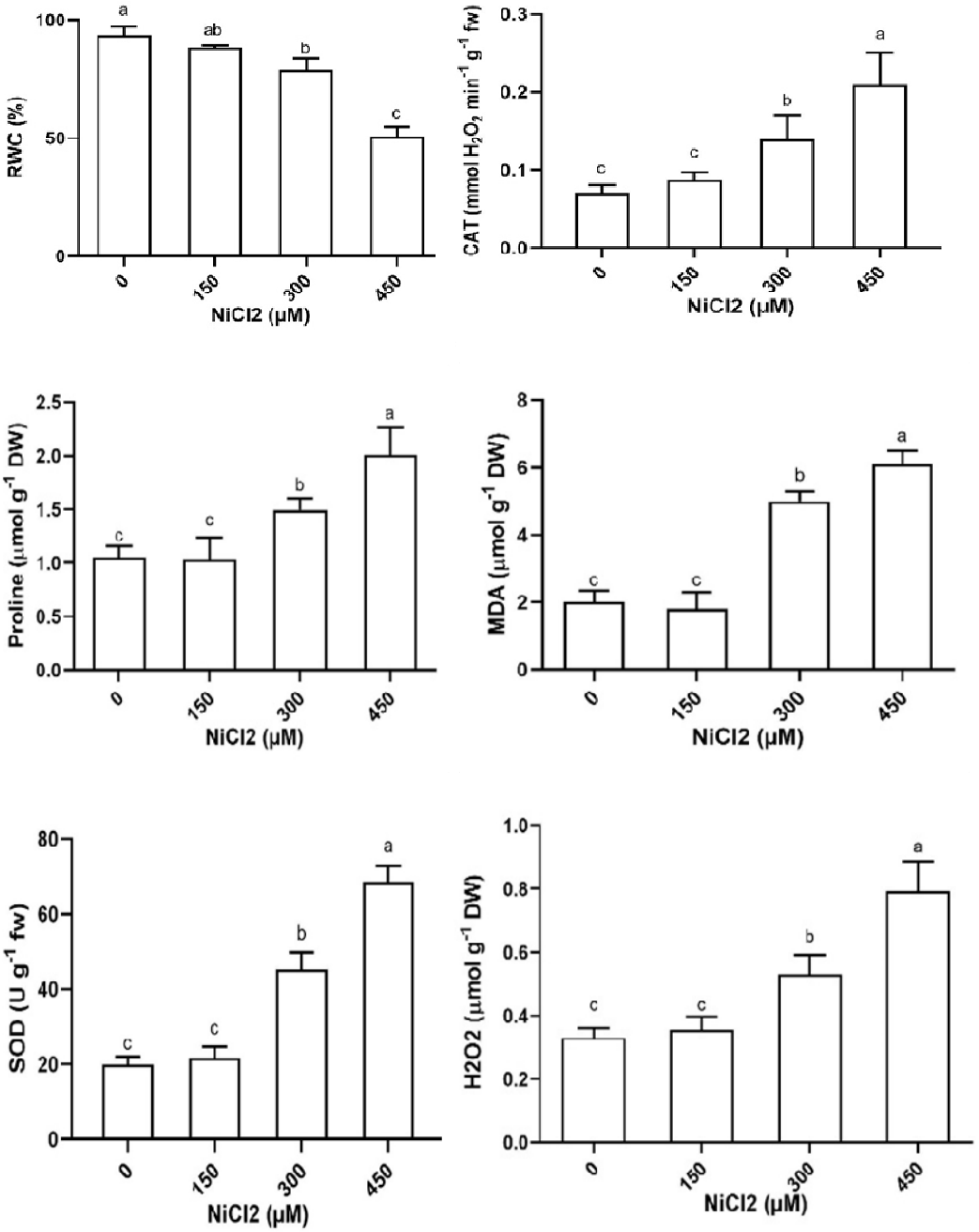
همچنین در تیمارهای مختلف کلرید نیکل تغییرات میزان ترکیبات پرولین، MDA، H2O2 و فعالیت آنزیم‌های SOD و کاتالاز مشاهده شده معنی‌دار بود و نسبت به شاهد افزایش نشان داد. کمترین مقدار ترکیبات مربوط به گروه شاهد می‌باشد.

اثر غلظت‌های مختلف کلرید نیکل بر میزان جذب عناصر مختلف: در جدول ۲ مقدار جذب نیکل کل بخش هوایی و ریشه گیاه با افزایش غلظت کلرید نیکل، افزایش معنی داری نشان داد. طبق آزمون LSD بیشترین مقدار نیکل در گروه تیماری با غلظت کلرید نیکل ۴۵۰ میکرومولار و کمترین مقدار روی در گروه تیماری شاهد مشاهده شد. همچنین مقدار جذب روی و منگنز کل بخش هوایی و ریشه گیاه با افزایش غلظت کلرید نیکل، کاهش معنی داری نشان داد. بعلاوه، بیشترین مقدار روی و منگنز در گروه تیماری شاهد و کمترین مقدار روی و منگنز در گروه تیماری با غلظت ۴۵۰ میکرومولار کلرید نیکل مشاهده شد.

اثرات غلظت‌های مختلف کلرید نیکل بر میزان بیان ژن RBOH : همچنان که در شکل ۳ مشاهده می شود با افزایش غلظت کلرید نیکل، میزان بیان ژن RBOH نسبت

DOR: 20.1001.1.23832592.1401.35.3.2.0

به گروه شاهد افزایش می یابد. این میزان افزایش در تیمارهای ۱۵۰، ۳۰۰ و ۴۵۰ میکرومولار کلرید نیکل به ترتیب ۱/۶، ۴/۴ و ۷/۴ نسبت به شاهد بوده است.

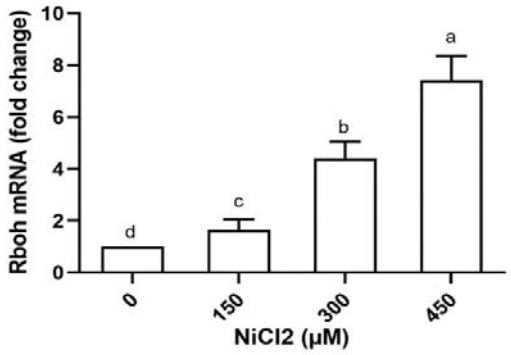


شکل ۲ – اثرات غلظت‌های مختلف کلریدنیکل بر میانگینRWC ، پرولین، SOD، MDA، کاتالاز و H2O2 در هندوانه وحشی .(*C. colocynthis*) میانگین ها حاصل ۳ تکرار و حروف غیر مشترک نشانه اختلاف معنی دار در سطح پنج درصد بر اساس آزمون LSD است. بارها نشاندهنده خطای استاندارد می‌باشند.

DOR: 20.1001.1.23832592.1401.35.3.2.0
مقاله پژوهشی

جدول ۲- میزان تجمع عناصر نیکل، روی و منگنز در ریشه و بخش هوایی هندوانه وحشی در غلظت های مختلف کلرید نیکل. میانگین ها حاصل ۳ تکرار و حروف غیر مشترک نشانه اختلاف معنی دار در سطح پنج درصد بر اساس آزمون LSD است.

تیمارها	نیکل ریشه	نیکل بخش	روی ریشه	روی بخش	منگنز ریشه (میلی	منگنز بخش هوایی (میلی
کلرید نیکل (میکرومولار)	(میلی گرم در گرم وزن خشک)	هوایی (میلی گرم در گرم وزن خشک)	(میلی گرم در گرم وزن خشک)	هوایی (میلی گرم در گرم وزن خشک)	گرم در گرم وزن خشک)	گرم در گرم وزن خشک)
۰	۰/۱۲d	۰/۰۱d	۰/۴۷a	۰/۲۰a	۰/۷۲a	۰/۱۷a
۱۵۰	۰/۳۱c	۰/۰۸c	۰/۳۰b	۰/۱۶b	۰/۵۹b	۰/۱۲b
۳۰۰	۰/۵۸b	۰/۱۴b	۰/۲۸b	۰/۱۵b	۰/۴۸c	۰/۰۸c
۴۵۰	۰/۷۸a	۰/۲۴a	۰/۱۷c	۰/۱۲c	۰/۳۵d	۰/۰۳d



شکل ۳- اثرات غلظت‌های مختلف کلرید نیکل بر میزان بیان ژن **RBOH** گیاه هندوانه وحشی (***C. colocynthis***). میانگین ها حاصل ۳ تکرار و حروف غیر مشترک نشانه اختلاف معنی دار در سطح پنج درصد بر اساس آزمون **LSD** است. بارها نشاندهنده خطای استاندارد می‌باشند.

بحث و نتیجه گیری

نیکل یکی از عناصر غذایی کم مصرف و ضروری برای گیاهان قلمداد می شود، اما افزایش میزان آن سبب تغییر برخی فرآیندهای فیزیولوژیکی و درنتیجه بروز علائم سمیت، مانند کاهش رشد، کلروزیس و نکروزیس در گیاهان می¬شود (۸). حضور فلزات سنگین از جمله نیکل موجب تنش اکسیداتیو و افزایش تولید گونه های اکسیژن فعال می گردد. گونه های فعال اکسیژن موجب اثرات سمی در گیاهان مانندکاهش رشد، کاهش میزان رنگیزه های فتوسنتزی و درنتیجه فتوسنتز، مهار فعالیتهای آنزیمی، اثرات مخرب در مولکولهای زیستی نظیر لیپیدها، پروتئینها و اسیدهای نوکلئیک به خصوص DNA و پراکسیداسیون غشایی که از دست دادن یونها را به همراه دارد می شود (۱۹،۱۳).

نتایج کلی به دست آمده نشان می دهد که غلظت های بالای نیکل اثرات سوء بر رشد هندوانه وحشی داشته و از رشد ممانعت می نماید. این یافته با نتایج بسیاری از تحقیقات انجام گرفته در رابطه با اثر نیکل بر سایر گونه های گیاهی هم خوانی دارد که می توان به مطالعات انجام شده بر گیاهان گوجه فرنگی، گندم و برنج (۷) اشاره داشت. نیکل باعث کاهش وزن تر ریشه، ساقه و برگ ها و وزن خشک ریشه و بخش هوایی و به طور کلی سبب کاهش زیست توده گیاهی می شود (۱۰، ۱۸، ۲۴ و ۲۸). از دیگر اثرات فلزات سنگین، آسیب غشایی و مهار رشد ریشه است که منجر به اختلال در تعادل هورمونی، کمبود مواد غذایی، مهار فتوسنتز و تغییراتی در ارتباطات آبی شده که این اثرات ثانویه موجب کاهش رشد در گیاه میشود (۱۷). در نتیجه ی کاهش رشد ریشه، میزان جذب آب و یون های معدنی کاهش می یابد که نتیجه ی آن کاهش رشد عمومی گیاهان است. آسیب های ریشه ای ناشی از فلزات سنگین و کاهش میزان رنگیزه های فوتوسنتزی

DOR: 20.1001.1.23832592.1401.35.3.2.0
مقاله پژوهشی

علت اصلی کاهش رشد اندام هوایی است (۴و۱۰). بعلاوه، تولید اشکال مختلف اکسیژن فعال تحت القای فلزات سنگین، به لیپیدهای غشا، پروتئین ها، رنگیزه ها و اسیدهای نوکلئیک گیاهان آسیب وارد کرده و منجر به کاهش چشمگیری در رشد گیاه می شود که در صورت شدید بودن میزان تنش، می¬تواند باعث مرگ گیاه شود (۲۷ و ۳۳). به طور کلی ایجاد تغییر در مورفولوژی ریشه در اثر افزایش غلظت نیکل، باعث کاهش جذب مواد غذایی شده و کاهش رشد و نمو را به دنبال دارد (۱۰).

بر اساس نتایج تحقیق حال افزایش غلظت نیکل به طور کلی موجب افزایش فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز و کاتالاز، میزان پرولین، مالون دآلدئید و پراکسید هیدروژن شده است؛ که به نظر می رسد در پی تیمار دانه رست های هندوانه وحشی با کلرید نیکل تنش اکسیداتیو رخ داده است که افزایش اکسیداسیون اسید های چرب و تولید مالون دآلدئید و بعلاوه افزایش پراکسید هیدروژن از نشانه های آن است. سپس در پاسخ به این تنش اکسیداتیو، فعالیت آنزیم های اکسیداتیو افزایش یافته است و افزایش میزان پرولین نیز در همین راستا است.

نتایج نشان دهنده کاهش غلظت روی و منگنز در اندام هوایی گیاه هندوانه وحشی تحت تیمار کلرید نیکل بود. بطور کلی کاهش چشمگیر جذب روی و منگنز در ریشه و انتقال ان به اندام هوایی ناشی از اثر سمی فلز نیکل در گیاه و برهم زدن تعادل مواد غذایی و کاهش رشد و تداخل در انتقال دیگر عناصر است (۳۳).

نتایج نشان داد که با افزایش غلظت نیکل افزایش معنی داری در میزان بیان ژن RBOH در مقایسه با شاهد دیده می شود که با پاسخ گیاه هندوانه وحشی به تنش خشکی در مطالعه قبلی مطابقت دارد (۱).

بعلاوه در مطالعه دیگری بر روی گیاه خیار هم مشخص شد که در تیمار کادمیوم میزان محصول پروتئینی این ژن افزایش می یابد (۱۶). همچنین گیاهان آرابیدوپسیس تیمار شده با فلز سنگین کادمیوم میزان بیان بالایی از ژن RBOH را نشان دادند (۲۹). براساس نتایج این تحقیق به نظر می رسد قرار گرفتن دانه رست های هندوانه وحشی در معرض غلظت های زیاد کلرید نیکل باعث افزایش بیان ژن RBOH می شود تا گیاه قادر باشد مقادیر مناسبی از آنزیم اکسیداز انفجار تنفسی تولید کند و متعاقبا با تولید کنترل شده¬ی اکسیژن های واکنشگر مسیرهای پیام رسانی سلولی را برای پاسخ های دفاعی فعال سازد.

به طور کلی، داده های حاصل از این تحقیق، اثرات نامطلوب کلرید نیکل بر پارامترهای رشد و افزایش فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدانی در گیاه هندوانه وحشی را نشان می دهد؛ که مکانیسم های مختلف بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی مانند آنزیم های آنتی اکسیدان می توانند برای کاهش آسیب ناشی از تنش فلز سنگین نیکل وارد عمل شوند. بیان زیاد ژن RBOH که در این تحقیق گزارش شد و به دنبال آن افزایش فعالیت آنزیم مربوطه می تواند یک راهکار برای سازگاری هندوانه وحشی در شرایط غلظت بالای فلز نیکل باشد.

منابع

۱. صلاحی، ن.، سلیمانی، ز.، صفی پور افشار، الف.، سعید نعمت پور، ف.، ۱۳۹۵. مقایسه بیان ژن Rboh در هندوانه زراعی (*Citrullus lanatus*) و هندوانه وحشی *Citrullus colocynthis*) تحت تاثیر تنش خشکی. مجله پژوهش های گیاهی. ۲۹(۴):۳۹۹-۴۰۸

2. Ahmad, M.S.A., Hussain, M., Ashraf, M., Ahmad, R. and Ashraf, M.Y. (2009) Effect of nickel on seed germinability of some elite sunflower (*Helianthus annuus* L.). Pakistan Botany. 41:1871–1882.

3. Ali, M.A., Ashraf, M. and Athar, H.R. (2009) Influence of nickel stress on growth and some important physiological/biochemical attributes in some diverse canola (*Brassica napus* L.) cultivars. Hazardous Materials. 172: 964–969.

4. Arduini I, Godbold DL, Onnis A. (1994) Cadmium and copper change root growth and morphology of *Pinus pinea* and *Pinus pinaster* seedlings. Physiologia Plantarum. 92(1): 675-680.
5. Babajani A, Iranbakhsh A, Ardebili ZO, Eslami B. (2019) Differential growth, nutrition, physiology, and gene expression in *Melissa offcinalis* mediated by zinc oxide and elemental selenium nanoparticles. Environ Sci Poll Res 22:1–5
6. Baycu. G, Doganay. T, Hokan. O, and Sureyya. G, (2006) Ecophysiological and seasonal variations in Zn, Pb, Cd and Ni, concentration in the leaves of urban deciduous trees in Istanbul. Environ.143: 545-554
7. Carrier, P., Baryla, A., Havaux, M. (2003) Cadmium distribution and microlocalization in oilseed rape (*Brassica napus*) after long growth on cadmium-contaminated soil. Planta. 216:239-250.
8. 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: 304–313.
9. Chu-Puga A, González-Gordo S, Rodríguez-Ruiz M, Palma J, Corpas F (2019) NADPH oxidase (Rboh) activity is up regulated during sweet pepper (*Capsicum annuum* L.) fruit ripening. Antioxidants 8:9
10. Fuentes D, Disante KB, Valdecantos A, Cortina J, Vallejo VR. (2006) Response of *Pinus halepensis* Mill. Seedling to biosolids enriched with Cu, Ni, Zn in three Mediterranean forest soils. Environmental Pollution XX: 1-8.
11. Ghasemi, R., Ghaderian, M. and Kramer, U. (2009) Interference of nickel with copper and iron homeostasis contributes to metal toxicity symptoms in the nickel hyper accumulator plant *Alyssum inflatum*. New Physiologist. 184: 566-580.
12. Ghosh M, Singh SP. (2005) A review on Phytoremediation of heavy metals and utilization of its by-products. Applied Ecology and Environmental Research. 3(1):1-18.
13. Gill. M, (2014) Heavy metal stress in plants: a review. International Journal of Advanced Research. 6(2):1043- 1055.
14. Haber, L. T., Diamond, G. L., Zhao, Q., Erdreich, L. and Dourson, M.L. (2000) Hazard identification and dose response of ingested nickel-soluble salts. Regulatory Toxicology and Pharmacology. 31: 231–241
15. Jakubowska D, Janicka M. (2017) The role of brassinosteroids in the regulation of the plasma membrane H+-ATPase and NADPH oxidase under cadmium stress. Plant Science. 264:37–47.
16. Jakubowska D, Janicka-Russak M, Kabała K, Migocka M, Reda M. (2015) Modification of plasma membrane NADPH oxidase activity in cucumber seedling roots in response to cadmium stress. Plant Science 234:50–59
17. Kennedy CD., Gonsalves, EAN. (1987) The action of divalent zinc, cadmium, mercury, copper and lead on transport potential and H+ efflux of excised roots. J Exp Bot. 38, 800-817.
18. Khatib M, Rashed mohasel MH, Ganjali A, Lahooti M. (2008) The Effect of different concentration of Ni on morphological properties of *Petroselenium crispum*, Iranian Journal of Crop Research. 6(2): 295-302.
19. Khellaf. N and Zerdaoui. (2009) Growth Response of the Duckweed *Lemna minor* to Heavy Metal Pollution. Iranian Journal of Environmental Health Science and Engineering. 6 (3): 161-166.
20. Lv W, Yang L, Xu C, Shi Z, Shao J, Xian M, Chen J (2017) Cadmium disrupts the balance between hydrogen peroxide and superoxide radical by regulating endogenous hydrogen sulfide in the root tip of *Brassica rapa*. Front Plant Sci 8:232
21. Mirbagheri S., Shams. A., Hashemi H., Shams H. (2010) Removal of divalent nickel from plating industry wastewater with reverse osmosis. Journal of Environmental Sciences and Technology, 12 (1):1-11.
22. Molas J., Baran S. (2004) Relationship between the chemical form of nickel applied to the soil and its uptake and toxicity to barley plants (*Hordeum vulgare* L.). Geoderma, 122: 247-255
23. Okieimen F.E. (2011) Heavy metals in contaminated soils: a review of sources, chemistry, risks and best available strategies for remediation. ISRN Ecology, Article ID 402647, 20 p.
24. Panda S., Khan M. (2003) Antioxidant efficiency in rice (*Oryza sativa* L.) leaves under heavy metal toxicity. Journal of Plant Biology New Delhi, 30 (1): 23-30
25. Parida BK, Chhibba IM, Nayyar VK. (2003) Influence of nickel-contaminated soils of fenugreek (*Trigonella corniculata* L.) growth and mineral composition. Science Horticulture 98(5): 113-119.

DOR: 20.1001.1.23832592.1401.35.3.2.0

26. Safari M, Ardebili ZO, Iranbakhsh A (2018) Selenium nano-particle induced alterations in expression patterns of heat shock factor A4A (HSFA4A), and high molecular weight glutenin subunit 1Bx (Glu-1Bx) and enhanced nitrate reductase activity in wheat (*Triticum aestivum* L.). Acta Physiol Plant. 40:117
27. Seregin, I. V. and Kozhevnikova, A. D. (2006) Physiological role of nickel and its toxic effects on higher plants. Russian Plant Physiology. 53: 257–277.
28. Sharma, R. K. and Madhulika, A. (2005) Biological effects of heavy metals: An overview. Environmental Biology. 26: 301- 313.
29. Smeets K, Opdenakker K, Remans T, Van Sanden S, Van Belleghem F, Semane B, Horemans N, Guisez Y, Vangronsveld J, Cuypers A (2009) Oxidative stress-related responses at transcriptional and enzymatic levels after exposure to Cd or Cu in a multipollution context. J Plant Physiol. 166:1982–1992.
30. Tewari, R. K., Kumar, P. and Sharma, P. N. 2006. Antioxidant responses to enhanced generation of superoxide anion radical and hydrogen peroxide in the copper-stressed mulberry plants. Planta. 223: 1145–1153.
31. Turgut C., Katie Pepe M., Cutright T.J. (2004) The effect of EDTA and citric acid on phytoremediation of Cd, Cr, and Ni from soil using *Helianthus annuus*. Environmental Pollution, 131 (1): 147-154
32. Xu, J., Yang, L., Wang, Z., Dong, G., Huang, J., Wang. Y. (2006) Toxicity of copper on rice growth and accumulation of copper in rice grain in copper contaminated soil. Hemosphere. 62: 602–607.
33. Yaghub H, Sajad R, Mohamad RC, Arash M. (2016) Phytoremediation ability of nickel-contaminated soil using Sunflower (Helianthus annuus L.) and Sorghum (*Sorghum bicolor* L.). Journal of Soil Managementsmeet and Sustainable Production, 6(4), 2017.

Evaluation of RBOH gene expression and physiological responses of *Citrullus colocynthis* under nickel stress conditions

Khafi A.S.[1], Iranbakhsh A.R.[1*], Safipour Afshar A.[*2] and Khavari Nejad R.A.[1]

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

[2] Dept. of Biology, Neyshabur Branch, Islamic Azad University, Neyshabur, I.R. of Iran.

Abstract

Respiratory Burst Oxidase Homologue (RBOH) is involved in the perception and response to environmental stresses in plants by producing reactive oxygen molecules. In the present study, the expression of RBOH gene and morphophysiological parameters of Citrullus colocynthis in different concentrations of nickel chloride were investigated. 15-day-old seedlings were treated with different concentrations of nickel chloride (0, 150, 300 and 450 µM). The results showed that with increasing nickel chloride concentration, shoot and root length, shoot and root dry weight and relative water content decreased and the activity of superoxide dismutase and catalase, and content of proline, malondialdehyde and hydrogen peroxide increased significantly compared to the control group. Also, in treated plants, the uptake of elements such as manganese and zinc decreased. The expression level of RBOH gene also increased with increasing the amount of nickel chloride compared to untreated plants. According to the results of this study, nickel metal stress induces the expression of RBOH gene in C. colocynthis.

Key words: Nickel, Citrullus colocynthis, Manganese, Zinc, Gene expression