

تغییر پارامترهای مقاومت به نیکل بر اثر نور در کالوس‌های گیاه بیش‌انباشتگر نیکل آلیسوم اینفلاتوم

رسول قاسمی^{۱*}، رقیه سمیع^۲ M.Sc.

۱- گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران
 ۲- گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه پیام نور، مرکز اصفهان
 * پست الکترونیک نویسنده مسئول: rsl_ghsm@yahoo.com

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۱/۹/۲۱

تاریخ دریافت: ۱۳۹۱/۵/۱۱

چکیده:

هدف: گیاه *Alyssum inflatum* بومی خاک‌های سرپنتین غرب ایران و بیش‌انباشتگر نیکل محسوب می‌شود. در این مطالعه از روش کشت کالوس استفاده شد تا با استفاده از سیستمی با درجات پیچیدگی کمتر از نظر سازمان بافتی و اندامی نسبت به گیاه کامل، مکانیسم‌های مقاومت به غلظت‌های بالای نیکل بررسی شود.

مواد و روش‌ها: پس از تکثیر کالوس‌ها بر روی محیط MS و غلظت‌های هورمونی ۱/۵ و ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر به ترتیب 2,4-D و کینتین، کالوس‌ها در شرایط نور و تاریکی تحت تیمار با غلظت‌های مختلف نیکل (۰، ۱۰۰، ۲۰۰، ۳۰۰، ۴۰۰، ۵۰۰ و ۶۰۰ میکرومولار) قرار گرفتند و سپس پارامترهای مختلف مقاومت شامل رشد، محتوی کلروفیل و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت اندازه‌گیری شد.

نتایج: نتایج نشان داد که نور علاوه بر تحریک رشد بیشتر، موجب القا مقاومت بیشتر به نیکل نیز در کالوس‌ها می‌شود. از بین سایر پارامترهای اندازه‌گیری شده، رابطه مثبتی بین افزایش مقاومت و افزایش فعالیت آنزیم کاتالاز به دست آمد، در حالی که در این شرایط افزایش در فعالیت سایر آنزیم‌های اندازه‌گیری شده مانند سوپراکسید دیسموتاز و آسکوربات پراکسیداز دیده نشد.

نتیجه‌گیری: از روش‌های کشت بافت برای بررسی بیشتر مکانیسم‌های مقاومت می‌توان با اجتناب از پیچیدگی‌های بافتی و اندامی استفاده کرد. در این مطالعه با مشاهده اثر نور بر افزایش مقاومت در کالوس‌ها، می‌توان بر تاثیر تمایز یابی سلولی بر مقاومت تاکید کرد و از این سیستم برای بدست آوردن نتایج و تعمیم مستدل آن‌ها به گیاه کامل استفاده کرد.

واژگان کلیدی: آلیسوم، کالوس، مقاومت، نیکل

مقدمه

فلزات در گیاهان نقش‌های مهم و حیاتی به عهده دارند ولی در شرایط طبیعی غلظت فلزات مختلف در بافت‌های گیاهی بسیار کم است. بالا بودن غلظت فلز در محیط و به دنبال آن در بافت‌های گیاه موجب سمیت می‌شود. برخی از گیاهان قادر هستند غلظت‌های بسیار زیاد فلز را در بافت‌های هوایی خود انباشته کنند که به این گیاهان بیش‌انباشتگر (hyperaccumulator) می‌گویند (۱). حد تعریف شده برای گیاهان بیش‌انباشتگر نیکل ۱۰۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن خشک اندام‌های هوایی است (۱ و ۲). دلایل مقاومت بسیار بالای این گیاهان به فلزات و همچنین امکان جذب بسیار زیاد آن توسط ریشه‌ها هنوز به خوبی مشخص نشده است و فرضیه‌های مختلفی در این زمینه وجود دارد که از جمله عبارتند از: توان بالای تولید ترکیبات کی‌لیت‌کننده فلزات (metal chelators) نظیر اسیدهای آلی و اسیدهای آمینه، فعالیت بالای ترانسپورترهای مسئول انتقال فلزات، حجره‌بندی (compartmentation) سلولی و بافتی موثر، غلظت بالای عوامل مقابله با استرس‌ها مانند متالوتیونئین‌ها و فیتوکلاتین، وجود برخی از مسیرهای بسیار فعال انتقال پیام سلولی مانند مسیرهای وابسته به سالیسیلیک اسید و همچنین فعال‌تر بودن سیستم‌های آنتی‌اکسیدانی مانند فعال‌تر بودن آنزیم‌هایی نظیر کاتالاز (۲).

برای یافتن مکانیسم‌های فیزیولوژیک و مبنای مولکولی امکان انباشت مقادیر زیاد فلزات و مقاومت بالا در این گیاهان راهکارهای مختلفی وجود دارد که بررسی بیان ژن‌ها، استفاده از گیاهان تراریخته در ژن‌های ویژه شناخته شده در هر یک از صفات مذکور، مقایسه گیاهان انباشتگر با نمونه‌های گیاهی هم‌جنس (congeneric) یا هم‌گونه (conspecific) که فاقد صفت مذکور هستند و یا مقایسه پاسخ گیاهان انباشتگر و مقاوم به فلز به محرک‌های مختلف محیطی و استنباط از نحوه پاسخ، از این روش‌های مطالعه است (۲، ۳، ۴ و ۵).

بررسی‌های فیزیولوژیک در سطح گیاه کامل در برخی موارد به دلیل پیچیدگی سازمان بافتی و اندام‌ها و همچنین پاسخ فیزیولوژیک متفاوت در سلول‌های با درجات مختلف تمایز یافتگی و بیان متفاوت ژن‌ها، با مشکلاتی همراه است. کالوس و کشت‌های سوسپانسیون سلولی از یک سیستم سلولی ساده که فاقد سلول‌های تمایز یافته است تشکیل شده است. در این

سیستم‌های ساده‌تر سلولی که پیچیدگی‌های زیاد سازمان‌یافتگی بافتی در آن وجود ندارد به نظر می‌رسد بهتر می‌توان پاسخ‌های سلولی را مشخص نمود. به‌علاوه پس از مشخص شدن مکانیسم‌ها و راه‌های موجود، آن‌ها را می‌توان به سطح گیاه کامل تعمیم داد. اگرچه همواره امکان مستقیم چنین تعمیم‌هایی به دلیل پاسخ‌های مختلف گیاه و سلول‌های مجزا شده وجود ندارد، اما با انجام استدلال‌ها و آزمایش‌های تکمیلی بر روی گیاه کامل، نتایج استفاده از این سیستم‌های ساده‌تر ارزشمند خواهد بود (۶).

نور از مهم‌ترین عوامل محیطی است که بر گیاهان تاثیر می‌گذارد و موجب واکنش‌های متعدد و متنوعی در رشد و نمو آن‌ها می‌شود. نور منبع انرژی برای گیاهان است و به علاوه واکنش‌هایی مانند جوانه زنی، بذر، نمو برگ، طویل شدن ساقه، ریتم شبانه‌روزی و تمایز زایی اندام‌های سلولی را نیز کنترل می‌کند. به علاوه نور بر بسیاری از مسیرهای متابولیکی و همچنین فعالیت‌های آنزیمی تاثیر می‌گذارد (۷).

بیشترین گیاهان بیش‌انباشتگر نیکل متعلق به جنس آلیسوم که بومی (endemic) خاک‌های سرپنتین (serpentine soils) می‌باشند (۱). این خاک‌ها علاوه بر بافت تکامل نیافته از نظر افق‌های خاک و عدم مقادیر متناسبی از مواد آلی، از نظر عناصر مورد نیاز گیاهان مانند نیتروژن، پتاسیم و فسفر فقیر هستند. همچنین حاوی غلظت‌های بالایی از فلزات سنگین مانند نیکل و کروم هستند. گیاهان جنس آلیسوم گیاهانی یکساله، دوساله یا پایا دارای برگ‌های کامل و پوشیده از کرک‌های ستاره‌ای می‌باشند. گل‌های آن‌ها زرد یا زرد فام است و میوه در آن‌ها از نوع خورجینک مدور یا بیضی شکل دارای ۲ خانه است. از ۱۷۰ گونه آلیسوم ۴۷ تاکسون بیش‌انباشتگر نیکل است (۸). این گیاهان به دلیل تکامل بر روی خاک‌های فلزدار می‌توانند در جاتی از سازش‌یافتگی به فلز را کسب کرده باشند که به عبارتی در حضور غلظت‌های بالای فلز پاسخ‌های رشدی و فیزیولوژیک مناسب‌تری در جهت انطباق با محیط بروز می‌دهند (۹ و ۱۰).

در این مطالعه اثر نور بر پارامترهای مقاومت به نیکل در گیاه آلیسوم اینفلاتوم که بومی خاک‌های سرپنتین غرب ایران است بررسی شده است. به منظور انجام بررسی‌ها از کالوس استفاده شده است تا بتوان مستقیماً و بدون تداخل سازمان‌یابی‌های بافتی و اندامی که در گیاه کامل با درجات بالاتری وجود دارد، به

نتایج دست یافت.

موج‌های مربوطه است.

مواد و روش‌ها

در همه آزمایش‌ها از محیط کشت MS و ترکیب هورمونی ۲ و ۴-دی کلرو فنوکسی استیک اسید (2,4-D) و کینتین به ترتیب با غلظت ۱/۵ و ۰/۱ میلی گرم بر لیتر که در پیش تست‌های قبلی برای کالوس‌زایی بهینه شناسایی شده بود استفاده گردید. غلظت‌های مختلف نیکل (۰، ۱۰۰، ۲۰۰، ۳۰۰، ۴۰۰، ۵۰۰ و ۶۰۰ میکرومولار) با افزودن نمک NiSO_4 به محیط به دست آمد. در هر پتری دیش ۳۰ میلی لیتر از محیط ریخته شده و هر تیمار با ۲۰ تکرار آماده شد. در هر پتری ۳ قطعه کالوس هر کدام به وزن ۰/۲ گرم قرار داده شد. از هر تیمار ۱۰ تکرار در شرایط دمایی ثابت ۲۵ درجه سانتی‌گراد و شرایط نوری مناسب اتاق رشد با شدت ۴۰ میکرومول فوتون بر مترمربع بر ثانیه و همچنین ۱۰ تکرار در شرایط یکسان اما در تاریکی قرار گرفتند.

برداشت کالوس‌ها، اندازه‌گیری وزن تر و بررسی

پارامترهای فیزیولوژیک: همه کالوس‌ها در فواصل زمانی ۱۰، ۲۰ و ۴۰ روز مورد اندازه‌گیری و ارزیابی وزن تر قرار گرفتند به نحوی که از هر تیمار ۳ پتری در هر فاصله زمانی به طور تصادفی انتخاب می‌شد. کالوس‌ها ۴۰ روز پس از کشت در شرایط تحت تیمار برداشت شده و مورد سایر آنالیزها قرار گرفتند.

اندازه‌گیری کلروفیل و کارتنوئید در کالوس‌های تحت نور:

غلظت کلروفیل a، کلروفیل b و کلروفیل کل در کالوس‌های تیمار شده با غلظت‌های مختلف نیکل اندازه‌گیری شد. برای این منظور ۰/۱ گرم از مخلوط کالوس‌های هر پتری را در لوله آزمایش ریخته، به هر لوله ۳ میلی لیتر متانول اضافه کرده و نمونه‌ها را در حمام آبی در ۷۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه گرم کرده و جذب را در طول موج‌های ۶۶۵/۲، ۶۵۲/۴ و ۴۷۰ نانومتر با دستگاه طیف‌سنج نوری (Rayleigh, UV-1601) اندازه گرفته شد و مقادیر کلروفیل‌های a و b، کلروفیل کل و کارتنوئید کل با استفاده از فرمول‌های زیر محاسبه شد (۱۱).

$$C_a (\mu\text{g/ml}) = 16.72A_{665.2} - 9.16A_{652.4}$$

$$C_b (\mu\text{g/ml}) = 34.09A_{652.4} - 15.28A_{665.2}$$

$$C_{(x+c)} (\mu\text{g/ml}) = (1000A_{470} - 1.63C_a - 104.96C_b)/221$$

در این فرمول‌ها C_a غلظت کلروفیل a، C_b غلظت کلروفیل b، $C_{(x+c)}$ غلظت کاروتنوئید کل و A شدت جذب در طول

عصاره‌گیری نمونه و اندازه‌گیری پروتئین: پس از برداشت کالوس‌ها از محیط کشت، ابتدا هاون‌های چینی با نیتروژن مایع سرد گردید. سپس ۰/۱ گرم از نمونه‌های کالوس آماده شده به همراه نیتروژن مایع ساییده شد تا به حالت پودرهای همگن تبدیل شوند. سپس ۲۵۰۰ میکرولیتر بافر فسفات ۵۰ میلی مولار سرد (۴ درجه سانتی‌گراد) به آن اضافه شد و مجدداً ساییده شد. محلول‌های حاصل درون لوله اپندوروف ۲ میلی لیتر ریخته شدند. همه مراحل (عصاره‌گیری و نگهداری بافت‌های هموزن) در دمای پایین و بر روی یخ انجام شد. عصاره‌های حاصل سپس در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه در ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شدند. محلول رویی جهت اندازه‌گیری میزان پروتئین‌ها و میزان فعالیت آنزیمی مورد استفاده قرار گرفت. اندازه‌گیری پروتئین کل نمونه‌ها با استفاده از روش برادفورد (۱۲) و رسم منحنی استاندارد پروتئین با استفاده از آلبومین سرم گاوی (BSA) انجام شد.

اندازه‌گیری فعالیت آنزیم‌های APX، SOD و CAT

اندازه‌گیری فعالیت آنزیم APX (آسکوربات پراکسیداز) بر اساس روش (۱۳ و ۱۴) انجام شد. محلول واکنش حاوی ۱۴۵۰ میکرولیتر بافر فسفات پتاسیم ۵۰ میلی مولار $\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$ با pH 7 بود که حاوی ۰/۲ میلی مولار EDTA و ۳۵۰ میکرولیتر آسکوربیک اسید ۰/۵ میلی مولار بود. به این محلول واکنش، مقدار ۱۰۰ میکرولیتر نمونه عصاره استخراج شده افزوده شد. واکنش با افزودن ۱۰۰ میکرولیتر H_2O_2 ۲۰۰ میلی مولار شروع می‌شد. کاهش جذب در طول موج ۲۹۰ نانومتر اندازه‌گیری شد و فعالیت آنزیمی با استفاده از ضریب جذب مولی آسکوربیک اسید که برابر $\text{mm}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ۲/۹ است و همچنین مقدار پروتئین موجود در هر نمونه، محاسبه شد. یک واحد آنزیم APX معادل مقدار آنزیمی است که بتواند یک میکرومول آسکوربیک اسید را در مدت ۱ دقیقه در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد اکسید نماید. در شرایط عدم افزودن عصاره به محلول واکنش، مقدار کاهش جذب بسیار کم بود.

اندازه‌گیری فعالیت آنزیم کاتالاز (CAT) با روش اسپکتروفوتومتری در طول موج UV انجام شد (۱۵). محلول واکنش بافر فسفات ۵۰ میلی مولار $\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$ با pH حاوی غلظت ۵ میلی مولار H_2O_2 بود. واکنش با افزودن

کلیه آزمایش‌ها در قالب طرح فاکتوریل کاملاً تصادفی انجام شد. تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها با استفاده از نرم افزارهای SPSS و Excel انجام شد. برای بررسی معنی‌دار بودن اثر نور بر وزن تر و فعالیت آنزیمی در کالوس‌ها در مقایسه با شرایط تاریکی، از آزمون آماری t-test استفاده شد. از روش آماری آنالیز واریانس یک طرفه (One-way ANOVA) و تست توکی ($P < 0.05$) برای مقایسه‌های چندگانه استفاده شد. به منظور بررسی اثر همزمان نور و نیکل در اندازه‌گیری فعالیت آنزیم‌ها، از آنالیز واریانس دو طرفه (Two-way ANOVA) استفاده شد. از آنالیز واریانس چند طرفه (MANOVA) برای بررسی اثر نور، نیکل و زمان بر رشد کالوس‌ها استفاده گردید. برای بررسی شدت اثر هر کدام عوامل مورد بررسی ضریب مربع اتا (Eta^2) محاسبه گردید.

نتایج

تأثیر نیکل و نور بر رشد کالوس‌ها

نتایج حاصل از اندازه‌گیری رشد کالوس‌ها در شرایط غلظت‌های مختلف نیکل نشان داد که غلظت‌های ۵۰۰ و ۶۰۰ میکرومولار خارج از حیطه تحمل گیاه (کالوس‌ها) محسوب می‌شود، چنانچه هم در شرایط نور و هم تاریکی رشد کالوس‌ها کاملاً مهار شد (جدول ۱). حد آستانه سمیت در هر دو شرایط وجود نور و تاریکی ۳۰۰ میکرومولار نیکل در محیط به‌دست آمد. به طور کلی وجود غلظت‌های نیکل کمتر از حد سمیت یعنی ۱۰۰ و ۲۰۰ میکرومولار موجب تحریک رشد کالوس‌ها شده است. این تحریک رشد مخصوصاً در شرایط وجود نور محسوس‌تر دیده می‌شد. بهینه رشد در شرایط نور در ۲۰۰ میکرومولار و در تاریکی در ۱۰۰ میکرومولار نیکل در محیط کشت مشاهده شد. اثر نور بر رشد کالوس‌ها در مقایسه با شرایط تاریکی در غلظت‌های ۰، ۲۰۰، ۳۰۰ و ۴۰۰ میکرومولار نیکل مشاهده شد (جدول ۱). آنالیز واریانس چند طرفه از میزان رشد کالوس‌ها نشان داد (جدول ۲) که پس از ۴۰ روز نور اثر معنی‌داری بر رشد داشته است ($P < 0.05$). همچنین اثر معنی‌دار غلظت‌های مورد استفاده نیکل بر رشد پس از ۲۰ روز قابل مشاهده بود ($P < 0.001$). بر اساس آنالیز انجام شده مشخص شد که هر سه عامل زمان، نور و غلظت‌های نیکل مورد استفاده بر رشد کالوس‌ها اثر معنی‌دار داشته است ($P < 0.001$). اثر همزمان نیکل - نور، نیکل - زمان و نور - زمان و نیز اثر همزمان هر سه

۲۰۰ میکرولیتر محلول حاوی پروتئین به ۱۸۰۰ میکرولیتر محلول واکنش شروع می‌شد. میزان کاهش جذب در طول زمان در طول موج ۲۴۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. فعالیت CAT با استفاده از ضریب جذب مولی H_2O_2 که برابر $1 \text{ mm}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ است و همچنین با توجه به میزان پروتئین اندازه‌گیری شده در هر نمونه محاسبه شد. بر طبق تعریف، یک واحد کاتالاز مقدار آنزیمی است که موجب تجزیه یک میکرومول H_2O_2 در مدت یک دقیقه در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد شود. جهت کنترل، میزان کاهش جذب در عدم H_2O_2 و عدم نمونه پروتئین در محلول واکنش اندازه‌گیری شد که بسیار ناچیز بود.

سنجش فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز (SOD) باروش اسپکتوفوتومتری انجام شد. پس از تهیه عصاره‌های آنزیمی، فعالیت SOD کل با اندازه‌گیری قابلیت هر عصاره در ممانعت از انجام واکنش احیایی فتوشیمیایی نیتروبلوتترازولیوم باروش (۱۶) تعیین شد. محلول واکنش برای سنجش فعالیت SOD شامل بافر فسفات ۵۰ میلی‌مولار با pH ۷/۵، متیونین ۱۳ میلی‌مولار، نیتروبلوتترازولیوم ۷۵ میکرومولار، EDTA ۰/۱ میلی‌مولار و ریبولوین ۲ میکرومولار بود. میزان فعالیت آنزیم SOD در نمونه‌ها در مقایسه با کنترل سنجیده می‌شود. نمونه‌ها (دارای عصاره آنزیمی) در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه زیر لامپ فلوروسنت (۴۰W) با فاصله ۲۰ سانتی‌متر قرار داده شدند. پس از مدت ۱۰ دقیقه همه نمونه‌ها به تاریکی منتقل شدند و با دستگاه طیف سنج نوری جذب نمونه‌ها در ۵۶۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. اختلاف جذب نمونه‌های دارای عصاره آنزیمی و نمونه کنترل (نمونه‌های بدون افزودن عصاره)، در واقع نشان دهنده ممانعت واکنش تشکیل ماده رنگین فورمازان (Formazan) توسط SOD است. بنابراین میزان کاهش جذب برای هر نمونه محاسبه شد. طبق تعریف، یک واحد فعالیت SOD مقدار فعالیت آنزیمی است که باعث ۵۰ درصد ممانعت از احیا نیتروبلوتترازولیوم به فرمازان می‌شود. این روش براساس تبدیل نیتروبلوتترازولیوم به فورمازان در حضور نور و ظهور رنگ است. در صورتی که در محیط واکنش، آنزیم سوپراکسید دیسموتاز باشد از انجام این واکنش ممانعت کرده و میزان تشکیل ماده رنگی و ظهور رنگ را کاهش می‌دهد. با استفاده از این اختلاف جذب، واحد آنزیمی نمونه‌ها محاسبه و فعالیت آنزیمی برحسب واحد آنزیم در هر میلی‌گرم پروتئین عصاره (محاسبه شده از روش برادفورد) بیان گردید.

عامل بر رشد کالوس‌ها از نظر آماری معنی‌دار بود ($P < 0.001$). بیشترین سهم اثر مشاهده شده مربوط به اثر زمان و پس از آن به ترتیب مربوط به نیکل و برهمکنش اثر زمان و نیکل بود. در صورت آنالیز داده‌ها با استفاده از آنالیز واریانس دوطرفه در بازه

جدول ۱: تاثیر غلظت‌های مختلف نیکل بر وزن تر کالوس‌های گیاه بیش‌انباشتگر نیکل *A. inflatum* در شرایط تاریکی و نور. برداشت و مقایسه در سه زمان مختلف ۱۰، ۲۰ و ۴۰ روز پس از تیمار با غلظت‌های مختلف نیکل انجام شد.

زمان (روز)		۰		۱۰		۲۰		۴۰	
غلظت نیکل (μM)		نور	تاریکی	نور	تاریکی	نور	تاریکی	نور	تاریکی
۰	۰/۲ ± ۰/۰۱	۰/۲ ± ۰/۰۱	۰/۲ ± ۰/۰۱	۰/۲۲۶ ± ۰/۰۱۵۲ ab	۰/۲۶ ± ۰/۰۱۵۲ ab	۰/۲۶ ± ۰/۰۱۵۲ ab	۰/۲۶ ± ۰/۰۱۵۲ ab	۰/۴۰۳ ± ۰/۰۱۱۵ de	۰/۳۸۸ ± ۰/۰۱۵۲ cd*
۱۰۰	۰/۲ ± ۰/۰۱	۰/۲ ± ۰/۰۱	۰/۲ ± ۰/۰۱	۰/۲۴۹ ± ۰/۰۱۶۲ bc	۰/۲ ± ۰/۰۱	۰/۲۴۹ ± ۰/۰۱۶۲ bc	۰/۲۴۹ ± ۰/۰۱۶۳ bc	۰/۳۵۴ ± ۰/۰۲۳ cd	۰/۳۵۲ ± ۰/۰۱۵۲ e
۲۰۰	۰/۲ ± ۰/۰۱	۰/۲ ± ۰/۰۱	۰/۲ ± ۰/۰۱	۰/۲۷۱ ± ۰/۰۱۳۵ c	۰/۲ ± ۰/۰۱	۰/۲۷۱ ± ۰/۰۱۳۵ c	۰/۲۷۱ ± ۰/۰۱۳۵ c	۰/۴۸۶ ± ۰/۰۴۰۵ e	۰/۳۰۶ ± ۰/۰۱۵۲ d*
۳۰۰	۰/۲ ± ۰/۰۱	۰/۲ ± ۰/۰۱	۰/۲ ± ۰/۰۱	۰/۲۲۲ ± ۰/۰۰۸ ab	۰/۲ ± ۰/۰۱	۰/۲۲۲ ± ۰/۰۰۸ ab	۰/۲۲۲ ± ۰/۰۰۸ ab	۰/۳۰۶ ± ۰/۰۱۲۲ bc	۰/۲۵۹ ± ۰/۰۱۵۲ bc*
۴۰۰	۰/۲ ± ۰/۰۱	۰/۲ ± ۰/۰۱	۰/۲ ± ۰/۰۱	۰/۲۰۶ ± ۰/۰۰۵ a	۰/۲ ± ۰/۰۱	۰/۲۰۶ ± ۰/۰۰۵ a	۰/۲ ± ۰/۰۱	۰/۲۵۹ ± ۰/۰۲۷۶ ab	۰/۲۱۶ ± ۰/۰۱۵۲ ab*
۵۰۰	۰/۲ ± ۰/۰۱	۰/۲ ± ۰/۰۱	۰/۲ ± ۰/۰۱	۰/۲ ± ۰/۰۱	۰/۲ ± ۰/۰۱	۰/۲ ± ۰/۰۱	۰/۲ ± ۰/۰۱	۰/۲ ± ۰/۰۱	۰/۲ ± ۰/۰۱
۶۰۰	۰/۲ ± ۰/۰۱	۰/۲ ± ۰/۰۱	۰/۲ ± ۰/۰۱	۰/۲ ± ۰/۰۱	۰/۲ ± ۰/۰۱	۰/۲ ± ۰/۰۱	۰/۲ ± ۰/۰۱	۰/۲ ± ۰/۰۱	۰/۲ ± ۰/۰۱

حروف متفاوت در هر ستون نشان‌دهنده وجود تفاوت معنی‌دار بر اساس آزمون توکی ($P < 0.05$) *Tukey's HSD* است. مقادیر شامل میانگین سه تکرار \pm انحراف معیار است. * نشان دهنده تفاوت معنی‌دار بین شرایط نور و تاریکی در هر غلظت از تیمار نیکل بر اساس آزمون $t(P < 0.05)$ است.

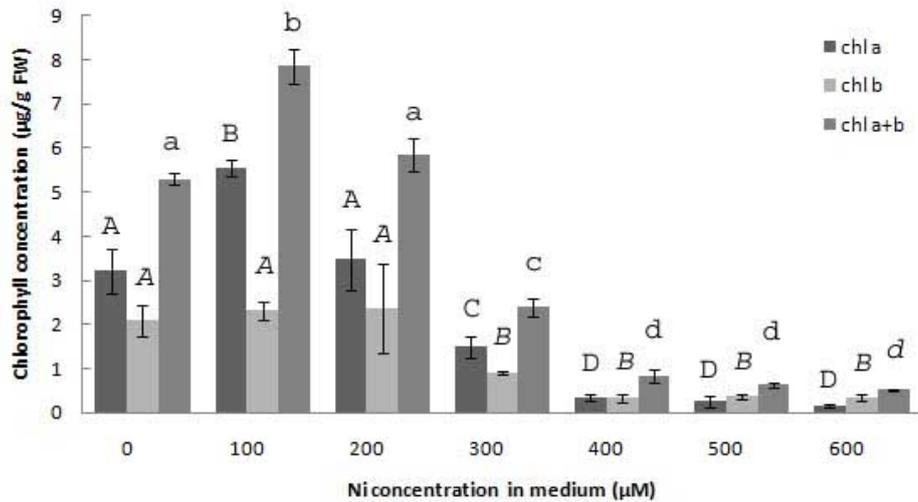
جدول ۲: تاثیر نور، نیکل، زمان و برهمکنش آن‌ها بر رشد کالوس‌های گیاه بیش‌انباشتگر نیکل *A. inflatum* مقادیر، حاصل از آنالیز واریانس چند طرفه (*MANOVA*) و دوطرفه (*Two way ANOVA*) و به صورت ضریب مربع اتا بر حسب درصد (Eta^2) و همچنین سطح معنی‌دار بودن (*sig*) هر یک از اثرها می‌باشد. * آنالیز واریانس دوره‌ها مربوط به زمان چهل روز پس از کشت کالوس‌ها می‌باشد.

منبع تغییرات	MANOVA		Two way ANOVA*	
	Eta ²	Sig.	Eta ²	Sig.
غلظت نیکل	۲۶	< ۰/۰۰۱	۷۲	< ۰/۰۰۱
نور	۲/۱	< ۰/۰۵	۱۲/۱	< ۰/۰۰۱
زمان	۳۴	< ۰/۰۰۱	-	-
نور-نیکل	۲/۷	< ۰/۰۰۱	۱۲/۴	< ۰/۰۰۱
نیکل-زمان	۲۳/۲	< ۰/۰۰۱	-	-
نور-زمان	۴	< ۰/۰۰۱	-	-
نور-نیکل-زمان	۵/۴	< ۰/۰۰۱	-	-
خطا	۲/۶	< ۰/۰۰۱	۳/۵	-

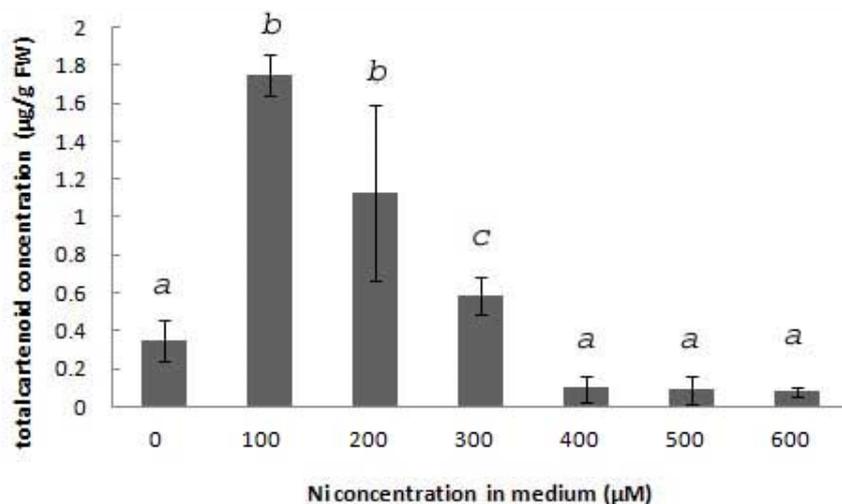
تاثیر نیکل بر محتوای کلروفیل و کاروتنوئید کالوس‌ها

روند تاثیر نیکل بر تغییرات غلظت کاروتنوئیدها همانند تغییرات کلروفیل به دست نیامد (شکل ۲). با افزایش غلظت نیکل از صفر به ۱۰۰، ۲۰۰ و ۳۰۰ میکرومولار، در محتوای کاروتنوئید افزایش معنی‌داری مشاهده شد ($P < 0.05$). افزایش بیشتر غلظت نیکل از ۴۰۰ میکرومولار موجب تنزل غلظت کاروتنوئیدها گردید. تفاوت معنی‌داری بین غلظت‌های ۱۰۰ و ۲۰۰ میکرومولار نیکل دیده نشد.

با افزایش غلظت نیکل در محیط کشت به ۱۰۰ میکرومولار، در غلظت کلروفیل a و کلروفیل کل افزایش معنی‌دار مشاهده شد (شکل ۱). با افزایش نیکل از ۳۰۰ میکرومولار به بعد کاهش معنی‌داری در محتوای کلروفیل a، b و کل دیده شد. میزان کلروفیل b تا ۲۰۰ میکرومولار نیکل تغییر معنی‌داری نشان نداد، اما با افزایش غلظت نیکل از ۲۰۰ میکرومولار کاهش معنی‌دار در مقدار آن مشاهده شد (شکل ۱).



شکل ۱: تاثیر نیکل بر غلظت کلروفیل *chl a* و مجموع کلروفیل‌های *a+b* در کالوس‌های گیاه بیش‌انباشتگر نیکل *A. inflatum* رشد یافته در غلظت‌های مختلف نیکل. عدم حروف مشترک در هر گروه (حروف بزرگ برای کلروفیل *a* حروف بزرگ ایتالیک برای کلروفیل *b* و حروف کوچک برای مجموع کلروفیل‌های *a* و *b*) بیانگر وجود تفاوت معنی‌دار بین میانگین‌ها بر اساس آزمون توکی ($P < 0.05$) *Tukey's HSD* است. مقادیر شامل میانگین سه تکرار \pm انحراف معیار است.



شکل ۲: تاثیر نیکل بر غلظت کارتنوئید در کالوس‌های گیاه بیش‌انباشتگر نیکل *A. inflatum* رشد یافته در غلظت‌های مختلف نیکل. حروف متفاوت نشان‌دهنده وجود تفاوت معنی‌دار بر اساس آزمون توکی ($P < 0.05$) *Tukey's HSD* است. مقادیر شامل میانگین سه تکرار \pm انحراف معیار است.

تاثیر نیکل بر فعالیت آنزیم‌های *CAT*، *APX* و *SOD*

نتایج نشان داد که فعالیت آنزیم *CAT* در کالوس‌ها در شرایط تاریکی نسبت به شرایط نور در غلظت‌های ۰ تا ۴۰۰ میکرومولار نیکل در محیط کشت تفاوت معنی‌دار وجود دارد به نحوی که فعالیت این آنزیم در غلظت‌های پایین‌تر از آستانه سمیت نیکل (۴۰۰ میکرومولار) در کالوس‌هایی که تحت نور بودند زیادتر بود. فعالیت آنزیم *CAT* با حضور نیکل در محیط کاهش معنی‌داری در هر دو شرایط نور و تاریکی پیدا کرد و با افزایش غلظت نیکل کاهش فعالیت به میزان بیشتری دیده شد (شکل ۳).

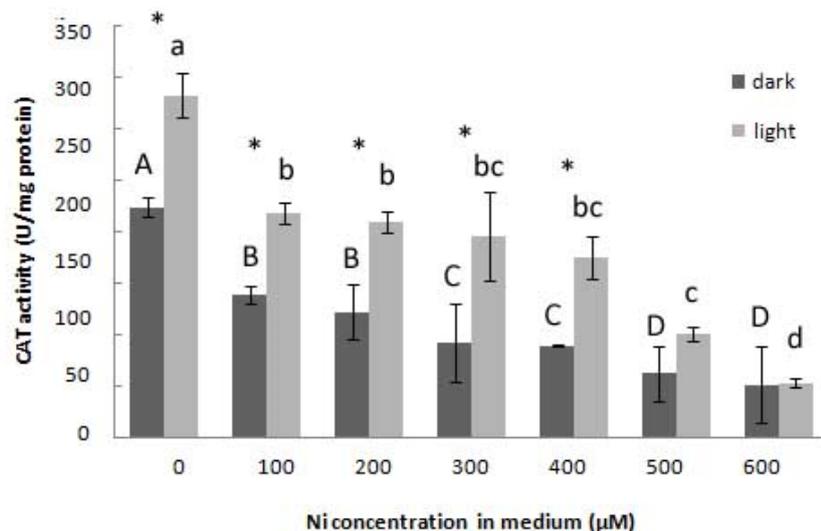
فعالیت آنزیم *APX* نیز با افزایش غلظت نیکل در محیط کشت کاهش معنی‌داری نشان داد (شکل ۴). به طور کلی وجود نور موجب تغییر در فعالیت آنزیم نشد. تنها تفاوت مشاهده شده بین شرایط نور و تاریکی در غلظت ۲۰۰ میکرومولار نیکل مشاهده شد که میزان فعالیت آنزیم در کالوس‌های رشد یافته در شرایط تاریکی نسبت به میزان فعالیت آنزیم در کالوس‌ها در شرایط نور بالاتر بود.

با اندازه‌گیری فعالیت آنزیم *SOD* در کالوس‌های رشد یافته در شرایط تاریکی و نور تفاوتی بین آن‌ها مشاهده نشد (شکل ۵).

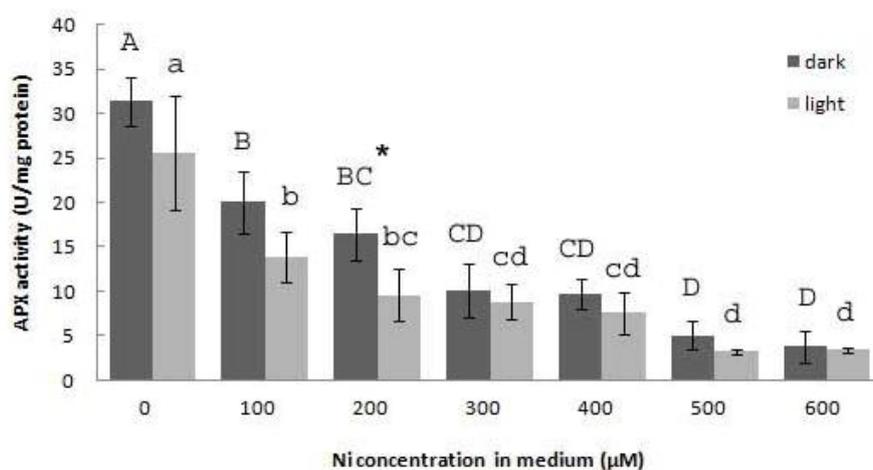
برای آنزیم CAT افزایش و برای APX کاهش بود (شکل‌های ۳ و ۴). اثر نور بر آنزیم SOD معنی‌دار نبود ($P=0.09$). اثر همزمان نور و نیکل بر فعالیت آنزیم CAT معنی‌دار با مقدار $P<0.01$ و در مورد آنزیم‌های APX و SOD معنی‌دار نبود (جدول ۳). محاسبه ضریب مربع اتا نشان داد که بیشترین سهم تغییرات فعالیت هر سه آنزیم مربوط به اثر غلظت‌های مورد استفاده نیکل بوده است. همچنین بالاترین اثر نور بر فعالیت آنزیم CAT بدست آمد (جدول ۳).

همچنین همانند دو آنزیم دیگر، با افزایش غلظت نیکل در محیط کشت، کاهش معنی‌داری در فعالیت این آنزیم در هر دو شرایط نور و تاریکی مشاهده شد (شکل ۵).

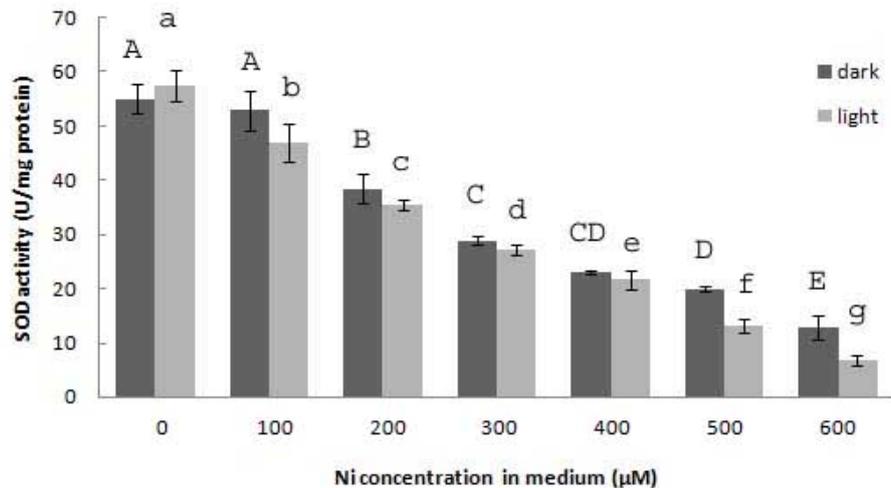
نتایج آنالیز آماری با استفاده از روش ANOVA دو طرفه (جدول ۳) نشان داد که غلظت‌های مورد استفاده نیکل، از نظر آماری اثر معنی‌داری بر فعالیت هر سه آنزیم داشته است (در مورد هر سه آنزیم $P<0.001$). اثر نور بر فعالیت آنزیم CAT ($P<0.001$) و APX ($P<0.01$) معنی‌دار بود اما روند تغییرات



شکل ۳: اثر غلظت‌های مختلف نیکل و نور بر فعالیت آنزیم کاتالاز در کالوس‌های گیاه بیش‌انباشتگر نیکل *A. inflatum*. حروف متفاوت نشان‌دهنده وجود تفاوت معنی‌دار در هر سری (حروف بزرگ برای شرایط تاریکی و حروف کوچک برای شرایط روشنایی) بر اساس آزمون توکی ($P<0.05$) Tukey's HSD است. علامت ستاره بیانگر وجود تفاوت معنی‌دار بین شرایط نور و تاریکی در غلظت نیکل متناظر بر اساس آزمون t ($P<0.05$) است. مقادیر شامل میانگین سه تکرار \pm انحراف معیار است.



شکل ۴: اثر غلظت‌های مختلف نیکل بر فعالیت آنزیم APX در کالوس‌های گیاه بیش‌انباشتگر نیکل *A. inflatum* در شرایط تاریکی و نور. حروف متفاوت نشان‌دهنده وجود تفاوت معنی‌دار در هر سری (حروف بزرگ برای شرایط تاریکی و حروف کوچک برای شرایط روشنایی) بر اساس آزمون توکی ($P<0.05$) Tukey's HSD است. علامت ستاره بیانگر وجود تفاوت معنی‌دار بین شرایط نور و تاریکی در غلظت نیکل متناظر بر اساس آزمون t ($P<0.05$) است. مقادیر شامل میانگین سه تکرار \pm انحراف معیار است.



شکل ۵: اثر غلظت‌های مختلف نیکل بر فعالیت آنزیم SOD در کالوس‌های گیاه بیش‌انباشتگر نیکل *A. inflatum* در شرایط تاریکی و نور. حروف متفاوت نشان‌دهنده وجود تفاوت معنی‌دار در هر سری (حروف بزرگ برای شرایط تاریکی و حروف کوچک برای شرایط روشنایی) بر اساس آزمون توکی ($P < 0.05$) / Tukey's HSD است. مقادیر شامل میانگین سه تکرار \pm انحراف معیار است.

جدول ۳: تاثیر نور، نیکل و برهمکنش نور-نیکل بر تغییرات فعالیت آنزیم‌های CAT، APX و SOD در کالوس‌های گیاه بیش‌انباشتگر نیکل *A. inflatum*. مقادیر، حاصل از آنالیز واریانس دوطرفه و به صورت ضریب مربع اتا بر حسب درصد (Eta^2) و همچنین سطح معنی‌دار بودن (sig) هر یک از اثرها می‌باشد.

منبع تغییرات	CAT		APX		SOD	
	Eta^2	Sig.	Eta^2	Sig.	Eta^2	Sig.
نور	۱۱/۶	< ۰/۰۰۱	۵/۵	< ۰/۰۱	۰/۸۷	< ۰/۰۹
غلظت نیکل	۷۹	< ۰/۰۰۱	۸۱/۴	< ۰/۰۰۱	۹۰/۱	< ۰/۰۰۱
نور-غلظت نیکل	۷	< ۰/۰۰۱	۱/۷	۰/۶۹۶	۱/۱	۰/۶۸۹
خطا	۲/۳		۱۱/۴		۷/۹	

این گیاهان (جنس آلیسوم که بیشترین گیاهان بیش‌انباشتگر نیکل در این جنس می‌باشند) کمتر شناخته شده است که از دلایل آن شناخت کم از ژنوم این گیاهان و انجام کم مطالعه‌های سلولی با استفاده از روش‌هایی مانند کشت سلول و کالوس می‌باشد. در این رابطه بیشتر مطالعه‌های انجام شده برای بررسی مکانیسم‌های مقاومت در این گیاهان با استفاده از روش‌های کشت بافت، بر روی کشت ریشه‌های مویین حاصل از اثر باکتری *آگروباکتریوم رایزوترنز* بوده است (۱۴ و ۱۹).

کالوس‌های به دست آمده از کشت بافت این گیاه برخی از رفتارهای معمول، نظیر رشد بیشتر، که در مورد بسیاری از سایر گیاهان دیده می‌شود (۶) را نشان می‌دهند. در حضور نور کالوس‌ها رشد بیشتری از خود نشان دادند. این امر می‌تواند مربوط به تامین بیشتر انرژی و متابولیت‌های مورد نیاز به دلیل رشد اتوتروف افزوده باشد. به علاوه، نور از عوامل بسیار مهم در

بحث

مکانیسم‌های مقاومت به فلزات سنگین و همچنین جذب و انباشت آن در غلظت‌های بسیار زیاد که در گیاهان بیش‌انباشتگر فلزات دیده می‌شود از موضوع‌هایی است که به طور وسیع در حال بررسی است (۲) و استفاده از گیاهان مدل، کمک‌های شایانی به فهم این موضوع نموده است (۱۷). با این حال، ناشناخته‌های بسیاری در این زمینه وجود دارد که با استفاده از راهکارهای مختلف قابل بررسی و استنباط هستند.

در مطالعه حاضر به مطالعه‌هایی در رابطه با مقاومت یک گیاه بیش‌انباشتگر نیکل پرداخته شده است. این گیاه در شرایط طبیعی رویش بر روی خاک‌های غنی از فلز قادر است غلظت بیش از ۱۰۰۰ میکروگرم نیکل را در هر گرم وزن خشک اندام‌های هوایی خود تجمع دهد (۱۸)، غلظتی که اساساً برای بیشتر گیاهان غیر قابل تحمل است. مکانیسم‌های مقاومت در

مکانیسم‌های عامل مقاومت باشد. چندین مکانیسم به طور بالقوه عامل مقاومت بالای این گیاهان به فلز در نظر گرفته می‌شود. حجره‌بندی سلولولی (compartmentation)، وجود ترانسپورترهای زیاد و فعال، تمایز سلولولی و بافتی، غلظت بالای عوامل کی‌لیت‌کننده فلزات در سلول و همچنین فعالیت بودن اجزا سیستم آنتی‌اکسیدانسی مانند آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانسی از این مکانیسم‌ها در نظر گرفته می‌شوند (۱۴، ۲۷ و ۲۸).

تمایز بافت‌های مختلف مانند بافت‌های آوندی در کالوس‌ها تحت اثر نور موضوع گزارش‌های زیادی بوده است (۶ و ۲۹). چنین تمایزهای بافتی ممکن است یکی از علت‌های مقاومت بیشتر مشاهده شده باشد. اثر عوامل محیطی بر تمایز اندامک‌های سلول‌های گیاهی زیاد مطالعه شده است و از مهم‌ترین اندامک‌هایی که تحت اثر نور متمایز می‌شوند کلروپلاست و پراکسیزوم است (۳۰ و ۳۱). کلروپلاست‌ها از اندامک‌های مهم در متابولیسم و مخصوصاً در تولید پیش‌سازهای کربوهیدرات‌ها مانند اسیدهای آلی هستند (۷). اسیدهای آلی مانند مالات و سترات از عوامل کی‌لیت‌کننده فلزات و در نتیجه سم‌زدایی آن‌ها محسوب می‌شوند (۲۷ و ۲۸) و بنابراین تمایز کلروپلاست می‌تواند به این ترتیب بر افزایش مقاومت تأثیر گذاشته باشد. به علاوه کلروپلاست‌ها محل جایگیری ایزوفورم‌هایی از آنزیم SOD نیز هست (۳۲) که این به نوبه خود می‌تواند موجب فعال‌تر شدن سیستم آنتی‌اکسیدانسی سلول‌ها شده باشد. در این بررسی افزایشی در فعالیت کلی آنزیم SOD دیده نشد اما در هر حال بررسی‌ها نشان داده است که فرم آهن‌دار این آنزیم در کلروپلاست فعال است و با تمایز کلروپلاست‌ها این فرم از SOD فعال‌تر می‌شود (۲۳ و ۳۲). توسعه و تمایز پراکسیزوم‌ها تحت نور (۳۳) می‌تواند به خوبی بیانگر افزایش قابل توجه مشاهده شده در فعالیت آنزیم CAT در این مطالعه باشد. این اندامک مرکز انجام واکنش‌های اکسیداتیو در سلول می‌باشد که حاوی ۳ ایزوفورم مختلف آنزیم CAT است و ایزوفورم CAT2 تحت اثر نور در پراکسیزوم افزایش پیدا می‌کند (۳۴).

در این بررسی اندازه‌گیری فعالیت آنزیم‌های CAT، APX و SOD به دو منظور انجام شد. اول، آنزیم‌های مذکور حاوی گروه‌های فلزی آهن، مس، روی و منگنز هستند و از آنجا که غلظت بالای فلزات می‌تواند با تداخل و جایگزینی فلز در عملکرد آنزیم اختلال ایجاد کند، کاهش فعالیت این آنزیم‌ها می‌تواند شاخصی برای حد سمیت فلز افزوده شده به محیط باشد (۲، ۲۳، ۳۵ و ۳۶). نتایج بدست آمده در این بررسی مبتنی بر

تمایز سلولولی به حساب می‌آید. تمایز سلولولی در موارد بسیاری با افزایش اندازه سلول‌ها همراه است (۷). بر این اساس رشد بیشتر کالوس‌های تحت نور می‌تواند نه فقط به دلیل بیشتر بودن تقسیم‌های سلولولی، بلکه به دلیل بزرگتر شدن ابعاد سلول نیز رخ داده باشد.

حضور نیکل در غلظت‌های کمتر از حد سمیت (کمتر از ۳۰۰ میکرومولار) نیز موجب رشد بیشتر کالوس‌ها شده است. این گیاه انباشتگر نیکل محسوب می‌شود و تمایل بالایی به جذب نیکل دارد. ترانسپورترهای مسئول جذب نیکل احتمالاً دارای فعالیت بالا و دائم در این گیاه هستند. این موضوع به دلیل اینکه در برخی دیگر از گیاهان بیش‌انباشتگر فلز مانند *Arabidopsis halleri* که بیش‌انباشتگر فلز روی است ثابت شده است (۱۸)، در اینجا نیز قابل استدلال است. در شرایط حضور نیکل در محیط به دلیل در دسترس بودن سوبسترا برای ترانسپورترهای نیکل، از عملکرد غیراختصاصی آنها جلوگیری شده و رشد بهتر انجام می‌شود. عملکرد غیر اختصاصی ترانسپورترها موجب انتقال سایر فلزات با خصوصیات مشابه، مانند آهن، می‌شود و توزیع سلولولی و بافتی آن‌ها را برهم می‌زند. رشد افزایش یافته گیاهان بیش‌انباشتگر فلز در حضور مقادیر زیاد فلز در محیط در برخی دیگر از گیاهان گزارش شده است (۲۰، ۲۱ و ۲۲). به‌علاوه جذب بالای نیکل به داخل سلول‌ها می‌تواند موجب جذب بیشتر آب و افزایش ذخیره و ساخت کلیتورهای نیکل شده و بنابراین به شکل رشد بیشتر کالوس‌ها نمایان گردد.

نتایج این تحقیق همچنین نشان داد که کالوس‌های حاصل از گیاه بیش‌انباشتگر نیکل همانند گیاه کامل مقاومت بالایی به غلظت‌های زیاد نیکل در محیط کشت دارد. گیاه کامل مقاومتی در حد ۳۰۰ میکرومولار نیکل در محیط ریشه از خود نشان می‌دهد (۲۳). حدود مقاومت کالوس‌ها نیز در همین حدود به دست آمد. بر این اساس، این نکته قابل استنباط است که مکانیسم‌های اصلی مقاومت به نیکل در این گیاه در سطح سلولولی دارای اهمیت می‌باشند و سایر مکانیسم‌های مفروض مانند تسهیم ریشه-بخش‌های هوایی و همچنین تمایزهای بافتی ویژه مانند انباشت نهایی فلز در بافت‌های اپیدرمی (۲۴) و تریکوم‌ها (۲۴، ۲۵ و ۲۶) از فرایندهای ثانویه بوده و نتیجه عملکرد مکانیسم‌های سلولولی و یا نتیجه قواعد فیزیکی-شیمیایی انتقال مواد در گیاه است.

مقاومت بیشتر مشاهده شده در کالوس‌ها تحت اثر نور نسبت به نیکل در محیط کشت می‌تواند ناشی از تحریک هر کدام از

هر حال موجب کاهش فعالیت شده است. اثر سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانتی سلول‌ها در برابر فلزات سنگین تا جایی ادامه دارد که به اشباع شدن ظرفیت سیستم مقاومتی منجر نشود. گذر از مرز مقاومت (در این مطالعه ۳۰۰ میکرومولار) موجب بروز آسیب‌های سلولی از مسیرهای بروز استرس اکسیداتیو و همچنین سایر مسیرها مانند برهم‌کنش‌های فلزات با بیومولکول‌های مختلف می‌شود (۳۴ و ۴۰).

دیدگاه‌های آینده: مقایسه فعالیت آنزیم‌های مذکور با گیاهان هم‌گونه یا هم‌جنس که خصوصیات مقاومت و انباشت فلز را ندارند می‌تواند در تعیین مکانیسم‌های اختصاصی مقاومت راهگشا باشد. استفاده از کالوس‌ها و در ادامه کشت سوسپانسیون سلولی و ایجاد گیاهان تراریخته در ژن‌های مختلف مانند ترانسپورترها و سیستم‌های متابولیکی و آنتی‌اکسیدانتی راه را بر شناخت مکانیسم‌ها و تهیه گیاهان مناسب برای استفاده در تکنولوژی‌های گیاه‌پالایی (phytoremediation)، معدن‌کاری گیاهی (phytomining) و بهبود کیفیت غذایی (biofortification) هموار خواهد نمود.

نتیجه‌گیری

در کالوس‌ها که به عنوان توده‌های سلولی تمایز نیافته در نظر گرفته می‌شوند، مقاومت بالایی شبیه آنچه در گیاهان کامل دیده می‌شود، مشاهده شد. به‌علاوه عواملی مانند نور که تمایزهای سلولی در سطح اندامک‌ها را تحریک می‌کند، موجب افزایش مقاومت به نیکل شد. آنزیم کاتالاز از جمله آنزیم‌هایی است که بر اثر نور در کالوس‌ها افزایش فعالیت پیدا کرد. بر این اساس می‌توان یکی از عوامل توان مقاومتی بالا به نیکل را در این گیاهان به فعالیت بالای کاتالاز نسبت داد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان از مدیریت دانشگاه پیام نور مرکز اصفهان و مدیریت تحصیلات تکمیلی دانشگاه پیام نور استان اصفهان به دلیل فراهم آوردن امکانات این تحقیق تشکر می‌نمایند.

منابع

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

کاهش فعالیت این آنزیم‌ها در حضور غلظت‌های افزایشنده نیکل می‌تواند به دلیل این برهم‌کنش‌های فلزی و عدم عملکرد صحیح آن‌ها باشد. دوم اینکه این آنزیم‌ها از اجزای مهم سیستم آنتی‌اکسیدانتی در گیاه بوده و عامل مقاومت به بسیاری از عوامل استرس‌زای محیطی محسوب می‌شوند (۳۷ و ۳۸). در این مطالعه مشخص شد که نور اثر افزایشنده‌ای هم بر مقاومت به نیکل و هم بر فعالیت آنزیم CAT دارد. آیا آنزیم CAT از عوامل کلیدی مقاومت در این گیاه محسوب می‌شود؟ در این صورت می‌توان با تمرکز بر ایزوآنزیم‌های مختلف آن و بررسی اثر نور بر بیان و فعالیت آن‌ها، رابطه حضور و فعالیت آن‌ها با مقاومت بررسی کرد. CAT ایزوآنزیم‌های سیتوزولی، پراکسیزومی و کلروپلاستی دارد (۳۲ و ۳۴) و این امر با تمایز اندامکی قابل بررسی است.

غلظت‌های بالای نیکل در محیط علاوه بر کاهش فعالیت آنزیم‌های مذکور، کاهش کلروفیل را نیز موجب شد. کاهش غلظت کلروفیل در حضور غلظت بالای فلز به چند دلیل می‌تواند رخ دهد: جانشینی فلز به جای منیزیم و به دنبال آن تجزیه کلروفیل (۳۵)، تخریب کلروفیل و همچنین غشاهای در برگ‌برنده آن بر اثر گونه‌های فعال اکسیژن که در غلظت‌های بالای فلز تولید می‌شود (۳۶)، و جلوگیری از بیوسنتز کلروفیل با مهار آنزیم‌هایی مانند گاما آمینو لوالونیک اسید دهیدروژناز و پروتوکلروفیلید ردوکتاز (۳۹).

با بررسی و مقایسه نتایج مطالعه‌های انجام شده در رابطه با میزان فعالیت سیستم‌های آنتی‌اکسیدانتی اعم از آنزیمی شامل آنزیم‌های CAT، APX، SOD، GR (گلوکاتایون ردوکتاز) و ... و همچنین غیر آنزیمی شامل ترکیبات آسکوربیک اسید، گلوکاتایون، فیتوکلکاتین و ... (۱۴، ۲۸، ۳۶، ۳۸ و ۴۰) مشخص می‌شود که علی‌رغم بالاتر بودن فعالیت سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانتی در گیاهان مقاوم در برابر فلزات سنگین، اما همواره الگوی مشخص افزایش یافته‌ای در مورد همه اجزا این سیستم وجود ندارد. به عبارت دیگر آنزیم ویژه‌ای که در همه گیاهان و در پاسخ به همه فلزات سنگین همواره افزایش فعالیت نشان دهد وجود ندارد. نتایج پژوهش حاضر نیز نشان داد که افزایش مقاومت به نیکل در کالوس گیاه بیش‌انباشتگر نیکل، *A. inflatum* در مورد آنزیم‌های مختلف الگوی افزایش فعالیت همه جانبه نشان نمی‌دهد چنانچه در نور کاتالاز با افزایش فعالیت و آنزیم‌های SOD و APX بدون تغییر بوده و نیکل در

2. Krämer U. Metal Hyperaccumulation in Plants. *Ann. Rev. Plant Biol.* 2010; 61:517-34.
3. Anacker BL, Whittall JB, Goldberg EE, Harrison SP. Origins and consequences of serpentine endemism in the California. *Evolution*.2010; 65(2): 365-376.
4. Brady KU, Kruckeberg AR, Bradshaw HD. Evolutionary ecology of plant adaptation to serpentine soils. *Annu. Rev. Ecol. Evol. System.*2005; 36: 243-266.
5. Kazakou E, Dimitrakopoulos PG, Baker AJM, Reeves RD, Troumbis AY. Hypothesis, mechanisms and trade-offs of tolerance and adaptation to serpentine soils: from species to ecosystem level. *Biol. Rev.* 2008; 83: 495-508.
6. Neumann KH, Kumar A, Imani J. Plant cell and tissue culture- A tool in biotechnology basics and application. Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, 2009, 333pp.
7. Taiz L, Zeiger E. Plant physiology, Sinauer Associates, INC. Sunderland, 2002; 680 pp.
8. Reeves R.D. The hyperaccumulation of nickel by serpentine plants. In: Baker AJM, Proctor J, Reeves RD. (eds.), *The vegetation of ultramafic (serpentine) soils.* 1992; 253-277, Intercept, Andover, Hampshire, UK.
9. Pollard AJ, Powell KD, Harper FA, Smith JAC. The genetic of metal hyperaccumulation in plants. *Critic. Rev. Plant Sci.* 2002; 21(6): 539-566.
10. Burrell AM, Hawkins AK, Pepper AE. Genetic analyses of nickel tolerance in a North American serpentine endemic plant, *Caulanthus amplexicaulis* var. *barbarae* (Brassicaceae). *Am. J. Bot.* 2012; 99(11):1875-1883.
11. Lichtenthaler HK, Buschmann C. Chlorophylls and carotenoids: Measurement and Characterization by UV-VIS Spectroscopy. *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*, John Wiley & Sons, Inc. 2001; F4.3.1-F4.3.8.
12. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*1976; 72: 248-254.
13. Nakano Y, Asada K. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant Cell Physiol.* 1981; 22: 867-880.
14. Boominathan R, Doran PM. Ni-induced oxidative stress in roots of the Ni hyperaccumulator, *Alyssum bertolonii*. *New Phytol.*2002; 156: 205-215.
15. Aebi HE. Catalase in vitro. *Methods Enzymol.* 1983; 105: 121-126.
16. Giannopolities CN, Ries SK. Superoxide dismutase. I. Occurrence in higher plants. *Plant Physiol.*1997; 59: 309-314.
17. Hanikenne M, Talke IN, Haydon MJ, Lanz C, et al. Evolution of metal hyperaccumulation required cis-regulatory changes and triplication of HMA4. *Nature.*2008; 453: 391-396.
18. Ghaderian SM, Mohtadi A, Rahiminejad R, Reeves RD, et al. Hyperaccumulation of nickel by two *Alyssum* species from the serpentine soils of Iran. *Plant Soil.*2007; 293: 91-97.
19. Vinterhalter B, Savic J, Platisa J, Raspor M, et al. Nickel tolerance and hyperaccumulation in shoot cultures regenerated from hairy root cultures of *Alyssum murale* Waldst. & Kit. *Plant Cell Tissue Organ Cult.*2008; 94(3): 299-303.
20. Krämer U, Cotter-Howells JD, Charnock JM, Baker AJM, et al. Free histidine as a metal chelator in plants that accumulate nickel. *Nature.*1996; 379(6566): 635-638.
21. Ingle RA, Mugford ST, Rees JD, Campbell MM, et al. Constitutively high expression of the histidine biosynthetic pathway contributes to nickel tolerance in hyperaccumulator plants. *Plant Cell.*2005; 17: 2089-2106.
22. Whiting SN, Leake JR, McGrath SP, Baker AJM. Positive responses to Zn and Cd by roots of the Zn and Cd hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. *New Phytol.*2000; 145: 199-210.
23. Ghasemi R, Ghaderian SM, Krämer U. Interference of nickel with copper and iron homeostasis contributes to metal toxicity symptoms in the nickel hyperaccumulator plant *Alyssum inflatum*. *New Phytol.*2009; 184(3): 566-580.
24. Berazain R, de la Fuente V, Rufo L, Rodriguez N, et al. Nickel localization in tissues of different hyperaccumulator species of Euphorbiaceae from ultramafic areas of cuba. *Plant Soil.*2007; 293(1): 99-106.
25. Ghasemi R, Ghaderian SM, Krämer U. Accumulation of nickel in trichomes of a nickel hyperaccumulator plant, *Alyssum inflatum*. *Northeast.Natural.*2009; 16: 91-92.
26. Broadhurst CL, Chaney RL, Angle JA, Mangel TK, et al. Simultaneous hyperaccumulation of nickel, manganese and calcium in *Alyssum* leaf trichomes. *Environ. Sci. Technol.*2004; 38: 5797-5802.
27. Hall JL. Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance. *J. Exp. Bot.*2002; 53(366): 1-11.

28. Clemens S. Toxic metal accumulation, responses to exposure and mechanisms of tolerance in plants. *Biochimie*.2006; 88: 1707-1719.
29. Bhojwani SS, Razdan MK. Plant tissue culture, theory and practice, a revised edition. Elsevier, The Netherlands, 1996; 767pp.
30. Casal JJ, Yanovsky MJ. Regulation of gene expression by light. *Int. J. Dev. Biol.*2005; 49: 501-511.
31. Kaur N, Reumann S, Hu J. Peroxisome Biogenesis and Function, *The Arabidopsis Book*, 7, e0123.2009; Doi: 10.1199/tab.0123.
32. Mittler R, Vanderauwera S, Gollery M, Van Breusegem F. Reactive oxygen gene network of plants. *Trends in Plant Science*.2004; 9: 490-498.
33. Desai M, Hu J. Light induces peroxisome proliferation in Arabidopsis seedlings through the photoreceptor phytochrome A, the transcription factor HY5 HOMOLOG, and the peroxisomal protein PEROXIN11b. *Plant Physiol.*2008; 146: 1117-1127.
34. McClung CR. Regulation of catalases in Arabidopsis. *Free Radic. Biol. Med.* 1997; 23(3): 489-496.
35. Küpper H, Küpper F, Spiller M. In situ detection of heavy metal substituted chlorophylls in water plants. *Photosynth.Res.*1998; 58(2): 123-133.
36. Dietz KJ, Baier M, Krämer U. Free radicals and reactive oxygen species as mediators of heavy metal toxicity in plants. In: Prasad, M.N.V. and Hagemeyer, J. (eds), *Heavy metal stress in plants*. Berlin, Germany: Springer,1999, 73-97.
37. Davies KJA. Oxidative stress, antioxidant defenses, and damage removal, repair, and replacement systems, *IUBMB Life*.2001; 50(4-5): 279-289.
38. Hossain MA, Piyatida P, Teixeira da Silva JA, Fujita M. Molecular mechanism of heavy metal toxicity and tolerance in plants: central role of glutathione in detoxification of reactive oxygen species and methylglyoxal and in heavy metal chelation. *J. Bot.* 2012, 37 pp. doi:10.1155/2012/872875.
39. Stobart AK, Griffiths WT, Ameen-bukhari I, Sherwood RP. The effect of Cd⁺² on the biosynthesis of chlorophyll in leaves of barley. *Physiol. Planta*.1985; 63(3): 293-298.
40. Manara A. Plant responses to heavy metal toxicity. In: Furini, A. (eds). *Plants and heavy metals, Briefs in biometals*. Berlin, Germany: Springer; 2012; 27-53.

Change of Ni Tolerance Parameters by Light in Calli of a Ni Hyperaccumulator Plant *Alyssum inflatum*

Ghasemi R. Ph.D.^{1*}, Samie R. M.Sc.²

1. Department of Biology, Faculty of Sciences, University of Payame Noor, Tehran, Iran

2. Department of Biology, Faculty of Sciences, University of Payame Noor, Center of Isfahan

* Email corresponding author: rsl_ghsm@yahoo.com

Received: 1 Agu. 2012

Accepted: 11 Dec. 2012

Abstract

Aim: *Alyssum inflatum* is an endemic of serpentine soils from western Iran and hyperaccumulates Ni. In this study, to investigate the mechanisms involved in the tolerance of high concentrations of Ni, a callus culture method was used to have a system with lower complexities in organ and tissue organization in compare to a whole plant.

Material and methods: Calli were proliferated on MS medium containing of 1.5 and 0.1mg/l 2,4-D and kinetin respectively, treated by different concentrations of Ni(0,100, 200,300,400, 500 and 600)in light and dark conditions and different tolerance parameters including of growth, chlorophyll content and the activity of antioxidant enzymes were measured.

Results: The results showed that light both stimulates growth and higher Ni tolerance in calli. Among the other measured parameters, a positive relation was observed between increased tolerance and activity of catalyses while in that condition there were no increased activities in superoxide dismutase and ascorbate peroxides.

Conclusion: Tissue culture methods could be used for study the tolerance of plants, avoiding of tissue and organ complexities. Conclusions from the current study based on the increment of tolerance observed at light, suggest the effect of cell differentiation on tolerance. The results of such simple systems could be reasonably extended to the whole plant.

Key words: *Alyssum*, Callus, Nickel, Tolerance