بررسی تأثیر سمیت نیکل بر میزان کلروفیل، واکنش هیل و رشد دانه‌رست‌های ذرت

فاطمه قاسمی*، رضا حیدری، رشید جامعی و لطیفه پوراکبر

دریافت: ۱۳۹۱/۶/۲۵/ پذیرش: ۱۳۹۲/۸/۴

گروه زیست‌شناسی، دانشکدهٔ علوم، دانشگاه ارومیه، ارومیه

*مسئول مکاتبات: ayda1355@yahoo.com

چکیده. برای بررسی سمیت ناشی از نیکل، دانه‌رست‌های ذرت بعد از جوانه‌زنی در محیط‌های کشت هیدروپونیک حاوی صفر، ۵۰ ، ۱۰۰ و ۲۰۰ میکرومولار کلرور نیکل به مدت دو هفته کشت شدند. سپس تأثیر آن بر رشد، سرعت واکنش هیل و محتوای رنگیزه‌های فتوسنتزی بررسی شد. وزن تر و خشک برگ‌ها و ریشه‌ها در غلظت ۵۰ میکرومولار کلرور نیکل افزایش یافت، اما در غلظت‌های ۱۰۰ و ۲۰۰ میکرومولار کاهش نشان داد. با افزایش نیکل، از طول ریشه و اندام هوایی کاسته شد. با توجه به نتایج حاصل، بافت‌های اندام هوایی و ریشه‌ای دربرابر غلظت‌های مختلف نیکل پاسخ رشدی متمایزی از خود نشان می‌دهند. نیکل تا ۱۰۰ میکرومولار باعث افزایش میزان کلروفیل a شد، اما در غلظت ۲۰۰ میکرومولار از میزان آن کاست. تغییر درخور ملاحظه‌ای در میزان کلروفیل b و کاروتنوئیدها مشاهده نشد. با افزایش نیکل از سرعت واکنش هیل به منزلهٔ شاخص توانایی کلروفیل a در مرکز واکنشی PSII برای شکافت آب، کاسته شد.

واژه های کلیدی. میزان کلروفیل، واکنش هیل، کاروتنوئید

Determining the nickel toxicity on chlorophyll content, Hill reaction and growth in maize seedlings

Fatemeh Ghasemi*, Reza Heidari, Rashid Jamei and Latifeh Poorakbar

Received 16.09.2012/ Accepted 26.10.2013

Department of Biology, Faculty of Science, Urmia University, Urmia, Iran

*Correspondent author: ayda1355@yahoo.com

Abstract. To assess nickel-induced toxicity in plants, *Zea mays* seeds were germinated and cultured on nutrient solution with nickel concentrations of 0, 50, 100 and 200 µM for a period of two weeks. Its effects on the growth, Hill reaction and photosynthetic pigments content were then investigated. The fresh and dry weight of leaves and roots increased in 50 µM nickel, but decreased in 100 and 200 µM. The decline in length of root and shoot were observed by increasing nickel concentration. According to the results, root and shoot showed differential growth response to various nickel concentrations. Nickel concentrations up to 100 µM caused increase in the content of chlorophyll *a*, but resulted in decrease at 200 µM nickel. No significant changes in chlorophyll b and carotenoids contents were observed. The rate of Hill reaction, as the ability of chlorophyll *a* in the reaction center of $PSII_{680}$ to split water, decreased by increase in nickel concentration.

Keywords. chlorophyll content, Hill reaction, carotenoid

مقدمه

نیکل یکی از عناصر ساختمانی در تعدادی از آنزیم‌ها از جمله اوره‌آز، گلی‌اکسالاز، پپتیددفرمیلاز و تعدادی از سوپراکسید دیس‌موتازها و هیدروژنازها است (Chen *et al*., 2009). با افزایش فعالیت‌های انسانی مانند حفاری معادن، سوزاندن سوخت‌های فسیلی، افزایش فاضلاب‌ها و مصرف آن‌ها در کشاورزی، غلظت فلزات سنگین ازجمله نیکل در خاک‌ها چندین برابر افزایش یافته است (Kabata-Pendias, 2001). گیاهان می‌توانند نیکل را در بافت‌های رویشی و دانه‌های خود انباشته کنند و به منزلهٔ منبع نیکل برای مصرف‌کنندگان در زنجیره‌های غذایی عمل کنند (Rahman *et al*., 2001). نیکل در غلات باعث ایجاد کلروزیس و نکروزیس به شکل نوارهای سفیدی در برگ‌ها می‌شود (Seregin, 2008; Molas, 2002). نیکل اضافی ممکن است باعث اختلال در زنجیر انتقال الکترون فتوسنتزی شود و از تثبیت CO_2 و تبادل روزنه‌ای جلوگیری کند (Chen *et al*., 2009). درگیاهانی که تحت تنش نیکل هستند، جذب عناصر معدنی، نمو ریشه، متابولیسم سلولی، فتوسنتز و تنفس به‌شدت مختل می‌شود (Liamas *et al*., 2008). هدف از این بررسی مطالعهٔ تأثیر نیکل بر رشد، میزان رنگیزه‌های فتوسنتزی و واکنش هیل در دانه رست‌های ذرت بوده است.

مواد و روش‌ها

کشت گیاهان

دانه‌های ذرت (*Zea mays*) بعد از ضدعفونی در هیپوکلریت سدیم ۱۰درصد به مدت ۱۵ دقیقه و پس از آبکشی با آب مقطر، به ظروف پتری ۲۰ سانتی‌متر به تعداد ۱۰ بذر در هر پتری روی کاغذ صافی منتقل و در دمای ۲۵ درجهٔ سانتی‌گراد نگه‌داری شدند. سه‌روز بعد از جوانه‌زنی، دانه‌رست‌ها به بشرهای ۶۰۰ میلی‌لیتری حاوی ۵۰۰ میلی‌لیتر محلول غذایی نیم‌قدرت هوگلند منتقل شدند. دو روز بعد، محلول غذایی تمام‌قدرت حاوی غلظت‌های صفر، ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میکرومولار نیکل به‌شکل کلرید نیکل اعمال شد. pH محلول‌ها در ۵/۸ تنظیم و محلول‌ها هر سه‌روز یک‌بار تعویض شدند. آزمایش درقالب طرح کاملاً تصادفی اجرا و هر تیمار سه‌بار تکرار شد. ۱۵ روز بعد از تیمار، دانه‌رست‌ها برداشت و وزن تر، وزن خشک و طول ریشه و اندام هوایی اندازه‌گیری شد. برای اندازه‌گیری واکنش هیل و میزان رنگیزه‌های فتوسنتزی، از بافت تر برگ سوم استفاده شد.

اندازه‌گیری میزان رنگیزه‌ها

میزان کلروفیل‌های a و b با روش Lichtenthaler and Wellburn (1983) اندازه‌گیری شد. یک گرم از بافت تر برگ توزین و با ۵۰ میلی‌لیتر استون ۱۰۰درصد له شد. بعد از صاف‌کردن، عصاره به مدت ۱۰ دقیقه در ۲۵۰۰ rpm سانتریفیوژ شد. برای تعیین میزان کلروفیل‌های a و b میزان جذب آنها بوسیلهٔ دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج‌های ۶۶۳ و ۶۴۵ نانومتر و برای تعیین میزان کاروتنوئیدها در طول موج ۴۷۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. برای محاسبهٔ مقادیر کلروفیل‌های a و b و کاروتنوئید از فرمول زیر استفاده شد:

Chla (chlorophyll a)= (11.75 A663 – 2.350 A645)

Chlb (chlorophyll b)= (18.61 A645 – 3.960 A663)

Carotinoids content: Cx+c = [1000A470 – 2.270 Chla – 81.4 Chlb]/ 227

اندازه‌گیری واکنش هیل

برای اندازه‌گیری واکنش هیل از روش Bregman (1990) استفاده به‌عمل آمد. یک گرم از برگ‌های تازه با ۳ میلی‌لیتر بافر (شامل: Na_2HPO_4، KH_2PO_4 و به ازای هر ۱۰۰ میلی‌لیتر بافر، ۶ گرم ساکارز و ۰/۰۱ گرم کلرید پتاسیم) سرد له شد. مواد هموژنیزه شدند و از یک تنظیف چهار عبور داده شدند. فیلترات حاصل به‌مدت ۲ دقیقه با ۱۲۰۰۰ rpm سانتریفوژ شد و محلول رویی دور ریخته شد.

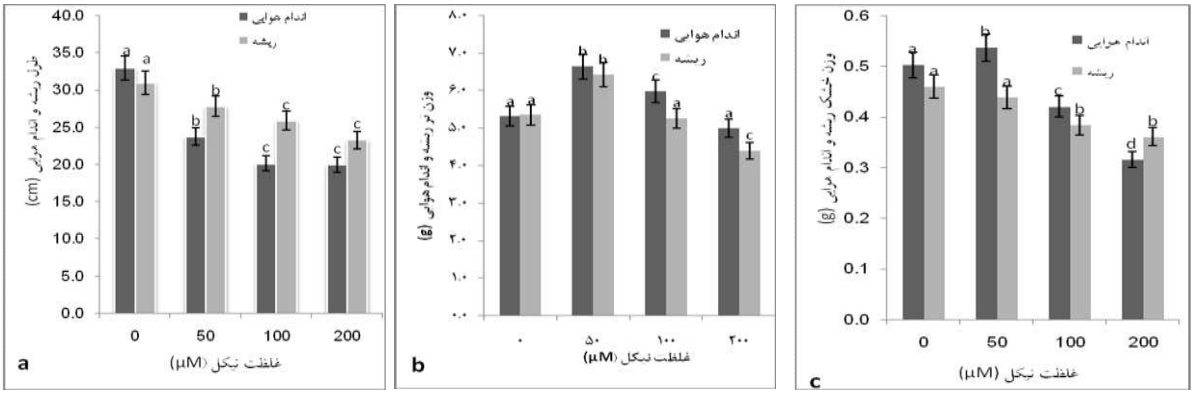
۳ میلی‌لیتر بافر فسفات (pH= ۷) سرد روی رسوب افزوده شد و به‌کمک قلم‌مو کلروپلاست‌ها به حالت تعلیق درآمد. برای انجام واکنش هیل، به ۰/۵ میلی لیتر از تعلیق کلروپلاست‌ها، ۲ میلی‌لیتر بافر فسفات و ۰/۲ میلی‌لیتر محلول رنگی دی‌کلروفنل ایندوفنل افزوده شد. بلافاصله جذب آن در ۵۵۰ نانومتر اندازه‌گیری شد، سپس لوله از دستگاه اسپکتروفتومتر خارج شد و به‌مدت ۲۰ ثانیه مقابل لامپ ۱۵۰ واتی قرار گرفت و بعد از این مدت دوباره جذب آن اندازه‌گیری شد. این عمل تا ۱۰ دقیقه تکرار شد تا میزان نور عبوری (T) عدد ثابتی را نشان دهد. در شاهد مقدار T، ۱۰۰درصد در نظر گرفته شد و میزان T در تیمارها به صورت درصد نسبت به شاهد مقایسه شد.

درتمام آزمایش‌ها از طرح آماری کاملاً تصادفی استفاده شد. تجزیه وتحلیل داده‌ها با ANOVA با استفاده از نرم‌افزار SPSS، مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون دانکن در سطح احتمال ۵٪ و رسم نمودارها با نرم‌افزار EXCEL 2007 صورت گرفت و از خطای معیار (SE) برای مقایسهٔ میانگین تیمارها استفاده شد.

نتایج

تأثیر سمیت نیکل بر رشد

با توجه به شکل ۱a، با افزایش غلظت نیکل از طول ریشه و اندام هوایی کاسته شد، ولی رشد ریشه در مقایسه با اندام هوایی بسیار حساس‌تر بود. نتایج حاصل از بررسی وزن تر و خشک نیز این موضوع را تصدیق می‌کردند (شکل‌های ۱b,c). با توجه به شکل‌های ۱a، با افزایش غلظت نیکل تا ۲۰۰ میکرومولار، از طول ریشه و اندام هوایی کاسته شد؛ البته تفاوت معنی‌داری در طول اندام هوایی تحت تیمار ۱۰۰ و ۲۰۰ میکرومولار کلرور نیکل مشاهده نشد. با توجه به شکل‌های ۱b,c، با افزایش غلظت نیکل تا ۵۰ میکرومولار، وزن تر و خشک ریشه و اندام هوایی افزایش یافت، ولی وزن خشک از غلظت‌های بالاتر از ۱۰۰ میکرومولار و وزن تر از غلظت‌های بالاتر از ۲۰۰ میکرومولار کاهش یافت. وزن تر گیاه کمتر از وزن خشک تحت تأثیر غلظت‌های بالای نیکل قرار گرفت.

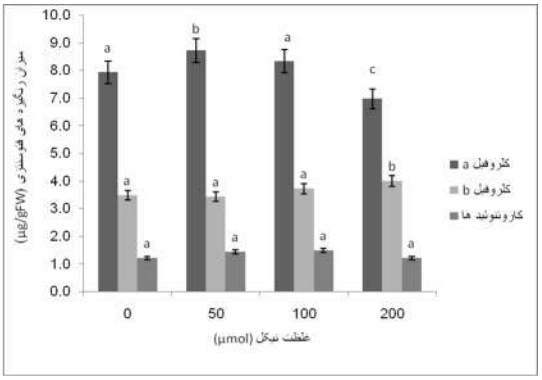


شکل ۱- اثر غلظت‌های مختلف نیکل بر طول (a)، وزن تر (b) و وزن خشک ریشه و اندام هوایی (c) در دانه‌رست‌های ذرت. بارهای عمودی نشان‌دهندهٔ میانگین سه تکرار $\pm$ خطای معیار است. حروف انگلیسی مشابه مبین عدم اختلاف آماری معنی‌دار در حد $p<$۰/۰۵ است.

Fig. 1. Effects of different concentrations of nickel on: (a) length, (b) fresh weight and (c) dry weight in shoot and roots of *Zea mays* seedings. Values with the same letter are not significantly different at $p<0.05$.

تأثیر سمیت نیکل بر میزان رنگیزه‌های فتوسنتزی

با توجه به شکل ۲، با افزایش نیکل تا ۵۰ میکرومولار، میزان کلروفیل a افزایش یافت، ولی در غلظت‌های بالاتر از ۲۰۰ میکرومولار نیکل، از میزان آن کاسته شد.



شکل ۲- اثر غلظت‌های مختلف نیکل بر میزان رنگیزه‌های فتوسنتزی در دانه‌رست‌های ذرت. بارهای عمودی نشان‌دهندهٔ میانگین سه تکرار ± خطای معیار است. حروف انگلیسی مشابه مبین عدم اختلاف آماری معنی‌دار در حد p <۰/۰۵ می‌باشد.

Fig. 2. Effects of different concentrations of nickel on photosynthetic pigments in *Zea mays* seedlings. Values with the same letter are not significantly different at $p< 0.05$.

درمقابل، افزایش غلظت‌های نیکل تغییر معنی‌داری در میزان کلروفیل b و کاروتنوئیدها ایجاد نکرد.

تأثیر سمیت نیکل بر واکنش هیل

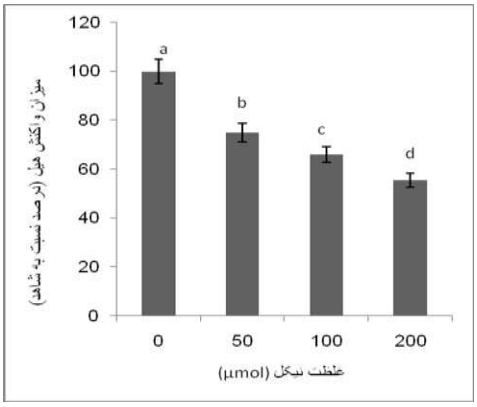
توانایی کلروفیل a در مرکز واکنشی PSII برای شکافت آب و آزادسازی اکسیژن در این فرایند بررسی شد. Robert Hill در سال ۱۹۳۷ نشان داد که کلروپلاست‌های جداشده می‌توانند در غیاب CO_2 اکسیژن آزاد کنند (Bregman, 1990). مواد رنگی مختلفی را می‌توان به منزلهٔ پذیرندهٔ مصنوعی الکترون [مانند دی‌کلروفنل ایندوفنل آبی‌رنگ (A)] به‌کار برد تا واکنش کلی که به واکنش هیل معروف است به شکل زیر صورت پذیرد:

$$H_2O + A \rightarrow AH_2 + ½\ O_2 \quad \text{(بی‌رنگ)}$$

با توجه به شکل ۳، در گیاهان تحت تنش، با افزایش غلظت نیکل از سرعت واکنش هیل نسبت به گیاهان شاهد (صفر میکرومولار کلرور نیکل) کاسته شد، به‌طوری‌که در غلظت ۲۰۰ میکرومولار تاحدود ۵۰ درصد نسبت به شاهد کاهش یافت.

بحث

نیکل یکی از عناصر غذایی کم‌مصرف و ضروری برای گیاهان قلمداد می‌شود، اما زیادی آن سبب تغییر برخی فرآیندهای فیزیولوژیکی و درنتیجه بروز علائم سمیت، مانند کاهش رشد، کلروزیس و نکروزیس در گیاهان می‌شود (Chen *et al*., 2009). کاهش بیوماس تحت تأثیر غلظت‌های بالای نیکل در گونه‌های گیاهی دیگری نظیر کلم، گندم و جاتروفا نیز گزارش شده است (Yan *et al*., 2008; Gajewska *et al.,* 2006; Pandey & Sharma, 2002).



شکل ۳- تأثیر سمیت نیکل بر واکنش هیل در دانه‌رست‌های ذرت. بارهای عمودی نشان‌دهندهٔ میانگین سه تکرار ± خطای معیار است. حروف انگلیسی نامشابه مبین عدم اختلاف آماری معنی‌دار در حد $p <$ ۰/۰۵ می‌باشد.

Fig. 3. Effects of different concentrations of nickel on Hill reaction in *Zea mays* seedlings. Values with the same letter are not significantly different at $p< 0.05$.

با توجه به نتایج حاصل، اندام هوایی و ریشه دربرابر غلظت‌های مختلف نیکل پاسخ رشدی متمایزی از خود نشان می‌دهند. این پدیده می‌تواند از دلایل مختلفی ناشی شده باشد ازجمله:

الف- کندی انتقال نیکل از ریشه‌چه به اندام هوایی که با یافته‌های Yang مطابقت دارد (Li *et al*., 2009; Yang *et al*., 1998).

ب- چون ریشه‌چه زودتر از اندام هوایی پوستهٔ دانه را شکسته و ظاهر می‌شود، بنابراین، زودتر تحت تأثیر غلظت‌های بالای نیکل قرار می‌گیرد.

تنش فلزات سنگین ازجمله نیکل از مهم‌ترین عوامل محدودکنندهٔ رشد ریشه است که با کاهش تقسیم سلولی وطویل‌شدن آن ارتباط دارد (Molas, 2002). با توجه به نتایج حاصل، نیکل در غلظت‌های پایین اثر ترغیبی بر رشد نشان می‌دهد که این نتایج با یافته‌های Seregin و همکارانش مطابقت دارد. بنابراین می‌توان گفت در مناطقی که غلظت نیکل در حدود ۵۰ میکرومولار باشد به‌راحتی می‌توان ارقام مختلف ذرت را کشت کرد.

کاهش کلروفیل در حضور نیکل می‌تواند به‌دلیل افزایش فعالیت آنزیم کلروفیلاز یا حساسیت سایر آنزیم‌های مسیر بیوسنتزی پورفیرین‌ها ازجمله بازدارندگی سنتز آنزیم دلتاآمینولوولینیک اسید دهیدراتاز باشد (Seregin, 2008).

کاهش میزان کلروفیل می‌تواند از کاهش فعالیت آنزیم‌های هم‌دار مانند کاتالاز و پراکسیداز یا از کاهش دسترسی به آهن لازم برای سنتز کلروفیل ناشی شده باشد (Pandey & Sharma, 2002). نیکل می‌تواند جایگزین یون منگنز در بخش تتراپیرول مولکول کلروفیل شود (Gajewska *et al.,* 2006; Pandey & Sharma, 2002). این کاهش در میزان کلروفیل می‌تواند کاهش رشد را نیز توجیه کند. در بررسی سازوکار عمل نیکل، احتمال می‌دادیم که نیکل در مراکز منگنز فتوسیستم II ایجاد اختلال کند و از فراهم‌شدن الکترون‌ها به فتوسیستم II جلوگیری شود. در آن صورت پروتون‌ها به داخل تیلاکوئیدها وارد نمی‌شوند، ATP سنتز نمی‌شود، $NADP^+$ احیا نشده و واکنش‌های انرژی‌خواه چرخهٔ کالوین که به ATP و NADPH نیاز دارند، بلوکه شده و تثبیت CO_2 مختل می‌شود. بنابراین، تصمیم گرفتیم اثر نیکل بر واکنش هیل را بررسی کنیم. واکنش هیل، احیای

نوری یک پذیرندهٔ الکترونی توسط هیدروژن‌های آب است. با توجه به شکل ۳، می‌توان نتیجه گرفت که با افزایش غلظت نیکل، از فعالیت مجموعهٔ شکافندهٔ آب کاسته می‌شود و رنگ آبی محلول دی‌کلروفنل ایندوفنل که در اینجا به منزلهٔ پذیرندهٔ مصنوعی الکترون عمل می‌کند، با سرعت کمتر در مقایسه با شاهد در طی زمان از بین می‌رود.

کاهش میزان واکنش هیل (شکل۳) می‌تواند به دلیل آسیب اکسیداتیو دستگاه فتوسنتزی ناشی از نیکل باشد (Gajewska *et al*., 2006). نیکل به دستگاه فتوسنتزی در سطوح مختلف ساختاری آسیب وارد می‌کند، مانند تخریب سلول‌های میان برگ و بافت‌های روپوستی، کاهش میزان کلروفیل، آسیب غشاء تیلاکوئید و درنتیجه ساختار گرانا، کاهش اندازهٔ گرانا و افزایش تعداد تیغه‌های تمایز نیافته (Molas, 2002; Madhava & Sresty, 2000).

در سطوح بیوشیمیایی، نیکل می‌تواند با زنجیر انتقال الکترون کلروپلاستی و واسطه‌های آن مانند سیتوکروم‌های b6f و b559 تداخل کند (Aravind & Prasad, 2004). نه تنها امکان دارد که نیکل به‌جای منگنز در مجموعهٔ شکافندهٔ آب قرار گیرد، بلکه ممکن است به‌صورت آلوستریک نیز عمل کند و به قسمت دیگری از پروتئین‌های مجموعهٔ شکافندهٔ آب چنان متصل شود که نقاط فعال آنها را تحت تأثیر قرار دهد و واکنش هیل را بلوکه کند یا از انتقال الکترون‌های حاصل از شکافت آب در کمپلکس شکافندهٔ آب به سیستم نوری II جلوگیری کند (Boisvert, 2007).

نیکل اضافی می‌تواند از رشد و نمو گیاه جلوگیری کند، کلروزیس و پژمردگی برگ را القا نماید و کل محصول نهایی گیاه را کاهش دهد. سمیت نیکل می‌تواند از شدت فتوسنتز بکاهد و فعالیت آنزیم‌های مربوط به آن را تغییر دهد (Chen *et al*., 2009). با وجود این، در سطح مولکولی، سازوکارهای دست‌اندرکار در سمیت نیکل بسیار ناشناخته‌اند و به مطالعات بیشتری نیاز دارند.

از جمع‌بندی مطالعات انجام‌شده، برمی‌آید که کاهش رشد و فتوسنتز ناشی از سمیت نیکل نمی‌تواند فقط به یک عامل مربوط باشد و به نظر می‌رسد درنتیجهٔ تأثیر ترکیبی از عوامل متعدد بر ساختار کلروپلاست، میزان کلروفیل و کمپلکس‌های پروتئینی فتوسنتزی ایجاد شود.

References

Aravind, P. and Prasad, M.N.V. 2004. Zn protects chloroplasts and associated photochemical functions in cadmium exposed Ceratophyllum demersum L. a freshwater macrophyte. – Plant Sci. 166: 1321–1327.

Boisvert, S. 2007. Inhibition of the oxygen-evolving complex of photosystem II and depletion of extrinsic polypeptides by nickel. – BioMetals 20: 879–889.

Bregman, A. 1990. – Laboratory Investigations in Cell and Molecular Biology. Third Edition, John Wiley & Sons, New York.

Chen, C., Huang, D. and Liu, J. 2009. Functions and toxicity of Nickel in plants: advances and future prospects. – Clean Journal 37: 304-313.

Gajewska, E., Skłodowska, M., Słaba, M. and Mazur, J. 2006. Effect of nickel on antioxidative enzyme activities and chlorophyll contents in Wheat shoots. – Biol. Planta. 50: 653–659.

Kabata-Pendias, A. and Pendias, H. 2001. Trace elements in soils and plants. – CRC Press Inc., Boca Raton, FL., USA.

Li, B., Zhang, X., Wang, X.D. and Ma, Y.B. 2009. Refining abiotic ligand model for nickel toxicity to barley root elongation in solution culture. – Ecotox. Environ. Saf. 72: 1760–1766.

Lichtenthaler, H.K. and Wellburn, A. 1983. Determination of total carotenoids and chlorophylls a and b of leaf extracts in different solvents. – Bioch. Soc. Trans. 603: 591–592.

Liamas, A., Ullrich, C.I. and Sanz, A. 2008. Ni^2+ toxicity in rice: Effect on membrane functionality and plant water content. – Plant Physiology and Biochemistry 46: 905-910.

Madhava-Rao, K.V. and Sresty, T.V. 2000. Antioxidative parameters in the seedlings of pigeonpea (Cajanus cajan (L.) Millspaugh) in response to Zn and Ni stresses. – Plant Sci. 157: 113–128.

Molas, J. 2002. Changes of chloroplast ultrastructure and total chlorophyll concentration in cabbage leaves caused by excess of organic Ni (II) complexes. – Environ. Exp. Bot. 47: 115–126.

Pandey, N. and Sharma, C.P. 2002. Effect of heavy metals Co^2+, Ni^2+ and Cd^2+ on growth and metabolism of cabbage. – Plant Sci. 163: 753–758.

Rahman, H., Sabreen, S., Alam, S. and Kawai, S. 2005. Effects of nickel on growth and composition of metal micronutrients in barley plants grown in nutrient solution. – Plant Nutr. 28: 393–404.

Seregin, I.V. and Kozhevnikova, A.D. 2006. Physiological role of nickel and its toxic effects on higher plants. – Russian Journal of Plant Physiol. 53: 257–277.

Yang, R., Gao, S., Yang, W., Cao, M., Wang, S. and Chen, F. 2008. Nickel toxicity induced antioxidant enzyme and phenylalanine ammonia-lyase activities in *Jatropha curcas* L. cotyledons. – Plant Soil Environ. 54: 294-300.

Yang, X., Baligar, V.C., Martens, D.C. and Clark, R.B. 1996. Plant tolerance to nickel toxicity. I: Influx, transport and accumulation of nickel in four species. – J. of Plant Nutr. 19: 73-85.