Archive of SID

مقاله پژوهشی

مجله علمی پژوهشی سلول و بافت
جلد ۱، شماره ۲، زمستان ۱۳۸۹، ۲۰-۹

تأثیر عناصر سنگین بر آناتومی، برخی فلاونوئیدها و نیتروتوکسین‌های برگ *Coronilla varia* L. در کشت هیدروپونیک

فریبا امینی Ph.D.[1*]، میترا نوری Ph.D.[1]، مونا فروغی. دانشجوی M.Sc.[2]

۱- دانشگاه اراک، دانشکده علوم، گروه زیست شناسی، کد پستی ۳۸۱۵۶-۸-۸۳۴۹
۲- دانشجوی کارشناسی ارشد فیزیولوژی گیاهی
* پست الکترونیک نویسنده مسئول: F-Amini@araku.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۳۸۹/۱۱/۱۲ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۰/۲/۲۵

چکیده

هدف: در این پژوهش اثر دو عنصر روی و نیکل بر آناتومی برگ و دو نوع متابولیت ثانویه برگ (فلاونوئیدها و نیتروتوکسین‌ها) در گیاه یونجه تاجی مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها: گیاهان ۴۰ روزه که به مدت ۲۴ و ۷۲ ساعت در شرایط هیدروپونیک در تنش با غلظت‌های ۰، ۷/۵، ۱۵، ۲۲/۵ و ۳۰ میلی‌مولار کلرید روی و ۰، ۲/۵ ، ۵ ، ۷/۵ و ۱۰ میلی‌مولار کلرید نیکل قرار گرفته بودند برداشت و آناتومی برگ‌ها بررسی گردید. مطالعه فلاونوئیدها به دو روش کروماتوگرافی دو بعدی و کروماتوگرافی لایه نازک صورت گرفت. همچنین میزان نیتروتوکسین‌ها با استفاده از اسپکتروفتومتر اندازه گیری گردید. داده‌ها با نرم افزار SPSS آنالیز گردید و مقایسه میانگین‌ها بر اساس روش Dunkan انجام گرفت.

نتایج: نتایج به دست آمده، تغییر در آناتومی برگ گیاهان تحت تنش را نشان داد. تغییرات شدید انواع فلاونوئیدها همراه با افزایش در میزان کل فلاونوئیدها نیز در تنش روی و نیکل مشاهده شد. نتیجه دیگری که حاصل شد، افزایش معنی‌دار نیتروتوکسین در طی تنش با عناصر سنگین به کار برده شده بود.

نتیجه گیری: احتمالاً گیاه ***Coronilla varia L.*** با افزایش و تغییر در میزان فلاونوئیدها و افزایش مقدار نیتروتوکسین‌ها تا حدی توانسته است در مقابل آسیب ناشی از تنش عناصر سنگین روی و نیکل مقاومت نماید.

واژگان کلیدی: آناتومی، فلاونوئیدها، کلرید روی و نیکل، نیتروتوکسین‌ها، یونجه تاجی

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

عناصر سنگین دسته‌ای از آلوده کننده‌های محیطی می‌باشند که میزان آنها با پیشرفت صنعت روز به روز در حال افزایش است. ورود این آلاینده‌ها به درون اکوسیستم زمین به عنوان یک خطر جدی برای حیات اکوسیستم به شمار می‌آید(۱). میزان ورود این عناصرسنگین به داخل محیط زیست، بسیار فراتر از میزانی است که به وسیله فرآیندهای طبیعی برداشت می‌شوند. بنابراین تجمع این عناصردر محیط زیست که ماندگاری طولانی مدت و تقریباً دائمی نیز در محیط داشته سلامت انسان را به مخاطره می‌اندازد و مواجهه انسان با بعضی از آن‌ها از طریق آب و مواد غذایی می‌تواند مسمومیت‌های مزمن و حاد و خطرناکی ایجاد نماید(۲). گیاهان بامکانیسم‌های مختلفی در برابر این عناصر مقاومت می‌نمایند. تغییر در مورفولوژی برگی در گیاهان تحت تنش می‌تواند به عنوان مزیت سازشی مطرح شود که برگ‌ها را قادر می‌سازد تا بتوانند زندگی خود را در برابر تنش حفظ بنمایند. نیکل موجب بروز کلروز در برگ می‌گردد که در نهایت به صورت نکروز ادامه یافته و سپس برگ به طور کامل تیره می‌شود (۳). کاهش در میزان آب نسبی گیاه (۴)، کاهش سطح برگ و شدت تعرق، به علت زیادی عناصر سنگین در محیط کشت می‌باشد که جذب و انتقال آب را کاهش می‌دهد(۵) و می‌تواند بر سیستم فتوسنتزی نیز اثر گذارد (۶). در نتیجه در طی تنش با عناصر سنگین، گیاهان به سوی پژمردگی رفته و به طور کلی با کاهش جذب آب، تعداد روزنه‌ها را در برگ افزایش می‌دهند. مشخص شده است که عناصر سنگین ساختار اپیدرمی را تغییر می‌دهند و می‌توانند سبب کاهش اندازه سلول، افزایش کوتیکول، تعداد روزنه و کرک و همچنین کاهش اندازه سلول‌های نگهبان شوند (۷).

گیاهان انواع شگفت انگیزی از متابولیت‌های ثانویه را دارا هستند. یکی از مهم‌ترین متابولیت‌های ثانویه، فلاونوئیدها هستند. افزایش متابولیسم فلاونوئیدها و مقدار ترکیبات فنلیکی می‌تواند تحت فاکتورهای محیطی مختلف و شرایط تنشی مشاهده شود. افزایش فلاونوئیدهای محلول مانند آن‌هایی که در بیوسنتز لیگنین دخالت می‌کنند می‌توانند منجر به تغییر در آناتومی در طی تنش شوند(۸). فلاونوئیدها همچنین موجب افزایش در پایداری دیواره سلولی و ایجاد مانع فیزیکی برای حفاظت سلول‌ها در مقابل عملکرد مضر عناصر سنگین می‌شوند. در سال‌های اخیر خواص آنتی‌اکسیدانی فلاونوئیدها بیشتر مورد توجه است (۹). فعالیت آنتی‌اکسیدانی آن‌ها به طور عمده مربوط به خاصیت احیایی آن‌هاست که اجازه می‌دهد به عنوان عوامل احیایی، دهندهٔ هیدروژن، برطرف‌کننده‌های اکسیژن منفرد و همبند شوندگان با عناصر عمل کنند (۱۰). گزارشات بسیار زیادی، القاء انباشتگی ترکیبات فنلیکی و فعالیت پراکسیدازها در گیاهان تیمار شده با غلظت بالای عناصر را نشان می‌دهند. فلاونوئیدها دارای گروه‌های هیدروکسیل و کربوکسیل هستند که قادرند به طور اختصاصی به عناصر سنگین باند شوند (۱۱). ریشه‌های بسیاری از گیاهان در معرض عناصر سنگین، میزان بالای تولید فلاونوئیدها را دارند (۱۲). نتایج تیمار با عناصر سنگین در گیاه *Phaseolus vulgaris* افزایش قابل توجه در فلاونوئیدها را نشان داد. به طور کلی تصور می‌شود فلاونوئیدها از آسیب اکسیداتیو با جاروب کردن انواع اکسیژن واکنش‌گر و شکستن واکنش‌های زنجیری رادیکالی در طی پروکسیداسیون لیپیدی جلوگیری می‌کنند. این اثرات اکسیداتیوی نیاز به شکل احیاء شده فلاونوئیدها دارد و شکل اکسید شده آن‌ها تنها به عنوان پرواکسیدانت عمل می‌کند (۱۰). مطالعات فلاونوئیدهای برگ ۶ گونه لگوم آلوده به آلاینده های فلوئورایدی با استفاده از روش کروماتوگرافی نشان داد که تغییر در تعداد، مقدار و نوع فلاونوئیدهای گیاهان آلوده نسبت به شاهد رخ می‌دهد و تغییر ترکیبات فلاونوئیدی می‌تواند در پاسخ به تنش آلودگی و نوعی سازش با شرایط نامساعد محیطی باشد (۱۳).

نیتروتوکسین‌ها یا نیتروگلوکوزیدها ترکیبات نیتروژن‌دار آلیفاتیک سمی می‌باشند که از لحاظ شیمیایی و ساختاری، استرهای گلوکز ۳-نیترو۱-پروپیونیک اسید هستند که در برخی از لگوم‌ها مانند *Coronilla varia* یافت شده‌اند. سمیت *Coronilla* ناشی از وجود ۳- نیتروپروپیونیک اسید در آن است. تنش‌های فیزیولوژیکی سبب افزایش غلظت گلکوزیدهای سمی در گیاهان می‌شود و این افزایش غلظت می‌تواند به دلیل تنش آب یا کمبودهای تغذیه‌ای باشد. تنش آبی در گیاهان سبب افزایش سمیت در آن‌ها می‌شود و تنش خشکی در *Cyperus rotundus* L. سبب افزایش متابولیت‌های ثانویه سمی در ریشه می‌گردد (۱۴). بر مبنای تحقیقات نوری و همکاران(۱۵) گیاهانی که در مناطق خشک و بیابانی بوده و یا آبیاری نمی‌شوند غلظت بالایی از ترکیبات نیتروتوکسین را دارا می‌باشند. آبیاری با رطوبت کافی میزان نیتروتوکسین‌ها را در گیاهان کاهش می‌دهد. بنابراین به نظر می‌رسد ترکیبات نیتروژنی در شرایط خشک و بی آبی، نقش دفاعی برای گیاه داشته باشند. همچنین لگوم‌های جمع آوری شده از مناطق تحت

www.SID.ir

Archive of SID

تأثیر آلاینده های فلوئورایدی وجود نیتروتوکسین‌ها را در گیاهان آلوده نسبت به گیاهان شاهد نشان دادند (۱۶).

یونجه‌تاجی از خانواده نخود(Leguminosae) متعلق به زیر خانواده Papilionaideae می‌باشد. از آنجا که گیاه یونجه‌تاجی برای کنترل فرسایش خاک به کار می‌رود در صورتی که این گیاه بتواند در برابر تنش عناصر سنگین نیز مقاومت نماید می‌توان از این گیاه در مناطق آلوده به این عناصر نیز استفاده نمود. لذا این تحقیق با هدف بررسی تأثیر دو عنصر سنگین نیکل و روی برآناتومی، ترکیبات فلاونوئیدی و نیتروتوکسین‌ها در گیاه یونجه تاجی طراحی و انجام گردید.

مواد و روش‌ها

کشت بذر و تیمار با عناصر نیکل و روی: بذرهای یونجه تاجی(*Coronilla Varia* L.) از شرکت پاکان بذر اصفهان تهیه گردید. کشت بذر در گلدان با نسبت ۱:۱ خاک کشاورزی به پرلیت کشت گردید. پس از کشت ۲۰ بذر در هر گلدان، آنها با محلول یک دوم هوگلند (۱۷) آبیاری و در اتاق کشت با دمای ۲ ± ۲۵ درجه سانتی‌گراد و فتوپریود ۱۶/۸ ساعت و نور ۳۰۰۰ لوکس نگهداری گردیدند. در مراحل اولیه گلدان‌ها هر ۲ روز یکبار با آب مقطر آبیاری شده و در مراحل بعد از جوانه‌زنی (بعد از ۲ هفته از کشت بذر) هفته‌ای یکبار با محلول ۱/۲هوگلند و یک بار با آب مقطر آبیاری شدند. برای انجام تیمار فلزات سنگین، گیاهان ۴۰ روزه با دقت کامل از خاک مرطوب خارج و ریشه گیاهان چندین مرتبه با آب مقطر شستشو گردیدند. سپس این گیاهان در لوله‌های اپندرفی که انتهای آن‌ها بریده شده بودند قرار گرفتند و در ظرف‌هایی با اندازه ۳۰ در ۱۵ سانتی‌متری و با ارتفاع ۲۰ سانتی‌متر حاوی محلول ۱/۲ هوگلند به عنوان شاهد و ۱/۲ هوگلند همراه با غلظت های ۲/۵، ۵، ۷/۵ و ۱۰ میلی‌مولار کلرید نیکل و ۷/۵ ، ۱۵، ۲۲/۵ و ۳۰ میلی‌مولار کلرید روی قرار داده شدند. برای انجام تهویه مناسب نیز از پمپ هوا استفاده شد.گیاهان منتقل شده به شرایط هیدروپونیک در همان شرایط دمایی و فتوپریود مذکور قرار داده شد و پس از ۲۴ و ۷۲ ساعت گیاهان در دو مرحله جهت آنالیزهای مورد نظر برداشت گردیدند.

مطالعه آناتومی برگ: اپیدرم سطح رویی و زیرین برگ‌ها بر مبنای روش Widuri و همکاران (۱۸) با تهیه اسلایدهای نیمه دایمی مطالعه از آنها به وسیله میکروسکوپ مونیتورینگ مدلLeica Galen III عکس مناسب تهیه شد. دهانه روزنه‌ها در اپیدرم‌های زیری و رویی برگ به کمک گراتی کیول اندازه گیری و ثبت گردید.

مطالعه فلاونوئیدهای برگ: بررسی و شناسایی فلاونوئیدها با روش کروماتوگرافی کاغذی به دو روش دو بعدی و لایه نازک به شرح زیر انجام گردید.

تهیه عصاره از گیاهان: به ۰/۱ گرم برگ‌های خرد شده هر یک از نمونه‌ها ۵ میلی‌لیتر الکل اتیلیک ۷۰ درصد افزوده شد و در حمام آب گرم ۸۵ درجه سانتی‌گراد به مدت دو دقیقه جوشانده و ۲۴ ساعت در محیط آزمایشگاه قرار داده شد. عصاره برگ‌ها در ظرف‌های جداگانه‌ای صاف شده و اجازه داده شد تا در دمای اتاق تبخیر شوند.

کروماتوگرافی کاغذی دو بعدی (Two-dimensional Paper chromatography): به تعداد نمونه گیاهی کاغذ کروماتوگرافی واتمن NO-1 به ابعاد ۲۳ در ۲۸/۵ سانتی‌متر بریده و تا زده شد. سپس روی خط دوم به فاصله ۷ سانتی‌متری از سمت راست کاغذ، نقطه‌هایی را با مداد برای گذاشتن لکه نمونه علامت‌گذاری کرده و در سمت چپ کاغذ محل قرار گرفتن معرف روتین (Rutin) روی کاغذ کروماتوگرافی علامت‌گذاری شد. به هر شیشه ساعت محتوی عصاره ۰/۵ میلی‌لیتر الکل اتیلیک ۷۰ درصد اضافه و سپس به کمک لوله موئینه (هماتوکریت آبی) کمی از این محلول روی نقطه مشخص شده روی کاغذ قرار داده شد. به موازات این کار به وسیله لوله موئینه‌ای در قسمت سمت چپ کاغذ کروماتوگرافی معرف روتین را قرار داده و دو تا سه بار این کار تکرار گردید.

نیمه استوانه‌های کروماتوتانک مشابه شاندون بزرگ را با محلول BAW (بوتانول، اسید استیک و آب ۵:۱:۴) پر کرده سپس کروماتوگرام‌ها را داخل محلول گذاشته تا محلول به آرامی به طرف پایین حرکت کند (کروماتوگرافی نزولی). وقتی محلول به حدود ۱/۵ تا ۲ سانتی‌متری لبه انتهایی کاغذ رسید، کاغذها از حلال خارج و به مدت ۸ تا ۱۵ ساعت زیر هود آویخته تا کاملاً خشک شود. سپس کروماتوگرام‌ها را در نور UV با طول موج ۳۶۶ نانومتر مطالعه و اندازه و محل لکه‌ها علامت‌گذاری گردید. محل انتهای حرکت حلال را هم مشخص کرده تا در محاسبه RF (فاصله حرکت لکه بر کل فاصله) هر لکه مورد استفاده قرار

www.SID.ir

Archive of SID

گیرد. سپس کروماتوگرام‌ها را از لبه ۷ سانتی‌متری مجدداً تا زده و این بار در کروماتوتانک حاوی اسید استیک ۱۵ درصد قرار گرفتند، پس از رسیدن حلال به ۲-۱/۵ سانتی‌متری انتهای کاغذ، آن‌ها را بیرون آورده و به مدت ۲۴ ساعت زیر هود قرار داده شدند تا کاملاً خشک گردند. مجدداً کروماتوگرام‌ها در نور UV ۳۶۶ نانومتر مطالعه و علامت‌گذاری انجام گردید. مقدار RF برای هر لکه در BAW و اسید استیک ۱۵٪ (HOAc) محاسبه و در جدول ثبت شد (۱۹).

کروماتوگرافی لایه نازک (Thin layer chromatography): عصاره‌های باقیمانده از مرحله قبلی را در ۱/۵ میلی‌لیتر اتانول ۷۰ درصد حل کرده و ۲ میلی‌لیتر اسید کلریدریک ۲ مولار به هر یک از نمونه‌ها اضافه شده و به مدت نیم ساعت در حمام آب گرم ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند تا به طور کامل هیدرولیز گردیدند. پس از سرد شدن، ۲ میلی‌لیتر اتیل استات ۱۰۰ درصد به هر لوله اضافه کرده تا دو فاز تشکیل گردید. فاز رویی با کمک پی‌پت پاستور جدا و تبخیر گردید. سپس ۰/۵ میلی‌لیتر اتانول ۷۰ درصد به هر یک از آن‌ها اضافه کرده و از عصاره حاصل برای TLC استفاده شد. کاغذهای کروماتوگرافی لایه نازک سلولزی Art. 5565 Dc- plastic Folien cellulose F Merck 6412 3064 به ابعاد مناسب بریده و به وسیله لوله فوق موئینه از عصارهٔ گیاهان تیمار شده و شاهد و معرف‌های فلاونوئید (تهیه شده از مرک، سیگما و فلوکا) شامل میرستین (Myricetin)، کوئرستین (Quercetin)، کامفرول (Kaempferol)، روتین، ویتکسین (Vitexine) و رامنتین (Rhamnetine) روی آن‌ها لکه‌گذاری شد. پس از خشک شدن کروماتوگرام‌ها آن‌ها را در کروماتوتانک‌های حاوی سه نوع حلال CAW (کلروفرم، اسید استیک و آب ۲:۱۵:۳۰) فروستال (اسید کلریدریک، آب و اسید استیک ۳:۱۰:۳۰) و BAW (بوتانل اسید استیک و آب ۵:۱:۴) گذاشته شد. هرحلال را درکروماتوتانک جداگانه ریخته به طوری‌که ارتفاع حلال یک سانتی‌متر بود. سپس کاغذها داخل کروماتوتانک ها قرار داده شدند. وقتی حلال تا یک سانتی‌متر مانده به انتهای کاغذ بالا آمد، کاغذها خشک شده و در نور UV در طول موج ۳۶۶ نانومتر اندازه و رنگ لکه‌ها با مداد مشخص شد. مقدار RF (فاصله حرکت لکه بر کل فاصله) برای هر لکه در BAW، فروستال و CAW محاسبه و اندازه RF استانداردهای میرستین، کوئرستین، روتین و کامفرول، ویتکسین و رامنتین مقایسه گردید و نوع هر لکه مشخص شد.

آزمایش تعیین کمی نیتروتوکسین‌ها: جمع‌آوری و خشک نمودن برگها و تعیین کمی نیتروتوکسین‌های آلیفاتیک بر مبنای روش بیان شده در منابع انجام گرفت (۲۰ و ۲۱). ۰/۰۲ گرم از برگ‌های خشک هر سری گیاه در ۲ لوله آزمایش به صورت پودر درآمدند. لوله شماره یک به عنوان شاهد و لوله شماره ۲ به عنوان نمونه آزمایشی در نظر گرفته شد. به هر ۲ لوله مقدار ۱ میلی‌لیتر اسید کلریدریک ۱ نرمال اضافه گردیده و به مدت ۲ ساعت در محیط آزمایشگاه قرار داده شدند. سپس ۱ میلی‌لیتر پتاس ۲۰ درصد به هر یک از لوله‌ها اضافه و به مدت ۲ ساعت در محیط آزمایشگاه قرار گرفتند. به لوله شاهد، ۲ میلی‌لیتر اسید استیک گلاسیال افزوده و به لوله نمونه، ابتدا ۱ میلی‌لیتر اسید استیک گلاسیال و فوراً ۱ میلی‌لیتر معرف Griess-llosvay اضافه شد. در صورت وجود ترکیبات نیتروتوکسین، ظهور فوری رنگ از صورتی تا قرمز تیره قابل مشاهده است. بیشترین مقدار رنگ ۳ دقیقه پس از افزودن معرف مشاهده می‌شود. به هر یک از لوله‌های آزمایش برحسب شدت رنگ، اعداد ۱ تا ۵ داده می‌شود که این مقدار به طور تقریبی بیان‌گر میزان نیتروتوکسین‌ها برحسب NO_2 mg/g وزن خشک می‌باشد. این اعداد برابر ۴-۱=۱ ، ۸-۴=۲، ۱۳-۹=۳ ، ۱۹-۱۴=۴ و ۲۵-۲۰=۵ می‌باشند (۱۵).

اندازه گیری طیف جذبی نمونه‌ها: محلول حاصل از مرحله قبل را به وسیله کاغذ صافی صاف کرده و میزان جذب هر یک از لوله‌ها در طول موج ۴۰۰-۸۰۰ نانومتر به کمک دستگاه اسپکتروفتومتر مدل CE 4400 UV VIS DOUBLE BEAM SCANNING SPECTROPHOTOMETER خوانده شد و نتایج ثبت گردید.

آنالیزهای آماری در این تحقیق: جهت آنالیز داده‌ها از نرم افزار SPSS نسخه ۱۵، مقایسه میانگین ها از تست دانکن و رسم نمودارها از نرم افزار Excel استفاده گردید.

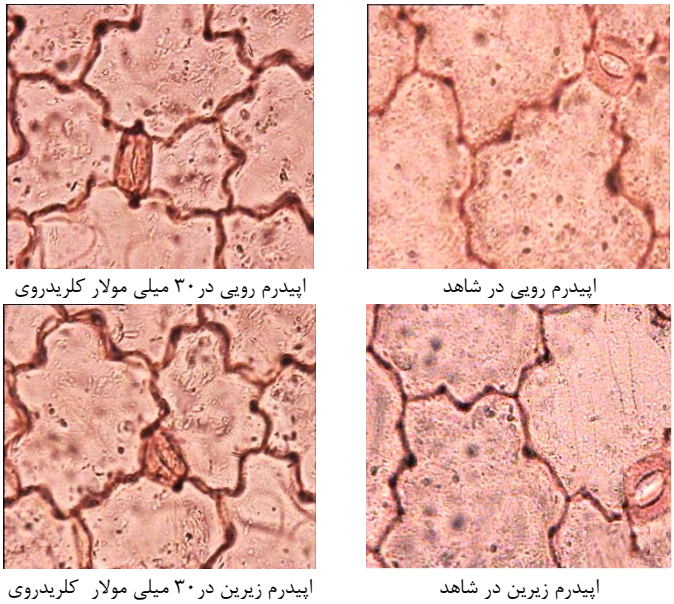
www.SID.ir

Archive of SID

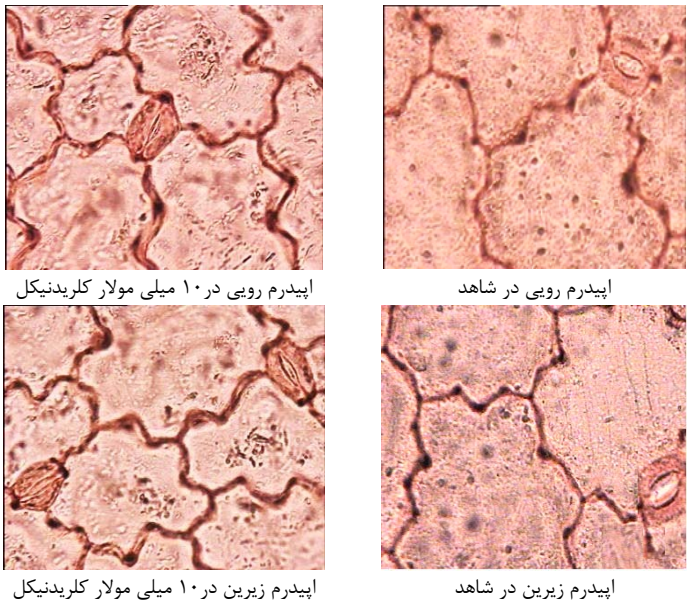
نتایج

تغییرات آناتومی برگ در تیمار با غلظت‌های مختلف $ZnCl_2$ و NiCl2:

اپیدرم رویی و زیرین گیاه یونجه تاجی تیمارشده با غلظت‌های متفاوت نیکل و روی به مدت ۷۲ ساعت مورد بررسی قرار گرفت (شکل ۱ و۲). در بررسی آناتومی برگ گیاهان شاهد و تیمارها نشان داده شد که دیواره سلول‌های اپیدرمی با افزایش غلظت تیمار افزایش چین خوردگی را نسبت به شاهد نشان داد (داده‌ها نشان داده نشده است). میزان باز بودن دهانه روزنه هوایی نیز تحت تأثیر تنش عناصر سنگین قرار گرفت. آنالیز داده‌های اندازه دهانه روزنه نشان داد که با افزایش غلظت تیمار باز بودن دهانه روزنه به طور معنی‌داری کاهش یافت و در غلظت‌های بالاتر تیمار این کاهش منجر به بسته شدن کامل دهانه روزنه شد. بالاترین اندازه دهانه روزنه هوایی مربوط به گیاه شاهد بود (شکل ۳).



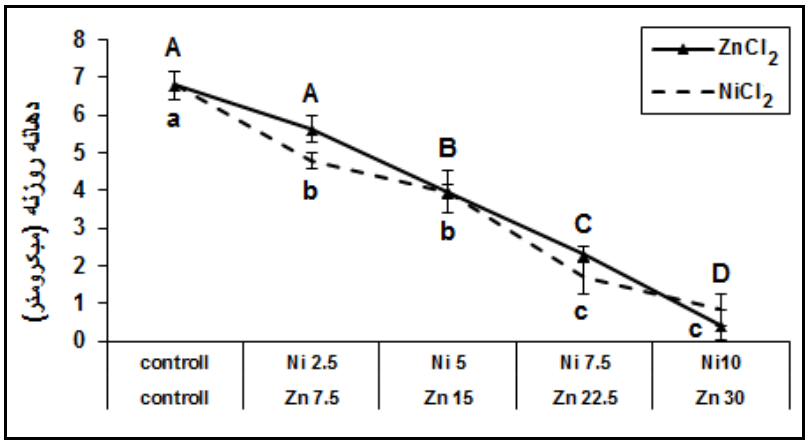
شکل ۱: اپیدرم رویی و زیرین برگ گیاه در ۷۲ ساعت تیمار با غلظت‌های متفاوت کلریدروی (بزرگنمایی ۴۰).



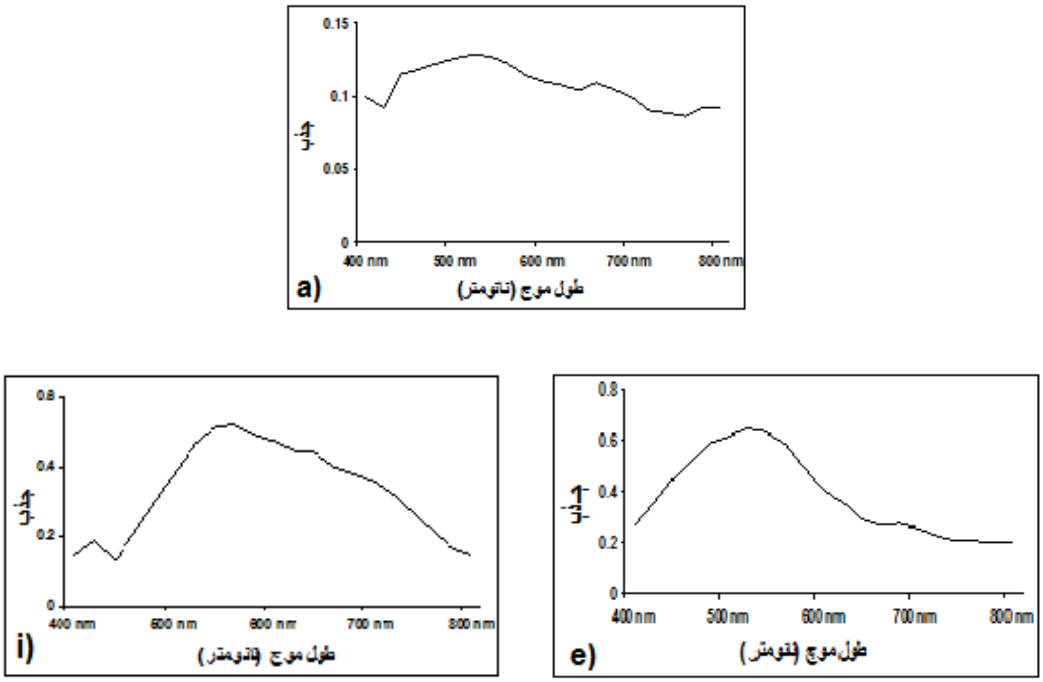
شکل ۲: اپیدرم رویی و زیرین برگ گیاه در ۷۲ ساعت تیمار با غلظت‌های متفاوت کلریدنیکل (بزرگنمایی ۴۰).

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۳: تأثیر عناصر سنگین روی و نیکل با غلظت های مختلف در ۷۲ ساعت تیمار بر اندازه گشودگی روزنه در گیاه یونجه‌تاجی. حروف نامشابه در هر زمان نشان‌دهنده معنی‌دار بودن در غلظت‌های مختلف می باشد. داده‌ها میانگین ± انحراف معیار می‌باشند



شکل ۴: طیف جذبی نیتروتوکسین در طول موج ۴۰۰ تا ۸۰۰ نانومتر در شاهد (a)، تیمار با غلظت ۳۰ میلی مولار کلرید روی (e) و ۱۰ میلی مولار کلرید نیکل (i).

بررسی میزان فلاونوئیدها در تیمار با غلظت‌های مختلف $ZnCl_2$ و $NiCl_2$:

مطابق جداول ۱ و ۲ نتایج اندازه‌گیری فلاونوئید نشان داد که در برگ گیاهان یونجه تاجی که در تیمار با کلرید روی و کلرید نیکل با غلظت‌های مختلف قرار گرفته بودند، تعداد فلاونوئید کل (NTF) با افزایش غلظت تیمار در هر دو زمان ۲۴ و ۷۲ ساعت پس از تیمار به طور معنی‌داری افزایش یافت. Flavone C& *C/O*-glycosides و Flavonoid sulfates نیز در تمام غلظت‌های تیمار با روی و نیکل و همچنین گیاه شاهد دیده شد. فلاونوئید Aglycone نیز در تیمار با کلرید روی در هر دو زمان ۲۴ و ۷۲ ساعت پس از تیمار و تیمار با کلرید نیکل در ۷۲ ساعت پس از تیمار به طور معنی‌داری افزایش نشان داد. فلاونوئیدهای رامنتین، کامفرول، میرستین، ویتکسین، روتین و کوئرستین نیز در گیاه شاهد و غلظت‌های مختلف تیمار با کلرید روی و کلرید نیکل تغییراتی داشتند که در جداول شماره ۱ و ۲ قابل مشاهده می‌باشد.

www.SID.ir

Archive of SID

بررسی میزان نیتروتوکسین‌ها در تیمار با غلظت‌های مختلف $ZnCl_2$ و $NiCl_2$:

بررسی داده‌های نیتروتوکسین نشان داد که در تنش عناصر سنگین روی و نیکل میزان نیتروتوکسین به طور معنی‌داری نسبت به گیاه شاهد افزایش می‌یابد (جدول شماره ۳).

طیف جذبی نیتروتوکسین در طول موج بین ۴۰۰-۸۰۰ نانومتر در تیمارهای کلریدروی و کلریدنیکل در شکل ۴ نشان داده شده است.

جدول ۱: تغییرات میزان فلاونوئیدها در برگ گیاه یونجه‌تاجی در تیمار با غلظت‌های مختلف کلریدروی و کلریدنیکل به مدت ۲۴ و ۷۲ ساعت.

							Markers					
	Treatment (mM)	**Time (h)**	**NTF**	**Flavonoid sulfates**	**Flavone C & *C/O*-glycosides**	**Aglycones**	**Rh**	**K**	**M**	**V**	**Ru**	**Q**
CMF1	**Control**	24	5	4	1	0	+	-	-	-	-	+
CMF2	**Control**	72	4	3	1	0	+	-	+	-	+	+
CMF3	**ZnCl2 7/5**	24	6	4	2	0	+	-	+	+	-	-
CMF4	**ZnCl2 7.5**	72	6	3	3	0	++	-	-	+	-	-
CMF5	**ZnCl2 15**	24	6	3	3	0	+	+	+	+	-	-
CMF6	**ZnCl2 15**	72	7	3	4	0	+	++	+	+	+	-
CMF7	**ZnCl2 22/5**	24	7	3	3	1	+	++	+	++	-	+
CMF8	**ZnCl2 22/5**	72	8	3	4	1	-	+	-	+	+	+
CMF9	**ZnCl2 30**	24	11	4	4	2	++	++	-	+	+	+
CMF10	**ZnCl2 30**	72	12	4	5	3	++	++	+++	+	+	++
CMF11	**NiCl2 2/5**	24	5	4	1	0	+	-	-	-	-	+
CMF12	**NiCl2 2/5**	72	4	3	1	0	+	-	+	-	+	+
CMF13	**NiCl2 5**	24	6	4	2	0	+	++	-	-	++	+
CMF14	**NiCl2 5**	72	6	3	3	0	++	++	-	-	++	+
CMF15	**NiCl2 7/5**	24	6	3	2	1	-	++	-	-	+	+
CMF16	**NiCl2 7/5**	72	7	3	3	1	+	+	-	-	+	+
CMF17	**NiCl2 10**	24	8	5	2	1	-	++	-	+	++	+
CMF18	**NiCl2 10**	72	8	2	5	1	+	+	-	+	++	++

NTF= Number of total flavonoids, Ru=Rutin, Q= Quercetin, K= Kaempferol M= Myricetin, Rh=Rhamnetine, V= Vitexine-(non flavonoid), + (few flavonoid), ++ (high concentration of flavonoid) and +++ (very high concentration of flavonoid).

جدول ۲: آنالیز داده های بررسی فلاونوئیدها در تیمار با روی و نیکل در مدت زمان ۲۴ و ۷۲ ساعت.

	F(ZnCl2,24hours)	**F(ZnCl2, 72hours)**	**F(NiCl2,24hours)**	**F(ZnCl2, 72hours)**
NTF	$16/5^{**}$	$26/4^{**}$	$5/4^{*}$	15^{**}
Flavonoid sulfates	$0/9^{ns}$	$۰/6^{ns}$	$1/5^{ns}$	$۰/721^{ns}$
Flavone C& C/O-glycosides	$3/9^{*}$	$6/9^{**}$	$1/5^{ns}$	$8/154^{**}$
Aglycones	6^{**}	$12/75^{**}$	$1/5^{ns}$	$5/342^{*}$
Rh	$0/6^{ns}$	$2/625^{ns}$	$3/5^{*}$	$۰/9^{ns}$
k	5^{*}	5^{*}	3^{ns}	$2/625^{ns}$
M	$1/5^{ns}$	$7/5^{**}$	۰^{ns}	$2/5^{ns}$
V	$1/875^{ns}$	$۰/75^{ns}$	6^{**}	$11/875^{**}$
Ru	3^{ns}	$۰/75^{ns}$	3^{ns}	$۰/9^{ns}$
Q	$1/5^{ns}$	$3/5^{*}$	0^{ns}	$۰/654^{ns}$

** معنی‌دار در سطح ۰/۰۱

* معنی‌دار در سطح ۰/۰۵

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۳: میزان تقریبی نیتروتوکسین و ماکزیمم طول موج جذبی نیتروتوکسین در طول موج ۸۰۰-۴۰۰ نانومتر در گیاهان تیمار شده با غلظت‌های مختلف کلریدروی و کلریدنیکل. حروف نامشابه در هرعنصر و در هر زمان نشان‌دهنده معنی‌دار بودن می باشد

Heavy metal	Concentration (mM)	Time (hour)	Nitrotoxin (Mg/g)	Maximum wavelenght
$ZnCl_2$	0	24	1-4[a]	0.161
	7.5		9-13[bc]	0.401
	15		14-19[c]	0438
	22.5		4-8[ab]	0.338
	30		14-19c	0.589
	0	72	1-4[a]	0.129
	7.5		4-8[a]	0.361
	15		14-19[b]	0.512
	22.5		14-19[b]	0.505
	30		20-25[b]	0.648
$NiCl_2$	0	24	1-4[a]	0.161
	2.5		4-8[a]	0.412
	5		14-19[b]	0.587
	7.5		14-19[b]	0.508
	10		20-25[b]	0.631
	0	72	1-4[a]	0.129
	2.5		4-8[ab]	0.382
	5		4-8[bc]	0.338
	7.5		20-25[cd]	0.622
	10		14-19[d]	0.522

بحث

تغییرات آناتومی برگ در تنش روی و نیکل: با افزایش غلظت تیمار روی و نیکل، اندازه دهانه روزنه‌ها به طور معنی‌داری کاهش یافت (شکل۳). به طور کلی روزنه‌ها به عنوان نمایش‌گرهای زیستی آلودگی محیطی عمل می‌کنند. مشابه با نتایج ما در آزمایشی با تیمار جوانه‌های ۱۵ روزه دو گونه *Lens culinaris* و *Phaseolus mungo* با عناصر سنگین نشان داده شد که اندازه دهانه روزنه در گیاه شاهد در مقایسه با تیمارها بزرگ‌تر بود و در تیمارها اندازه دهانه روزنه کاهش یافته بود (۴). افزایش میزان عناصر سنگین در محیط کشت می‌تواند سبب کاهش در میزان آب نسبی گیاه شود که با کاهش سطح برگ و کاهش شدت تعرق همراه است که در کل جذب و انتقال آب را کاهش می‌دهد (۵) که این امر می‌تواند بر سیستم فتوسنتزی گیاه نیز اثر گذارد (۶). همچنین انباشتگی عناصر سنگین در ریشه‌ها بازدارنده انتقال آب می‌باشد که این امر می‌تواند موجب بسته‌تر شدن دهانه روزنه‌ها گردد. از دیگر علل کاهش میزان دهانه روزنه‌ها می‌تواند کاهش میزان آب سلول در نتیجه کاهش جذب آب باشد که فشار تورژسانس کاهش یافته و سلول‌های نگهبان روزنه آب خود را از دست داده و منجر به بسته شدن دهانه روزنه‌ها می‌شود (شکل ۱ و۲). از طرف دیگر کاهش رشد ناشی از تنش عناصر سنگین سبب افزایش بارگیری فلوئم شده و منجر به کاهش فعالیت آنزیم‌ها و واکنش‌های چرخه کالوین می‌شود و در نهایت منجر به تنظیم منفی فتوسیستم ۲ و کاهش زنجیره انتقال الکترون می‌گردد (۲۲) که این کاهش نیاز به دی‌اکسیدکربن ناشی از کاهش چرخه کالوین سبب کاهش میزان دهانه روزنه شده و در نتیجه روزنه‌ها بسته می‌شوند(۲۳).

تغییرات فلاونوئیدها در تنش روی و نیکل: تغییرات قابل توجه در میزان فلاونوئیدها در غلظت‌های مختلف تیمار روی و نیکل نسبت به شاهد مشاهده گردید. طبق جدول شماره ۲ میزان فلاونوئید کل (NTF) در طی تنش با هر دو عنصر روی و نیکل و در هر دو زمان ۲۴ و ۷۲ ساعت به طور معنی‌داری افزایش نشان داد. Flavone *C* & *C/O*-glycosides و Flavonoid sulfates در شاهد و همه غلظت‌های تیمار با روی و نیکل در هر دو زمان ۲۴ و ۷۲ ساعت وجود داشتند. Flavone *C*& *C/O*-glycosides و Aglycone افزایش

www.SID.ir

Archive of SID

معنی‌داری را در تنش با عنصر روی در هر دو زمان ۲۴ و ۷۲ ساعت نشان داد و در مورد تنش نیکل تنها در زمان ۷۲ ساعت افزایش معنی‌دار بود. به طور کلی در گیاهان بسته به ماهیت تنش وارده به آن‌ها انواع مختلفی از فلاونوئیدها تولید می‌شود (۲۴). سنتز ایزوفلاون‌ها و برخی فلاونوئیدهای دیگر، وقتی گیاهان آلوده یا مجروح شوند یا تحت دماهای پایین و شرایط کمبود تغذیه‌ای قرار گیرند، القاء می‌شوند. القاء بیوسنتز ترکیبات فنلی در گندم در پاسخ به سمیت نیکل و در ذرت در پاسخ به سمیت آلومینیوم مشاهده شده است (۸). در آزمایش دیگری که توسط Sakihama و همکاران (۱۰) در تیمار با سرب در گیاه *Phaseolus vulgaris* انجام گرفت افزایش قابل توجه در ترکیبات فنلی نشان داده شد. یکی از علل افزایش فنلیک‌ها می‌تواند افزایش در فعالیت آنزیم‌های دخیل در متابولیسم ترکیبات فنلیکی طی تنش عناصر سنگین باشد (۸). طبق تحقیقات Feucht و همکاران (۲۵) بر روی گونه *Fagus sylvatica* در منطقه با آلودگی هوای سنگین تغییرات شدیدی در میزان فلاونول مشاهده کرد (۲۶). طبق جدول شماره ۱ میزان کامفرول و میرستین و کوئرستین در تیمار با کلریدروی در مقایسه با گیاه شاهد افزایش یافت به طوری که در ۲۴ ساعت تیمار با کلریدروی تنها میزان کامفرول به طور معنی‌داری افزایش نشان داد اما با افزایش مدت تیمار از ۲۴ ساعت به ۷۲ ساعت علاوه بر کامفرول، کوئرستین و میرستین نیز افزایش معنی‌داری نشان دادند. این نتیجه با نتایج به دست آمده توسط نوری و همکاران (۲۷) مشابه بود که در گونه *Robina peseudo-acacia* L. افزایش میزان فلاونوئید کل و کامفرول و میرستین را در طی تنش فلوئوراید مشاهد کردند. همچنین طبق مطالعات Robles و همکاران (۲۶) فلاون ساده میرستین با آلودگی O_3 رابطه مثبتی داشته و ازن سبب القاء سنتز میرستین در برگ‌های *Pinus halepensis* شد. در تیمار با کلریدنیکل در ۲۴ ساعت تیمار افزایش معنی‌داری در میزان ویتکسین و کاهش در میزان رامنتین نسبت به گیاه شاهد مشاهده شد در حالی‌که با افزایش مدت تیمار با کلریدنیکل تنها ویتکسین افزایش معنی‌دار نشان داد (جدول ۲).

تغییرات میزان نیتروتوکسین در تنش روی و نیکل: تنش‌های فیزیولوژیکی باعث افزایش غلظت گلیکوزیدهای سمی در گیاه می‌شود. این افزایش غلظت، می‌تواند به دلیل تنش آب یا کمبودهای تغذیه‌ای باشد. مرحله‌ی رشد گیاه، نوع بافت، موقعیت جغرافیایی، شرایط فصلی، خاک و اقلیم بر میزان ترکیبات نیتروژنی تأثیرگذار است (۲۸). تنش خشکی در *Cyperus rotundus* L. سبب افزایش متابولیت‌های ثانویه سمی در ریشه می‌شود (۱۴). همچنین طبق تحقیقات کوگیل(۲۸) در یک دوره‌ی ۶ ساله میزان تولید ترکیبات نیتروتوکسینی در سیزده گونه گون بسته به میزان خشکی و رطوبت متغیر است و در یک سال خشک میزان NO_2 در برگ‌ها ممکن است به ۳۰ تا ۳۵ میلی گرم در گرم وزن خشک برسد. دو عنصرروی و نیکل به طور معنی‌داری سبب افزایش میزان ترکیبات نیتروتوکسین در گیاهان یونجه تاجی تحت تنش نسبت به گیاهان شاهد می‌شوند. بالا بودن میزان عناصر سنگین در محیط کشت می‌تواند منجر به کاهش در میزان آب نسبی گیاه شود(۴) و از آنجایی که در غلظت‌های مورد استفاده در این پژوهش میزان پژمردگی گیاه با تیمار عناصر سنگین افزایش یافت در نتیجه بر مبنای تحقیقات نوری و همکاران (۱۵)گیاهانی که در مناطق خشک و بیابانی بوده و یا آبیاری نمی‌شوند غلظت بالایی از ترکیبات نیتروتوکسین را دارا می‌باشند. آبیاری با رطوبت کافی، میزان NO_2 را در گیاهان کاهش می‌دهد، بنابراین به نظر می‌رسد ترکیبات نیتروژنی در شرایط تنش خشکی و بی آبی، نقش دفاعی برای گیاه داشته باشند.

نتیجه گیری

همان‌طور که در بخش‌های قبلی بیان گردید برخی از عناصر سنگین برای رشد و نمو گیاهان مورد نیاز بوده و در برخی از فرآیندهای متابولیسمی مهم در گیاهان شرکت می‌کنند اما افزایش این عناصر بیش از حد طبیعی در سلول می‌تواند سبب بر هم زدن هومئوستازی یونی سلول‌ها گردند. از طرف دیگر چون عناصر سنگین دارای الکترون‌های جفت نشده در اوربیتال dخود می‌باشند، در نتیجه دهنده خوب الکترون بوده و می‌توانند با دادن الکترون به اکسیژن معمولی، انواع اکسیژن واکنش‌گر را درون سلول افزایش داده و به نوبه خود آسیب به پروتئین‌ها، غشاء، DNA و کاهش کلروفیل در نتیجه تجزیه اکسیداتیو کلروفیل را سبب شوند. افزایش فلاونوئیدها می تواند به عنوان یک آنتی‌اکسیدان در برطرف کردن انواع اکسیژن واکنش‌گر و به عنوان همبند شونده با عناصر سنگین در کاهش آسیب ناشی از عناصر سنگین کمک کنند. کاهش سنتز کلروفیل به نوبه خود منجر به توقف زنجیره انتقال الکترون شده و در نهایت اختلال در چرخه کالوین را به همراه دارد که سبب کاهش دهانه روزنه

www.SID.ir

Archive of SID

هوایی به علت کاهش نیاز بـه دی‌اکسـیدکربن شـده و بـه دلیـل کاهش فتوسنتز و کاهش تولید مواد قندی منجر به کاهش رشـد می‌شود. کـاهش جـذب آب مـی‌توانـد منجـر بـه کـاهش فشـار تورژسانس در سلول‌های نگهبان روزنه و بسته شـدن روزنـه‌هـای هوایی و پژمردگی گیـاه شـود. بنـابراین بـه طـور کلـی بـه نظـر می‌رسدکه گیاه یونجه تـاجی بـا تغییـر در میـزان فلاونوئیـدها و همچنین تغییر در میـزان نیتروتوکسـین‌هـا تـا حـدی در مقابـل آسیب ناشی از تنش عناصر سنگین روی و نیکل مقاومت نماید.

تشکر و قدردانی

نویسندگان مقاله از حـوزه معاونـت محتـرم پژوهشـی و فنـاوری دانشگاه اراک برای حمایت مالی و اجرایی این تحقیـق صـمیمانه تشکر و قدردانی می‌نمایند.

منابع

1. Nriogo JO. Global inventory of natural and anthropogenic emissions of trace metals to the atmosphere. Nature. 1979; 279: 409-411.

2. Jiang LY, Yang XE, He ZL. Growth response and phytoextraction of copper at different levels in soils by Elsholtzia splendens, Chemosphere. 2004; 55:1179-1187.

3. Abdel Latif EA, Rabie H, Abo-shelbeya MAM, Nofal MA. The effect of nickel on plants.1. Effect of seed soaking in Ni- sulphate solutions on growth and chemical composition of Sorghum. J. Agric. Res. Dev. 1988; 10(1): 33-46.

4. Azmat R, Haider S, Riaz M. An inverse relation between Pb^{+2} and Ca^{2+} ions accumulation in Phaseolus mungo and Lens culinaris under Pb stress, Pak. J. Bot. 2009; 41(5): 2289-2295.

5. Azmat R, Haider S, Askari S. Phyotoxicity of Pb I: Effect of Pb on germination, growth, morphology and histomorphology of Phaseolus mungo and Lens culinaris. Pakistan J. Biol. Sci. 2006; 9: 979-984.

6. Haider H, Kanwal S, Uddin F, Azmat R. Phytotoxicity of Pb. II: Changes in chlorophyll absorption spectrum due to toxic metal Pb stress on Phaseolus mungo and Lens culinaris. Pakistan J. Bio. Sci. 2006; 9: 2062-2068.

7. Weryszko-Chmielewska E, Hwil M. Lead-induced histological and ultrastructural changes in the leaves of soybean (Glycine max (L.) Merr). Soil Sci. and Plant Nutr. 2005; 51: 203-212.

8. Michalak A. Phenolic compounds and their antioxidant activity in plants growing under heavy metal stress. J. of Environ. Stud. 2006; 15 (4): 523-530.

9. Diaz J, Bernal A, Pomar F, Merino F. Induction of shikimate dehydrogenase and peroxidase in pepper (Capsicum annum L.) seedlings in response to copper stress and its relation to lignification. Plant Sci. 2001; 161:179.

10. Sakihama Y,Yamasaki H. Lipid peroxidation induces by phenolics in cinjunction with aluminium ions, Biol. Plantarum. 2002; 45: 249- 254.

11. Jung CH, Maeder V, Funk F, Frey B, et al. Release of phenols from Lupinus albus L. roots exposed to Cu and their possible role in Cu detoxification. Plant Soil. 2003; 252: 301.

12. Winkel-Shirley, B. . Biosynthesis of flavonoids and effects of stress. Curr. Opin. Plant Biol. 2002; 5: 218.

13. Noori M., Malayeri BE., Jafari M. Determination of fluoride α its effects on flavonoids in some legumes. Toxicol. Environ. Chem. 2009; 91 (3): 409-418.

14. Einhelling FA. 1999. An Integrated view of allelochemicals amid multiple stresses. In: Inderpit, S., Dakshini, KMM., Foy, CL. Principles and practices in plant ecology. CRC Press, Boca Raton. pp. 479-494.

15. Noori M, Chehreghany A, Hatami A. Nitrotoxins in three genera of Papilionoideae (Leguminosae) found in the central of Iran and potential health implications. Toxicol. Environ. Chem. 2007; 89(3): 479-485.

16. Noori M., Malayeri, BE., Jafari M. Fluoride pollutants as causative agent of nitrotoxins producing in some legume plants. Toxicol., Environ. Chem. 2010; 92 (1): 97-105.

17. Hoagland DR, Arnon DI. The water-culture method for growing plants without soil. California Agricultural Experiment Station Circular. 1950; 347: 1-32.

18. Widuri R., Welzen PV. A revision of the genus Cephalomappa (Euphorbiaceae) in Malesia, Reinwardtia. 1993; 11 (3): 153-184.

19. Markham KR. Techniques of Flavonoid Identification. Academic Press.: L ondon.

20. Cooke AR. The toxic constituent in Indigofera endecaphylla. Arch. Biochem. Biophys. 1955; 55:114–120.

www.SID.ir

Archive of SID

21. Williams MC., Parker R. Distribution of organic nitrites in Astragalus. Weed Sci. 1974; 22(3): 259–262.

22. Krupa ZA., Siedlecka W., Malsymiec K., Baszynski T. In vivo responses Of photosynthetic apparatus of Phaseolus vulgaris L. to nickel toxicity. J. Plant Physiol. 1993; 142: 664-668.

23. Sharma P., Dubey RS. Lead toxicity in plants. Brazilian J. Plant Physiol. 2005; 17: 35–52.

24. Dixon RA., Paiva NL. Stress-induced phenylpropanoid metabolism. Plant Cel1.1995; 7: 1085–1097.

25. Feucht W., Treutter D., Christ E. Role of flavanols in yellowing beech trees of Black Forest. Tree Physiol. 1997; 17: 335. Cited in Inderjit SKMM. Dakshini, and C.L. Foy. 1999. Principles and Practices in Plant Ecology. 328–329, Boca Raton: CRC Press. Pp. 313-329.

26. Robles C., Greff S., Pasqualini V., Garzino S., Bousquet-Melou A., Fernandez C., Korboulewsky N., Bonin G. Phenols and flavonoids in Aleppo pine needles as bioindicators of air pollution. J. Environ. Quality. 2003; 32: 2265–71.

27. Majak M. Review of toxic glycosides in rangeland and pausture forages. J. Range Manage. 2001; 54:494–498.

28. Cowgill UM. Variation in the nitrotoxin concentration of 13 species of Astragalus (Fabaceae) over a 6-year period. Biol. Res. 1991; 31: 111–118.

www.SID.ir

Archive of SID

Journal of Cell & Tissue (JCT) *Research Article*
Winter 2011; 1(2): 9-20

The Effects of Heavy Metals on Leaf Anatomy, Some Flavonoids and Nitrotoxins of *Coronilla varia L.* in Hydroponic Culture

Amini F, Ph.D.[1*], Noori M, Ph.D.[1], Foroghi M, M.Sc. Student[2]

1- Biology Department, Faculty of Sciences, Arak University, Arak 38156-8-8349, Iran

2- M.Sc Student of Plant Physiology

* Email corresponding author: F-Amini@araku.ac.ir

Received: 1 Feb. 2011 Accepted: 15 May. 2011

Abstract

Aim: In this study, the effects of Ni and Zn to leaf anatomy, some flavonoids and nitrotoxin of Coronilla varia were investigated.

Material and Methods: 40 days aged grown Coronilla varia L. plants in equal growth condition were treated with different concentration of $ZnCl_2$ (0, 7.5, 15, 22.5 and 30 mM) and $NiCl_2$ (0, 2.5, 5, 7.5 and 10 mM) for 24 and 72 hours in hydroponic culture and the effects of imposing heavy metals on Leaf anatomy, some flavonoids of control and treated plants examined and compared using 2-DPC (Two Dimensional Paper Chromatography) and TLC (Thin Layer Chromatography) methods. Nitrotoxin measured using spectrophotometer too. All of Data compared together.

Results: Results showed anatomical changes in polluted plants responses to Zn and Ni. In general results showed a wide changes in leaf flavonoids profile with increases number of total flavonoids at Zn and Ni stress. However, Nitrotoxin increased significantly when Zn and Ni increased.

Conclusion: Probably, C. varia L. can tolerate against heavy metals stress of Zn and Ni with changes of flavonoids content and nitrotoxin.

Key words: Anatomy, Coronilla varia L., Flavonoids, Nitrotoxins, Zn and $NiCl_2$

www.SID.ir