Archive of SID

نشریه علمی تغذیه گیاهان باغی
دوره دوم، شماره ۱، بهار و تابستان ۱۳۹۸، (ص ۱-۲۰)

واکنش‌های مورفوفیزیولوژیکی گیاه خرفه (*Portulaca oleracea* L.) به اسید هیومیک تحت تنش نیکل

ملیکا میر[۱]، داریوش طالعی[۲*]، فرناز رفیعی[۳]

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد دانشکده علوم و فنون دریایی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال.
melikamir65@gmail.com
۲- نویسنده مسئول، استادیار، مرکز تحقیقات گیاهان دارویی دانشگاه شاهد، تهران، ایران.*
d.talei1348@gmail.com
۳- استادیار دانشکده علوم و فنون دریایی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال.
f_rafiei@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۰۴/۱۳ تاریخ پذیرش:۱۳۹۸/۰۶/۰۲

چکیده

در این تحقیق به‌منظور بررسی واکنش‌های مورفوفیزیولوژیکی گیاه خرفه به اسید هیومیک تحت تنش نیکل آزمایشی به‌صورت کرت‌های خردشده با دو فاکتور بر پایه طرح کاملا تصادفی با سه تکرار انجام شد که در آن غلظت‌های نیکل با ۴ سطح (۰، ۰/۲، ۰/۴ و ۰/۶ میلی‌مولار) به‌عنوان فاکتور اصلی و غلظت‌های اسید هیومیک با ۴ سطح (۰، ۲۰۰، ۴۰۰ و ۶۰۰ میلی گرم در لیتر) به‌عنوان فاکتور فرعی مورد بررسی قرار گرفتند. نتایج نشان داد که غلظت‌های مختلف نیکل و اسید هیومیک روی اکثر صفات مورفو-فیزیولوژیکی از قبیل طول ریشه، مالون‌دی‌آلدهید، سوپر اکسید دیسموتاز، کاتالاز، محتوای کلروفیل و کاروتنوئید اثرات معنی‌داری داشته است. نتایج نشان داد که با افزایش غلظت نیکل شاخص‌های رشد از قبیل طول اندام هوایی و ریشه، وزن تر و خشک، محتوای کلروفیل و کاروتنوئید کاهش یافت، در حالی‌که مقدار پرولین، مالون‌دی‌آلدهید و کاتالاز افزایش یافت.

بیشترین میزان رشد و عملکرد گیاه و محتوای کلروفیل و کاروتنوئید در غلظت ۶۰۰ میلی گرم بر لیتر هیومیک اسید و غلظت ۰/۴ میلی مولار نیکل به‌دست آمد. بنابراین می توان نتیجه‌گیری کرد که محلول پاشی هیومیک اسید می‌تواند یک روش مناسب برای کاهش اثرات مضر نیکل و بهبود فرآیندهای فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی و افزایش تحمل گیاه به تنش نیکل در گیاه خرفه گردد

کلید واژه‌ها: اسید هیومیک، سوپراکسیددیسموتاز، کاتالاز، مالون‌دی‌آلدهید، تنش نیکل

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

خرفه (Portulaca oleracea L.) گیاه دارویی از تیره پرتولاکاسه (Portulacaceae) است که دارای ساقه‌های بدون کرک و گوشتی، برگ‌های بدون کرک، گوشتی، قاشقی شکل با لبه‌های صاف و بدون دمبرگ، گل‌ها با دو کاسبرگ گوشتی ارغوانی مایل به سبز و گل‌برگ زرد رنگ و میوه از نوع کپسول است که دارای تعداد زیادی بذر براق سیاه رنگ مایل به قهوه‌ای می‌باشد. گیاهی یک‌ساله که ارتفاع آن تا حدود ٤٠ سانتی‌متر در مرحله بذردهی می‌رسد. خرفه در سرتاسر نواحی معتدل و گرمسیر دنیا انتشار یافته است (Holm *et al*., 1977). این گیاه غنی از اسیدهای چرب، پروتئین و ویتامین‌های C، A و E می‌باشد که حدود ۷۰ درصد اسیدهای چرب تشکیل‌دهنده روغن آن غیر اشباع بوده و حدود ۵۰ درصد آن را تنها اسیدهای چرب امگا۳ تشکیل می‌دهد (Masoodi *et al*., 2011). بر اساس منابع طب سنتی ایران خرفه یک گیاه ضددرد، تب-بر، ضدعفونی کننده، ضداسکوربوت، ضدسرفه، ضدالتهاب، تصفیه‌کننده‌خون، ضدسوختگی پوست و کاهش تورم و آبسه‌ها، گزیدگی نیش حشرات و عقرب گزیدگی می‌باشد (Zargari, 1997).

رشد و نمو گیاهان تحت تأثیر عوامل محیطی مختلفی قرار می‌گیرد که تنش‌های فلزات سنگین از جمله عوامل کاهنده عملکرد محصولات کشاورزی در جهان هستند. از جمله فلزات سنگینی که به عنوان آلاینده های مهم مطرح هستند می‌توان از سرب، کادمیوم، کروم، مس، جیوه، نیکل، روی و آرسنیک نام برد (Pendias-Kabata, 2000). نیکل به‌عنوان یک جزء ساختاری تعدادی از آنزیم‌ها، از جمله گلی اکسالاز، اوره‌آز و ایزوفرم‌هایی از سوپراکسید دیسموتاز و دهیدروژنازها می‌باشد. بنابراین، نیکل نقش در فرآیندهای مهم متابولیسمی، از جمله تجزیه اوره، متابولیسم هیدروژن و سنتز متان دارد (Chen *et al*., 2009). جذب نیکل توسط گیاهان بستگی به غلظت‌های نیکل، متابولیسم گیاه، اسیدیته خاک و یا محلول، حضور یون‌های دیگر و ترکیب آلی خاک دارد. عوامل دیگر از قبیل فصل کاشت، روش کاشت بذر و خواص ژئوشیمیایی خاک (مشخصات آبخوان، سطح منطقه، ثابت دی الکتریک) بر جذب نیکل اثر می‌گذارد (Chen *et al*., 2009). جذب نیکل در گیاهان عمدتاً توسط سیستم ریشه از طریق انتشار و انتقال فعال انجام می‌گیرد (Seregin and Kozhevnikova. 2006).

نیکل یک عنصر تغذیه‌ای بسیار کم مصرف جهت رشد بسیاری از گیاهان محسوب شده و مقادیر اضافی آن به شدت موجب سمیت می‌شود. نیکل از جمله عناصر طبیعی هست که به فرم‌های مختلف در محیط‌های آبی، خاکی و همچنین در پیکره گیاهان و جانوران وجود دارد و با افزایش آلودگی‌های زیست محیطی، ورود آن به زنجیره غذایی به طور معنی‌داری افزایش می‌یابد (Cempel and Nikel, 2006). غلظت بالای نیکل به عنوان عاملی تنش زا برای گیاهان به شمار می‌رود که می‌تواند به عنوان یک عامل محدود کننده رشد، ویژگی‌های فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی را در گیاهان تحت تاثیر قرار دهد (Baycu *et al*., 2006). پاسخ‌های گوناگون به سمیت ایجاد شده تحت تنش بستگی به گونه گیاهی، مرحله رشد، شرایط کشت، غلظت نیکل و مدت زمان تیمار دهی دارد (Chen *et al*., 2009).

اخیراً استفاده از انواع اسیدهای آلی برای بهبود کمی و کیفی محصولات زراعی و باغی رواج فراوان یافته است.

www.SID.ir

Archive of SID

مقادیر بسیار کم از اسیدهای آلی به دلیل وجود ترکیبات هورمونی، اثرات قابل ملاحظه ای در بهبود خصوصیات فیزیکی، شیمیایی و زیستی خاک و افزایش تولید و بهبود کیفیت محصولات کشاورزی دارند (Sabzevari and Khazaei, 2009). بنابراین، استفاده از انواع کودهای طبیعی از جمله اسیدهیومیک، بدون اثر مخرب زیست محیطی، جهت بالا بردن عملکرد می‌تواند مثمر ثمر واقع شود. اسیدهیومیک ترکیب پلیمری طبیعی آلی است که در نتیجه پوسیدگی مواد آلی خاک، پیت، لیگنین و غیره به وجود می‌آید که می‌تواند جهت افزایش محصول و کیفیت آن به کار گرفته شود (Abedi and Pakniyat, 2010). از مزایای مهم اسیدهیومیک می‌توان به کلات کنندگی عناصر غذایی مختلف مانند سدیم، پتاسیم، منیزیم، روی، کلسیم، آهن، مس و سایر عناصر در جهت غلبه بر کمبود عناصر غذایی اشاره کرد که سبب افزایش طول و وزن ریشه و آغازش ریشه‌های جانبی می‌شود (Abedi and Pakniyat, 2010). اسیدهیومیک با اصلاح فیزیکی و بهبود دانه‌بندی خاک فضای بیشتری برای نفوذ آب ایجاد می‌کند. به علاوه، مولکول‌های اسیدهیومیک با مولکول‌های آب پیوندی تشکیل می‌دهند که تا حدود زیادی مانع تبخیر آب می‌شود (Abedi and Pakniyat, 2010). همچنین اسیدهیومیک از طریق اثرات مثبت فیزیولوژیکی از جمله اثر بر متابولیسم سلول‌های گیاهی و افزایش غلظت کلروفیل با افزایش فعالیت آنزیم روبیسکو، سبب افزایش فعالیت فتوسنتزی و عملکرد در گیاهان می‌شود (Delfine et al., 2005).

تنش‌های محیطی با تولید گونه‌های فعال اکسیژن از قبیل اکسیژن یکتایی، رادیکال‌های سوپراکسید، پراکسیدهیدروژن و رادیکال‌های هیدروکسیل باعث ایجاد تنش اکسیدانی می‌شود. کاربرد اسیدهیومیک به‌صورت محلول‌پاشی در غلظت مناسب باعث افزایش کارایی اندامک‌های آنتی اکسیدانی می‌شود (Hayat et al., 2010). در بررسی تأثیر اسیدهیومیک روی گلرنگ (*Carthamus tinctorius* L.) تحت تنش خشکی گزارش شد که مصرف شش لیتر در هکتار اسیدهیومیک به‌طور قابل‌توجهی عملکرد دانه و عملکرد روغن را افزایش داد (Karimi and Tadayyon, 2018). همچنین گزارش شده است که مصرف اسیدهیومیک با غلظت ٤٠٠ میلی گرم در لیتر در مقایسه با تیمار شاهد اثرات مثبتی بر درصد و عملکرد اسانس در گیاه بادرنجبویه (Melissa officinalis L.) داشته است (Gorgini-Shabankareh *et al*., 2017). در مطالعه‌ای گزارش شده است که افزایش کاربرد اسیدهیومیک از ۰/۱ به ۰/۵ میلی‌مولار سبب افزایش میزان فنل کل در گیاه ریحان (Ocimum basilicum L.) شده است (Kim *et al*., 2006). در مطالعه‌ی دیگری محلول‌پاشی اسیدهیومیک باعث افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان از قبیل کاتالاز و آسکوربات پراکسیداز در گیاه ریحان گردید (Brouki-Milan *et al*., 2016). با توجه به اهمیت و ارزش اقتصادی گیاه خرفه در صنایع دارویی و از آنجائیکه تحقیقات قابل‌توجهی در رابطه با نقش اسیدهیومیک به‌عنوان عامل بهبود دهنده رشد گیاهی و فعال سازی آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان تحت تنش نیکل در گیاه خرفه انجام نشده است، هدف از این تحقیق بررسی واکنش‌های مورفوفیزیولوژیکی گیاه خرفه به تیمار اسیدهیومیک تحت تنش نیکل و تعیین آستانه تحمل این گیاه به نیکل بود.

www.SID.ir

Archive of SID

مواد و روش‌ها

ماده گیاهی و شرایط جوانه زنی

بذر خرفه از مرکز تحقیقات گیاهان دارویی دانشگاه شاهد تهیه شد. بذرها به مدت دو دقیقه در اتانول ۷۰ درصد قرار داده شده و سپس به مدت سه دقیقه در هیپوکلریت‌سدیم ۰/۱۲۵ درصد ضدعفونی و سپس سه بار با آب مقطر شستشو شدند. سپس بذور با ماسه مخلوط شدند و در گلدان‌های ۱۰ کیلویی حاوی ماسه و پرلیت به نسبت مساوی در عمق دو تا سه سانیمتری کشت شدند و پس از جوانه‌دار شدن بذرها تعداد ۲۰ گیاه در هر گلدان نگهداشته و بقیه تنک شدند.

طرح آزمایشی

آزمایش به صورت کرت‌های خرد شده با دو فاکتور بر پایه طرح کاملا تصادفی با سه تکرار در گلخانه تحقیقاتی مرکز تحقیقات گیاهان دارویی دانشگاه شاهد در سال ۱۳۹٦ انجام شد، که در آن غلظت‌های نیکل ($NiCl_2$) با ٤ سطح (۰، ۰/۲، ۰/٤ و ۰/٦ میلی‌مولار) به‌عنوان فاکتور اصلی و غلظت‌های اسیدهیومیک با ٤ سطح (۰، ۲۰۰، ٤۰۰ و ٦۰۰ میلی گرم در لیتر) به‌عنوان فاکتور فرعی مورد بررسی قرار گرفتند. برای تهیه غلظت‌های مختلف نیکل از نمک کلرید نیکل ($NiCl_2$) و برای تهیه غلظت‌های مختلف اسید-هیومیک از پودر اسیدهیومیک ۹۵٪ با نام تجاری هیومیکس (شامل ۸۰٪ اسیدهیومیک و ۱۱٪ اسید فولیک و سایر عناصر و ترکیبات ضروری) استفاده شد. اولین آبیاری پس از کاشت انجام شد و گیاهان تا مرحله ی چهار برگی تنها با آب مقطر آبیاری شدند. در مرحله شش تا هشت برگی تنش نیکل با غلظت‌های مختلف $NiCl_2$ به‌مدت چهار هفته به‌صورت متوالی با فاصله زمانی یک روز در میان اعمال شد. در این مدت گیاهان هر سه روز در میان با محلول غذایی هوگلند آبیاری شدند. زمان‌های محلول‌پاشی اسید-هیومیک در سه مرحله شامل مرحله ۸ برگی، شروع گلدهی و گلدهی کامل گیاه به‌صورت اسپری دست‌پاش انجام گرفت. در پایان دوره تیمار دهی در مرحله گلدهی کامل صفات مورفولوژیکی و محتوای رنگیزه‌های فتوسنتزی، پرولین، مالون‌دی‌آلدهید برگ و آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی از قبیل کاتالاز و سوپراکسیددیسموتاز اندازه‌گیری شدند.

اندازه گیری صفات مورفولوژیکی

بعد از پایان دوره تیمار اسیدهیومیک و تنش نیکل (چهار هفته) در مرحله رشد کامل گیاه (قبل از گلدهی) صفات مورفولوژیکی گیاه از قبیل طول اندام هوایی، تعداد شاخه جانبی در ساقه اصلی، تعداد برگ، طول ریشه، وزن‌تر و خشک اندام هوایی و ریشه اندازه‌گیری شد. وزن خشک اندام هوایی و ریشه ۷۲ ساعت پس از قرار دادن اندام هوایی و ریشه در دمای ٦۳ درجه سانتی گراد در آون اندازه‌گیری شد.

سنجش محتوای رنگیزه‌های فتوسنتزی

برای اندازه‌گیری رنگیزه‌های فتوسنتزی، مقدار ۰/۳ گرم برگ تازه توزین و در هاون با سه میلی لیتر استون ۸۰ درصد به خوبی ساییده و مقدار کلروفیلa، کلروفیلb، کلروفیل کل و کاروتنوئید در طول موج های ٤۷۰، ٦٤٥ و ٦٦۳ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر (Perkin Elmer Lambda25; UV/VS, USA) اندازه‌گیری و غلظت رنگیزه‌ها بر حسب میلی‌گرم بر گرم بافت‌تر محاسبه گردید (Lichtenthaler, 1987).

www.SID.ir

Archive of SID

سنجش محتوای پرولین

مقدار ۰/۲۵ گرم برگ‌تر با پنج میلی لیتر محلول سولفو-سالیسیلیک‌اسید سه درصد در هاون بخوبی ساییده و از کاغذ صافی واتمن شماره یک عبور داده شدند و سپس دو میلی‌لیتر از عصاره فیلتر شده با دو میلی لیتر محلول نین هیدرین (۱/۲۵ گرم نین هیدرین ۹۹ درصد در ۳۰ میلی لیتر اسیتیک اسید و ۲۰ میلی‌لیتر فسفریک‌اسید شش مولار) و دو میلی‌لیتر اسیتیک اسید مخلوط شد و به‌مدت یک ساعت در حمام آبی در دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. پس از اضافه نمودن چهار میلی‌لیتر تولوئن و قرار دادن در حمام آب جوش و سپس حمام یخ، جذب آن با دستگاه طیف سنج نوری در طول موج ۵۲۰ نانومتر اندازه گیری شد و در نهایت مقدار پرولین به صورت میکروگرم بر گرم وزن تر در نمونه‌ها محاسبه گردید. (Bates *et al*., 1973).

میکرو مول پرولین بر گرم وزن تر نمونه

[(µg proline/mL×mL toluene)/115.5 µg/µmole]/[(g sample)/5] =

سنجش محتوای مالون‌دی‌آلدهید برگ

در این روش مقدار ۰/۹ گرم از بافت‌تر گیاهی با ۵ میلی‌لیتر تری‌کلرواستیک‌اسید ۲۰ درصد در هاون ساییده شد و عصاره حاصل به مدت ۵ دقیقه با سرعت ۱۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ (مدل بکمن کولتر، ساخت آلمان) گردید. سپس یک میلی‌لیتر از عصاره با چهار میلی‌لیتر تری‌کلرواستیک‌اسید ۲۰ درصد حاوی ۰/۵ درصد تیوباربیتوریک‌اسید مخلوط و به مدت ۳۰ دقیقه در حمام آب گرم با دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد حرارت داده شد و سپس بلافاصله در یخ، سرد و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای محیط قرار داده شد و در نهایت برای رسوب دادن پروتئین نمونه با تری‌کلرواستیک‌اسید، نمونه با سرعت ۱۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ گردید. جذب محلول رویی که کمپلکس قرمز MDA-TBA بود، در طول موج ۵۳۰ نانومتر قرائت شد. مقدار جذب رنگیزه‌های غیر اختصاصی در ۶۰۰ نانومتر تعیین شد و از مقدار جذب در ۵۳۰ نانومتر کسر شد. برای محاسبه غلظت مالون‌دی‌آلدهید از ضریب خاموشی $\varepsilon = 155\mu\ mol^{-1}\ cm^{-1}$ استفاده شد و در نهایت مقدار مالون‌دی‌آلدهید بر حسب میکرومول بر گرم وزن‌تر محاسبه گردید (Heath and Packer, 1968).

سنجش فعالیت آنزیم کاتالاز

برای سنجش میزان فعالیت آنزیم کاتالاز ۲/۵ میلی‌لیتر بافر فسفات ۰/۰۵ مولار (pH 7) با ۲۰ میکرولیتر آب اکسیژنه سه درصد در حمام یخ با هم مخلوط کرده و بلافاصله ۵۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی ۱۰ برابر رقیق شده (جهت تهیه عصاره آنزیمی مقدار ۰/۲ گرم برگ سبز در ۲ میلی‌لیتر بافر استخراج پروتئین در هاون چینی سرد کاملا ساییده و بصورت همگن درآورده شد.) به مخلوط اضافه شد و تغییرات جذب آن در طول موج ۲۴۰ نانومتر توسط دستگاه طیف سنج نوری به مدت پنج دقیقه خوانده شد. میزان فعالیت آنزیم کاتالاز بر حسب تغییرات واحد جذب در دقیقه به ازای هر میلی‌گرم پروتئین با استفاده از فرمول زیر محاسبه گردید (Aebi, 1984).

$$CAT\ (mmol_{H2O2}\ min^{-1} mg_{protein}^{-1}) = (\Delta A_{240}/\Delta t) V_{mix}/\varepsilon d P V_{extr}$$

ΔA: میزان جذب، Δt: زمان واکنش (دقیقه)، V_{mix}: حجم نهایی واکنش (لیتر)، ε: ضریب خاموشی H_2O_2 (مولار) در ۲۴۰ نانومتر که برابر است با $40\ mM^{-1}cm^{-1}$، d: پهنای کوت

www.SID.ir

Archive of SID

(سانتی‌متر)، V_{exter}: حجم نمونه بکار رفته در آزمایش (میلی‌لیتر)، P: غلظت پروتئین در نمونه ($mgml^{-1}$).

سنجش میزان فعالیت آنزیم سوپراکسیددیسموتاز

برای سنجش میزان فعالیت آنزیم سوپراکسیددیسموتاز ۵۰ میکرولیتر از عصاره آنزیمی به ۲/۵ میلی لیتر محیط واکنش شامل ۵۰ میلی‌مولار بافر فسفات‌سدیم (pH 7.8) ، ۱۳ میلی‌مولار متیونین، ۷۵ میکرومولار نیتروبلو تترازولیوم[1]، ۰/۱ میلی‌مولار EDTA و ۵۰ میکرومولار ریبوفلاوین را در لوله آزمایشی که با فویل آلومینیومی تاریک شده بود ریخته و به مدت ۱۵ دقیقه در فاصله ۱۵ سانتی‌متری منبع نور قرار داده شد و بلافاصله جذب آنها در ٥٦٠ نانومتر خوانده شد. مقدار جذب یک محیط واکنش برابر با تفاضل مقدار جذب محیطی که در تاریکی برای یک دوره زمانی مشابه به‌عنوان کنترل نگهداری شد و مقدار جذب نمونه‌ای که در معرض نور بود. یک واحد فعالیت آنزیمی مقداری از آنزیم است که موجب ۵۰ درصد ممانعت احیای NBT در ٥٦٠ نانومتر می‌باشد. میزان فعالیت آنزیم بر حسب یک واحد در دقیقه به ازای میلی‌گرم پروتئین محاسبه گردید (Beauchamp andFridovich, 1971).

تجزیه و تحلیل داده‌های آماری با استفاده از نرم افزار SPSS (نسخه ٢٤) انجام شد و برای مقایسه میانگین‌ها از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح یک درصد استفاده شد. برای رسم نمودارها و گرافها از اکسل استفاده شد.

نتایج و بحث

تجزیه واریانس اعمال محلول پاشی اسیدهیومیک روی صفات مورفولوژیکی گیاه خرفه تحت تنش نیکل

نتایج تجزیه واریانس نشان داد که غلظت‌های مختلف نیکل روی ارتفاع بوته (PH)، تعداد شاخه جانبی (NB)، وزن تر اندام هوایی (SFW) و وزن خشک اندام هوایی (SDW) در سطح ۱ درصد و روی طول ریشه (RL) در سطح ۵ درصد اختلاف معنی‌داری دارد. نتایج تجزیه واریانس همچنین نشان داد که غلظت‌های مختلف اسید-هیومیک روی صفات ارتفاع بوته، تعداد شاخه جانبی، وزن تر اندام هوایی و وزن خشک اندام هوایی در سطح ۱ درصد اختلاف معنی‌داری دارد، در حالی‌که روی طول ریشه اختلاف معنی‌داری نشان نداد. اثرات متقابل نیکل و اسیدهیومیک روی طول ریشه و وزن تر اندام هوایی در سطح ۵ درصد اختلاف معنی‌داری نشان داد و روی سایر صفات اختلاف معنی‌داری نشان نداد (جدول ۱).

[1] Nitro Blue Tetrazolium (NBT)

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۱. تجزیه واریانس اثر غلظت‌های مختلف اسیدهیومیک روی صفات مورفولوژیکی خرفه تحت تنش نیکل

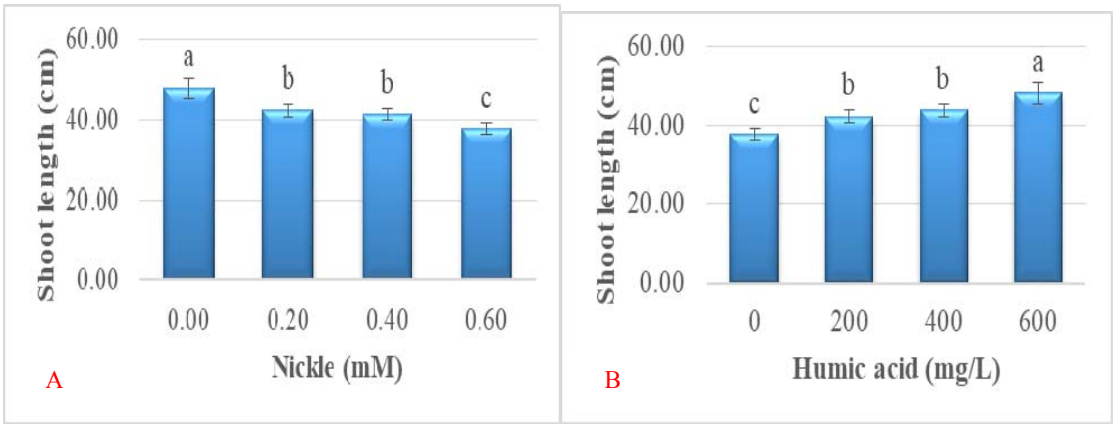
Table 1. Analysis of variance of humic acid on morphological characteristics in under Nickle stress.

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات				
		ارتفاع گیاه	تعداد شاخه جانبی	طول ریشه	وزن تر	وزن خشک
Source of variance	df	SL	NB	RL	SFW	SDW
نیکل	3	149.87**	13.12**	14.48*	797.33**	8.96**
خطای اصلی	8	91.01	9.77	8.12	294.67	3.31
اسیدهیومیک	3	154.66**	10.72**	6.84ns	341.63**	3.84**
اثرات متقابل	9	12.50ns	1.05ns	8.51*	60.60*	0.68ns
خطای فرعی	24	16.180	2.179	3.480	29.811	0.335
ضریب تغییرات (درصد)		11.5	16.4	20.2	21.4	23

ns، **، *** به ترتیب غیرمعنی‌دار، معنی‌دار در سطح احتمال پنج درصد و یک درصد می‌باشند.

ns, * and ** are non-significant and significant at the 0.05 and 0.01, respectively.

مقایسه میانگین غلظت‌های مختلف نیکل و اسیدهیومیک روی ارتفاع گیاه به روش آزمون چند دامنه ای دانکن نشان داد که اختلاف معنی‌داری بین غلظت‌های مختلف براساس ارتفاع گیاه وجود دارد، بطوریکه با افزایش غلظت نیکل ارتفاع گیاه کاهش یافت و با افزایش غلظت اسیدهیومیک ارتفاع گیاه افزایش یافت. بیشترین مقدار ارتفاع گیاه در کنترل (۲/۵۵±۴۷/۸۶ سانتی متر) و کمترین آن در غلظت ۰/۶ میلی مولار نیکل (۱/۳۵±۳۷/۶۷ سانتی متر) بود (شکل ۱) و بیشترین مقدار ارتفاع گیاه در غلظت ۶۰۰ میلی گرم در لیتر اسیدهیومیک (۲/۷۹±۴۸/۱۱ سانتی متر) و کمترین آن در تیمار شاهد (۱/۴۹±۳۷/۶۴ سانتی متر) بود (شکل ۱). اثرات متقابل نیکل و اسیدهیومیک روی ارتفاع گیاه اختلاف معنی‌داری نشان نداد.



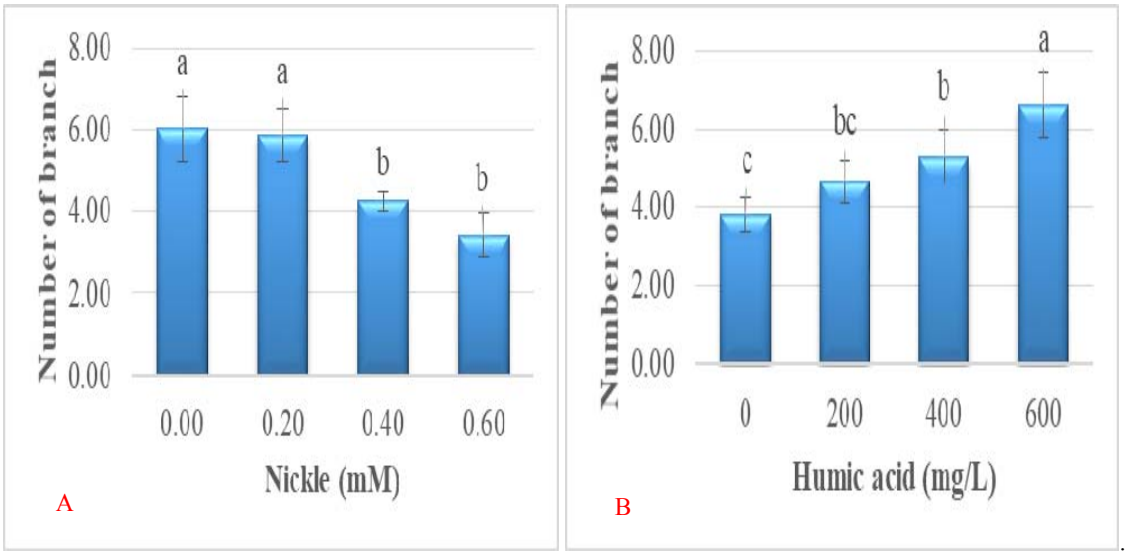
شکل ۱. مقایسه میانگین ارتفاع گیاه تحت غلظت‌های مختلف نیکل (A) و غلظت‌های مختلف اسیدهیومیک (B)

Figure 1. Mean comparison of shoot length of plant under different concentration of Nickle (A) and humic acid (B).

www.SID.ir

Archive of SID

مقایسه میانگین غلظت‌های مختلف نیکل و اسیدهیومیک روی تعداد شاخه های جانبی نشان داد که اختلاف معنی-داری بین غلظت‌های مختلف براساس تعداد شاخه های جانبی وجود دارد، بطوریکه با افزایش غلظت نیکل تعداد شاخه های جانبی کاهش یافت و با افزایش اسیدهیومیک تعداد شاخه های جانبی افزایش یافت. بیشترین تعداد شاخه های جانبی در کنترل (۶/۰۳±۰/۷۹ میلی متر) و کمترین آن در غلظت ۰/۶ میلی مولار نیکل (۳/۴۲±۰/۵۴ سانتی متر) بود (شکل ۲) و بیشترین تعداد شاخه های جانبی در غلظت ۶۰۰ میلی گرم در لیتر اسیدهیومیک (۶/۶۳ سانتی متر) و کمترین آن در کنترل (۳/۸۰ سانتی متر) بود (شکل ۲). اثرات متقابل نیکل و اسیدهیومیک روی تعداد شاخه های جانبی اختلاف معنی‌داری نشان نداد.



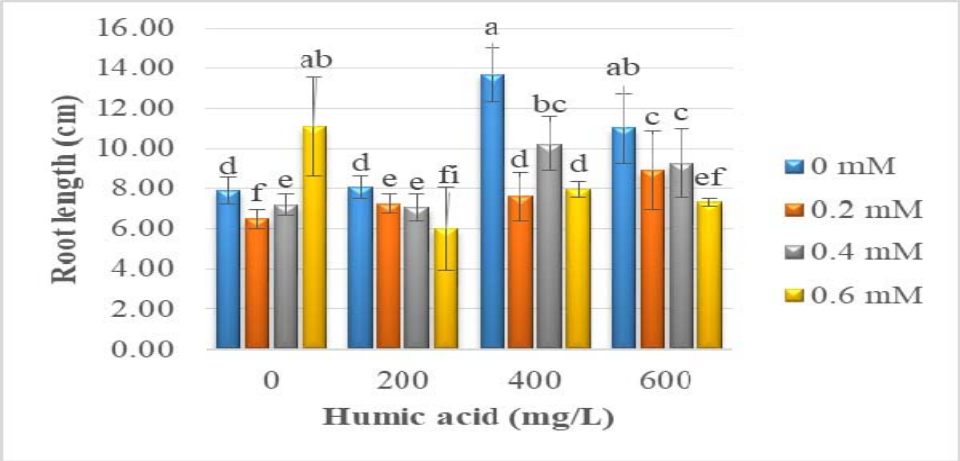
شکل ۲. مقایسه میانگین تعداد شاخه های جانبی تحت غلظت‌های مختلف نیکل (A) و غلظت‌های مختلف اسیدهیومیک (B)

Figure 2. Mean comparison of number of branch under different concentration of Nickle (A) and humic acid (B).

مقایسه میانگین غلظت‌های مختلف نیکل و اسیدهیومیک روی طول ریشه نشان داد که اختلاف معنی‌داری بین غلظت‌های مختلف نیکل و اسیدهیومیک براساس طول ریشه وجود دارد، بطوریکه با افزایش غلظت نیکل طول ریشه کاهش یافت و با افزایش غلظت اسیدهیومیک طول ریشه افزایش یافت. اثرات متقابل نیکل و اسیدهیومیک بر طول ریشه اختلاف معنی‌داری نشان داد، به‌طوریکه بیشترین طول ریشه در غلظت صفر میلی مولار نیکل (کنترل) و غلظت ۴۰۰ میلی گرم بر لیتر اسیدهیومیک و کمترین طول ریشه در غلظت ۰/۶ میلی مولار نیکل و غلظت ۲۰۰ میلی گرم بر لیتر اسیدهیومیک مشاهده گردید (شکل ۳).

www.SID.ir

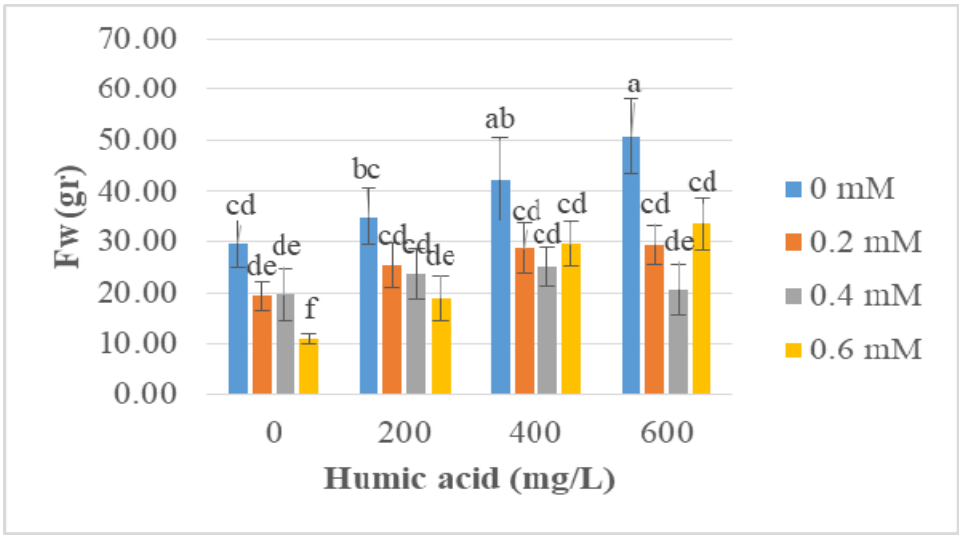
Archive of SID



شکل ۳. مقایسه میانگین اثرات متقابل نیکل و اسیدهیومیک روی طول ریشه گیاه خرفه

Figure 3. Mean comparison of interaction of Nickle and humic acid on root length in *Portulaca oleracea*

مقایسه میانگین غلظت‌های مختلف نیکل و اسیدهیومیک روی وزن تر اندام هوایی نشان داد که اختلاف معنی‌داری بین غلظت‌های مختلف براساس وزن تر اندام هوایی وجود دارد، بطوریکه با افزایش غلظت نیکل وزن تر اندام هوایی کاهش یافت و با افزایش غلظت اسیدهیومیک وزن تر اندام هوایی افزایش یافت. اثرات متقابل نیکل و اسید-هیومیک بر وزن تر اندام هوایی اختلاف معنی‌داری نشان داد، بطوریکه بیشترین مقدار وزن تر اندام هوایی در غلظت صفر میلی مولار نیکل (کنترل) و غلظت ۶۰۰ میلی گرم بر لیتر اسیدهیومیک و کمترین مقدار وزن تر اندام هوایی در غلظت ۰/۶ میلی مولار نیکل و غلظت صفر میلی گرم بر لیتر اسیدهیومیک مشاهده گردید (شکل ٤).



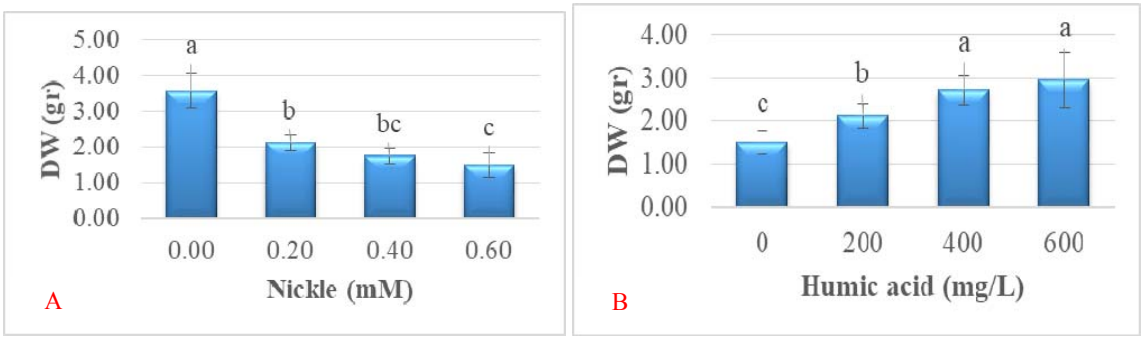
شکل ۴. مقایسه میانگین اثرات متقابل نیکل و اسیدهیومیک روی وزن تر گیاه خرفه

Figure 4. Mean comparison of interaction of Nickle and humic acid on fresh weight in *Portulaca oleracea*

www.SID.ir

Archive of SID

مقایسه میانگین غلظت‌های مختلف نیکل و اسیدهیومیک روی وزن خشک اندام هوایی نشان داد که اختلاف معنی-داری بین غلظت‌های مختلف براساس وزن خشک اندام هوایی وجود دارد، بطوریکه با افزایش غلظت نیکل وزن خشک اندام هوایی کاهش یافت و با افزایش غلظت اسید-هیومیک وزن خشک اندام هوایی افزایش یافت. بیشترین وزن خشک اندام هوایی در کنترل (۶/۰۳ میلی متر) و کمترین آن در غلظت ۰/۶ میلی مولار نیکل (۳/۴۲ سانتی متر) بود (شکل ۵) و بیشترین وزن خشک اندام هوایی در غلظت ۶۰۰ میلی گرم در لیتر اسیدهیومیک (۶/۶۳ سانتی متر) و کمترین آن در کنترل (۳/۸۰ سانتی متر) بود (شکل ۵). اثرات متقابل نیکل و اسیدهیومیک روی وزن خشک اندام هوایی اختلاف معنی‌داری نشان نداد.



شکل ۵. مقایسه میانگین وزن خشک تحت غلظت‌های مختلف نیکل (A) و غلظت‌های مختلف اسیدهیومیک (B)

Figure 5. Mean comparison of dry weight under different concentration of Nickle (A) and humic acid (B).

تنش نیکل رشد و بهره‌وری گیاه را با تأثیر بر صفات مورفولوژیکی، بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی و فرآیندها و عملکردها کاهش می‌دهد. کاهش ارتفاع گیاه و تعداد شاخه جانبی گیاه از صفات مورفولوژیکی اولین اثرات آشکار تنش نیکل بر گیاهان تحت تنش می‌باشد (Muhammad and Hussain, 2010). نتایج پژوهش حاضر نشان داد که با افزایش غلظت نیکل ارتفاع گیاه و تعداد شاخه جانبی گیاه به‌طور معنی‌داری کاهش می‌یابد. درحالی‌که با افزایش غلظت اسیدهیومیک ارتفاع گیاه و تعداد شاخه جانبی گیاه افزایش پیدا می‌کند. بنابراین، می‌توان نتیجه گرفت که افزایش غلظت اسیدهیومیک تا غلظت معینی می‌تواند میزان تنش گیاه را به نیکل تعدیل کند.

در بررسی انجام شده بر روی گیاه کلزا مشاهده شد که نیکل در غلظت ۱۰۰ میکرومولار باعث کاهش در ماده‌ی خشک گیاه شد (Alam *et al*., 2007). با افزایش در غلظت نیکل، تقریبا کاهش خطی در میزان ماده‌ی خشک و تر در گیاهان مشاهده می‌شود که با نتایج در این پژوهش همخوانی دارد (Yusuf *et al*., 2011). اسپری اسیدهیومیک در گیاه بادرنجبویه تحت تنش نیکل باعث افزایش در ارتفاع بوته، وزن تر و خشک و همچنین مانع از بازدارندگی رشد گیاه شد که این فرایند ممکن است به دلیل تشکیل کمپلکس بین اسیدهیومیک و نیکل در گیاه باشد که باعث کاهش آثار سمی نیکل شده است. Duman و Ozturk در سال (۲۰۱۰) گزارش کردند که مقادیر کم نیکل باعث افزایش در بیومس گیاه علف چشمه

www.SID.ir

Archive of SID

(Nasturtium officinalis) شد اما در غلظت‌های بالا و با افزایش مدت تیمار دهی غشای سلول تخریب می‌شود و در نتیجه کاهش در رشد و بیومس گیاه را باعث می شود. در مطالعه ای، کاربرد اسیدهیومیک به میزان ۵۰۰، ۱۰۰۰ و ۲۰۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم خاک، باعث افزایش طول هیپوکوتیل، قطر ساقه، طول ساقه، وزن خشک و میزان عناصر غذایی گیاه فلفل شد (Turkman et al., 2005). محققین در یک آزمایش گلخانه ای اثر اسیدهیومیک را بر وزن تر و خشک و عملکرد یولاف بررسی کردند و دریافتند که با کاربرد ۱۰۰ میلی گرم اسیدهیومیک به ازای هر گلدان، وزن تر و خشک گیاه به طور معنی‌داری افزایش یافت (Maccarthy, 2001). در مطالعه حاضر، مقایسه میانگین غلظت‌های مختلف نیکل و اسیدهیومیک روی وزن تر وخشک اختلاف معنی‌داری نشان داد، اما با افزایش سطح نیکل مقدار وزن‌خشک کاهش و با افزایش غلظت اسیدهیومیک مقدار وزن‌خشک افزایش یافت.

تجزیه واریانس اعمال محلول پاشی اسیدهیومیک روی صفات فیزیولوژیکی گیاه خرفه تحت تنش نیکل

نتایج تجزیه واریانس نشان داد که غلظت‌های مختلف نیکل روی کلروفیلa، کاروتنوئید، پرولین، مالون‌دی‌آلدهید (MDA)، سوپراکسید دیسموتاز (SOD) و کاتالاز (CAT) اثر معنی‌داری در سطح ۱ درصد نشان داد، در حالیکه غلظت‌های مختلف نیکل روی کلروفیلb اختلاف معنی-داری نشان نداد. غلظت‌های مختلف اسیدهیومیک روی صفت کلروفیلa ، پرولین و مالون‌دی‌آلدهید در سطح ۵ درصد و روی مقدار کاروتنوئید، میزان فعالیت آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز و کاتالاز در سطح ۱ درصد اثر معنی‌داری نشان داد و روی سایر صفات اختلاف معنی-داری نشان نداد. نتایج تجزیه واریانس همچنین نشان داد که اثرات متقابل نیکل و اسیدهیومیک روی صفت کلروفیلa در سطح ۵ درصد و کاروتنوئید در سطح ۱ درصد اثر معنی‌داری نشان داد (جدول ۲). .

جدول ۲. تجزیه واریانس اثر غلظت‌های مختلف اسیدهیومیک روی صفاَت فیزیولوژیکی خرفه تحت تنش نیکل

Table 2. Analysis of variance of humic acid on physiological characteristics in *Portulaca oleracea* under Nickle stress.

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات							
		کلروفیل a	کلروفیلb	کلروفیل کل	کاروتنوئید	پرولین	مالون‌دی آلدهید	سوپر-اکسیددیسموتاز	کاتالاز
Source of variance	df	Chlo.a	Chlo.b	Chlo	Carotenoid	Proline	MDA	SOD	CAT
نیکل	3	0.000**	0.000ns	319.05**	0.196**	314199.62**	0.009**	0.027**	2.793**
خطای اصلی	8	0.000	0.000	93.92	0.029	5047.12	0.003	0.001	0.577
اسیدهیومیک	3	0.000*	0.000ns	73.62ns	0.044**	128.88*	0.002*	0.004**	0.171**
اثرات متقابل	9	0.000*	0.000ns	40.50ns	0.030**	45.22ns	0.001ns	0.000ns	0.028ns
خطای فرعی	24	0.000	0.000	53.618	0.007	57.620	0.001	0.000	0.022
ضریب تغییرات (درصد)		26.8	16.1	15.8	24.3	12.8	11.4	8.6	10.2

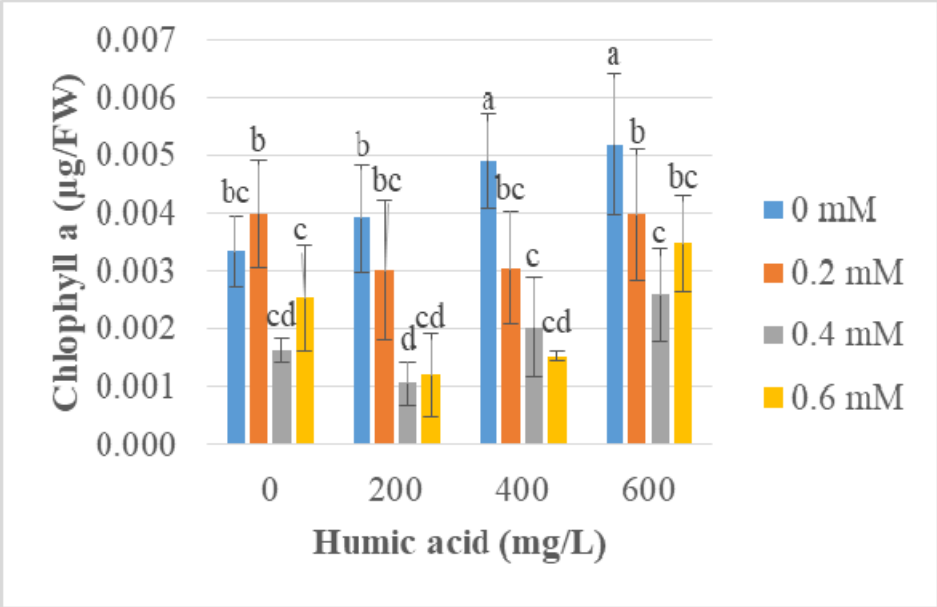
ns، **، * به ترتیب غیرمعنی‌دار، معنی‌دار در سطح احتمال پنج درصد و یک درصد می‌باشند.**

ns, * and ** are non-significant and significant at the 0.05 and 0.01, respectively.

www.SID.ir

Archive of SID

مقایسه میانگین غلظت‌های مختلف نیکل روی کلروفیل کل نشان دادکه اختلاف معنی‌داری بین غلظت‌های مختلف براساس محتوای کلروفیل وجود دارد، به طوریکه با افزایش غلظت نیکل محتوای کلروفیل کاهش یافت و بیشترین مقدار محتوای کلروفیل در گروه کنترل مشاهده شد (جدول ۳). غلظت‌های مختلف اسیدهیومیک و اثرات متقابل نیکل و اسیدهیومیک روی کلروفیل کل اختلاف معنی‌داری نشان نداد. غلظت‌های مختلف نیکل و اسید-هیومیک روی کلروفیلa اختلاف معنی‌داری نشان داد و اثرات متقابل نیکل و اسیدهیومیک براساس کلروفیلa اختلاف معنی‌داری نشان داد، به‌طوریکه بیشترین مقدار کلروفیلa در غلظت صفر میلی مولار نیکل (کنترل) و غلظت ۶۰۰ میلی گرم بر لیتر اسیدهیومیک و کمترین مقدار کلروفیلa در غلظت ۰/٤ میلی مولار نیکل و غلظت ۲۰۰ میلی گرم بر لیتر اسیدهیومیک مشاهده گردید (شکل ٦). غلظت‌های مختلف اسیدهیومیک ، نیکل و اثرات متقابل نیکل و اسیدهیومیک روی کلروفیلb اختلاف معنی‌داری نشان نداد.



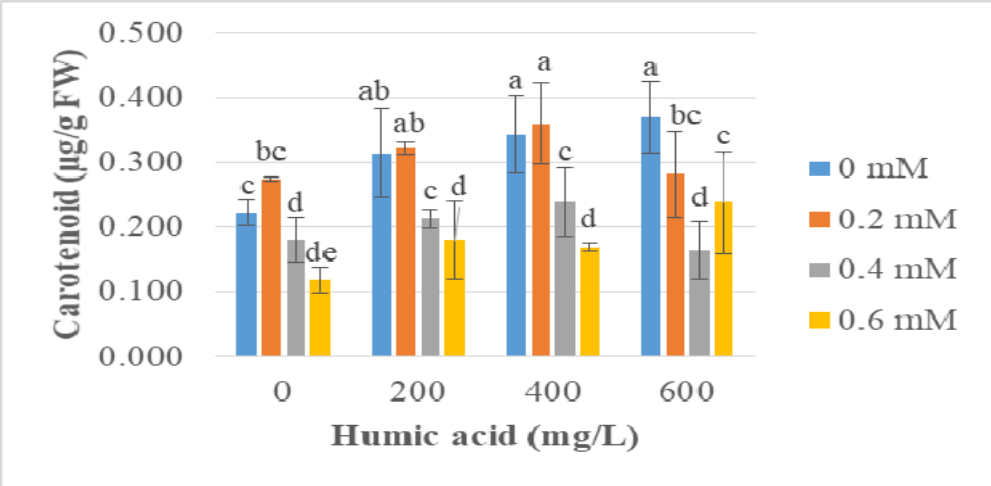
شکل ۶. مقایسه میانگین اثرات متقابل نیکل و اسیدهیومیک بر محتوای کلروفیل a گیاه خرفه

Figure 6. Mean comparison of interaction of Nickle and humic acid on chlorophyll a contents in *Portulaca oleracea*

نتایج مقایسه میانگین اثرات متقابل نیکل و اسیدهیومیک براساس محتوای کاروتنوئید اختلاف معنی‌داری نشان داد، به‌طوریکه بیشترین مقدار محتوای کاروتنوئید در غلظت صفر میلی مولار نیکل (کنترل) و غلظت ۶۰۰ میلی گرم بر لیتر اسیدهیومیک و کمترین مقدار محتوای کاروتنوئید در غلظت ۰/٦ میلی مولار نیکل و غلظت صفر میلی گرم بر لیتر اسیدهیومیک مشاهده گردید (شکل ۷).

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۷. مقایسه میانگین اثرات متقابل نیکل و اسیدهیومیک روی کاروتنوئید گیاه خرفه

Figure 7. Mean comparison of interaction of Nickle and humic acid carotenoid in *Portulaca oleracea*

تأثیر اسیدهیومیک به عواملی نظیر گونه، مرحله نموی گیاه، نحوه اعمال تیمار و غلظت آن وابسته است (Kovacik *et al*., 2009). گزارش شده است که اسیدهیومیک به عنوان محرک شیمیایی از طریق فعال کردن بیان ژن‌های مسیر بیوسنتزی متابولیت‌های ثانویه باعث افزایش تولید آن‌ها در گیاهان مختلف می‌شوند (Zhao *et al*., 2005). رنگیزه‌های کلروفیل یکی از عامل‌های اصلی است که در برابر فلزات سنگین آسیب می بیند. کاهش در محتوای کلروفیل کل در تعداد زیادی از گیاهان در برابر انواع فلزات سنگین از قبیل کادمیم، مس، جیوه، سرب و نیکل گزارش شده است. Singh و Kaur (۲۰۱۲) گزارش شده است که مقدار کلروفیل b در غلظت‌های بالای نیکل در گیاه ماش (*Vigna mungo* L.) کاهش یافت. به طور معمول کاهش در میزان کلروفیل ممکن است به دلیل بازدارندگی آنزیم آمینولوولینیک دهیدراتاز (ALAD) توسط نیکل باشد. کاهش در غلظت کلروفیل ممکن است به دلیل تخریب فرا ساختار کلروفیل، بازدارندگی سنتز رنگیزه‌های فتوسنتزی و آنزیم‌های چرخه کالوین، اختلال در جذب عناصر ضروری مانند منگنز و آهن، تخریب کلروفیل توسط تخریب کلروفیلاز، کاهش دانسیته و اندازه کلروپلاست باشد (Seth *et al*., 2008). در تحقیق حاضر شاخص‌های رشدی و محتوای کلروفیل تحت تیمار اسیدهیومیک افزایش یافت که ممکن است به دلیل جلوگیری از فعالیت آنزیم‌های کلروفیل اکسیداز مرتبط باشد که مانع تجزیه کلروفیل شده و از این طریق سبب افزایش فتوسنتز می‌شوند. اسید-هیومیک با افزایش ظرفیت تبادل کاتیونی، ظرفیت نگهداری آب در خاک و همچنین ایفای نقش بر روی نفوذپذیری غشاء به عنوان ناقل پروتئین، فعال کردن تنفس، چرخه کربس، فتوسنتز و تولید آمینو اسید و آدنوزین تری فسفات باعث افزایش رشد گیاهان شود (Muscolo, *et al*., 2013).

مقایسه میانگین غلظت‌های مختلف نیکل و اسیدهیومیک روی محتوای پرولین نشان دادکه اختلاف معنی‌داری بین غلظت‌های مختلف براساس محتوای پرولین وجود دارد، به طوریکه با افزایش غلظت نیکل تا غلظت ۰/٤ میلی مولار محتوای پرولین افزایش یافت، در حالیکه غلظت ۰/٦ میلی مولار نیکل بدلیل ایجاد سمیت شدید منجر به کاهش محتوای پرولین گردید (جدول ٤). غلظت‌های مختلف اسیدهیومیک و اثرات متقابل نیکل و اسیدهیومیک روی محتوای پرولین اختلاف معنی‌داری نشان نداد. یکی از سازوکارهای مهم گیاهان عالی تحت تیمار تنش انباشت ترکیبات سازگار مانند پرولین است که به‌عنوان یک ماده

www.SID.ir

Archive of SID

محافظت کننده غیر سمی، برای تنظیم اسمزی در شرایط شوری و سایر تنش‌های محیطی مطرح است (Cayley *et al*., 1992). چندین گزارش نقش مهم پرولین را در تنظیم فشار اسمزی، حفاظت از ساختار سلول و عملکرد آن را در ارقام متحمل به تنش نشان داده است (Turan *et al*., 2007). گزارش‌های متعددی نشان داده‌اند که مقادیر بالایی از فلزات سنگین از قبیل کادمیوم و نیکل باعث تجمع پرولین در گیاهان می شود. در پژوهش حاضر با افزایش سطح نیکل میزان پرولین برگ به‌صورت بسیار معنی‌داری افزایش و با افزایش غلظت اسیدهیومیک مقدار پرولین برگ به‌صورت بسیار معنی‌داری کاهش یافت. به‌طوری‌که مقدار پرولین از ٦٦/٠١ میکرو گرم بر گرم وزن تر در تیمار شاهد به مقدار ٢٤٦/٧٩ میکرو گرم بر گرم وزن تر در غلظت ٤٠٠ میلی مولار نیکل افزایش یافت. بنابراین، تجمع پرولین می‌تواند به‌عنوان سازوکاری مؤثر جهت کاهش فعالیت رادیکال‌های آزاد اکسیژن و حفظ محتوای آب یاخته‌ای گیاه، تحت تنش مطرح باشد. کاربرد اسیدهیومیک منجر به کاهش مقدار پرولین گردید. بنابراین، محلول‌پاشی گیاه با اسیدهیومیک در شرایط تنش نیکل می‌تواند باعث بهبود رشد گیاه شده و در نتیجه مقاومت به تنش نیکل را افزایش دهد.

مقایسه میانگین غلظت‌های مختلف نیکل و اسیدهیومیک روی محتوای مالون‌دی‌آلدهید نشان دادکه اختلاف معنی-داری بین غلظت‌های مختلف براساس محتوای مالون دی الدهید وجود دارد، نتایج نشان داد که با افزایش غلظت نیکل تا غلظت ٠/٤ میلی مولار مالون‌دی‌آلدهید افزایش یافت، در حالیکه غلظت ٠/٦ میلی مولار نیکل بدلیل ایجاد سمیت شدید منجر به کاهش مالون‌دی‌آلدهید گردید (جدول ٤). مقایسه میانگین غلظت‌های مختلف اسید-هیومیک روی مالون‌دی‌آلدهید نشان دادکه اختلاف معنی-داری بین غلظت‌های مختلف اسیدهیومیک براساس مالون-دی‌آلدهید وجود دارد و با افزایش غلظت اسیدهیومیک مقدار مالون‌دی‌آلدهید کاهش یافت (جدول ٤)، در حالی-که اثرات متقابل نیکل و اسیدهیومیک روی مالون‌دی‌آلدهید اختلاف معنی‌داری نشان نداد.

مالون‌دی‌آلدهید یک محصول پراکسیداسیون اسیدهای چرب اشباع نشده در فسفولیپیدها است. از سطح پراکسیداسیون لیپیدها به‌عنوان یک نشانه رادیکال آزاد مضر برای غشاء سلولی تحت شرایط تنش استفاده شده است. بنابراین، مالون‌دی‌آلدهید به‌عنوان یک معرف برای بررسی میزان صدمات غشاء در شرایط تنش مورد استفاده قرار می‌گیرد ((Jaleel *et al*., 2007. در پژوهش حاضر افزایش مقدار مالون‌دی‌آلدهید احتمالاً به دلیل اثرات بازدارندگی نیکل در غلظت‌های بالا می‌باشد که با ایجاد رادیکال‌های آزاد واکنش‌پذیر، باعث پراکسیداسیون اسیدهای چرب شده و مالون‌دی‌آلدهید افزایش می‌یابد. درحالی‌که کاربرد اسید-هیومیک منجر به کاهش مقدار مالون‌دی‌آلدهید گردید که حاکی از این است که اثرات مخرب تنش نیکل در گیاه توسط تیمار با اسیدهیومیک تا حدی بهبود یافته است. همسو با نتایج تحقیق حاضر، در مطالعه‌ای روی گیاه بادرنجبویه گزارش داد که با افزایش سطح نیکل، مقدار مالون‌دی‌آلدهید برگ کاهش می‌یابد (Rahimi-Tashi and Niknam, 2015). کاهش آسیب غشای سلولی در پاسخ به تیمار اسیدهیومیک که با افزایش وزن خشک گیاه تحت تنش همراه است، می‌تواند بیانگر مسئله القاء سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی توسط اسیدهیومیک ، با از بین بردن رادیکال‌های آزاد به‌طور مستقیم و یا توسط آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی باشد که خسارت ناشی از این انواع فعال را کاهش دهد و در نتیجه از اکسایش چربی‌ها جلوگیری نموده و مانع افزایش مالون‌دی‌آلدهید شود (Noctor and Foyer, 1998).

مقایسه میانگین غلظت‌های مختلف نیکل و اسیدهیومیک روی میزان فعالیت آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز نشان داد که اختلاف معنی‌داری بین غلظت‌های مختلف براساس میزان فعالیت آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز وجود دارد، به-طوریکه با افزایش غلظت نیکل و اسیدهیومیک میزان

www.SID.ir

Archive of SID

فعالیت آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز کاهش یافت (جدول ٤). اثرات متقابل نیکل و اسیدهیومیک روی میزان فعالیت آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز اختلاف معنی‌داری نشان نداد. مقایسه میانگین غلظت‌های مختلف نیکل و اسیدهیومیک روی میزان فعالیت آنزیم کاتالاز نشان داد که اختلاف معنی‌داری بین غلظت‌های مختلف براساس میزان فعالیت آنزیم کاتالاز وجود دارد. نتایج نشان داد که با افزایش غلظت نیکل میزان فعالیت آنزیم کاتالاز افزایش یافت (جدول ٤)، در حالیکه با افزایش غلظت اسیدهیومیک تا ٤٠٠ میلی گرم در لیتر میزان فعالیت آنزیم کاتالاز افزایش یافت و در غلظت ٦٠٠ میلی گرم در لیتر میزان فعالیت آنزیم کاتالاز کاهش یافت (جدول ٤). اثرات متقابل نیکل و اسیدهیومیک روی میزان فعالیت آنزیم کاتالاز اختلاف معنی‌داری نشان نداد. در این مطالعه میزان فعالیت آنزیم سوپراکسیددیسموتاز برگ با افزایش غلظت نیکل کاهش یافت و بیشترین میزان کاهش در غلظت ٠/٤ میلی مولار نسبت به شاهد مشاهده شد. یکی از تغییرات بیوشیمیایی که در تنش‌های محیطی از جمله تنش اکسیداتیو رخ می‌دهد تولید انواع اکسیژن‌های فعال می‌باشد که می‌تواند باعث تخریب عمده غشاء، چربی‌ها، پروتئین‌ها و اسیدهای نوکلئیک شوند (Garratt *et al*., 2002). کاتالاز یک نقش مرکزی را در حفاظت یاخته‌ها از اثرات سمی انواع اکسیژن فعال ایفا می‌کند. بنابراین، هنگامی‌که در شرایط تنش، تولید گونه‌های فعال اکسیژن افزایش می‌یابد، برخی از آنزیم‌های آنتی اکسیدان گیاهی مثل کاتالازها فعال می‌شوند که نقش بسیار مهمی در پاسخ به تنش غیرزیستی از جمله تنش نیکل دارند (Molassiotis *et al*., 2006). در پژوهش حاضر میزان فعالیت آنزیم کاتالاز برگ با افزایش غلظت نیکل افزایش یافت.

جدول ۳. مقایسه میانگین صفات فیزیولوژیکی گیاه خرفه تحت تنش نیکل و تیمار اسیدهیومیک.

Table 3. Mean comparison of Nickle and humic acid on physiological characteristics in *Portulaca oleracea*.

تیمار	سطوح	کلروفیل کل	پرولین	مالون‌دی-آلدهید	سوپراکسید-دیسموتاز	فعالیت کاتالاز
Factor	Levels	Chlo (µg/g FW)	Proline (µg/g FW)	MDA µmol/g) (FW	SOD ($mmol_{H2O2}$ $mg_{protein}^{-1}$)	CAT (mmol H_2O_2 min^{-1} $mgprotein^{-1}$)
نیکل Nickle (mM)	0	35.52±1.98a	66.01±2.61d	0.15±0.00c	51.23±2.86a	1.05±0.15c
	0.2	31.24±2.36ab	94.75±6.73c	0.17±0.01b	37.22±2.38b	1.10±0.10c
	0.4	25.38±2.50bc	246.79±9.25a	0.21±0.01a	33.96±1.56c	1.64±0.08b
	0.6	22.44±2.34c	146.79±18.28b	0.17±0.01b	35.07±2.35c	2.14±0.09a
اسید-هیومیک Humic acid (mg/L)	0	26.49±2.11b	227.82±48.06a	0.19±0.02a	43.27±3.92a	1.36±0.16b
	200	29.49±2.59ab	223.66±39.53ab	0.18±0.01ab	38.32±3.81b	1.42±0.17ab
	400	27.19±2.84b	219.87±45.78b	0.16±0.01c	35.62±3.71bc	1.54±0.15a
	600	34.393.06a	184.41±35.88c	0.17±0.01c	31.42±3.53c	1.43±0.08ab

حروف متفاوت نشان دهنده وجود اختلاف معنی‌دار در سطح یک درصد می‌باشد.

Different letters indicate significant difference between the values of pairs of treatment within columns at P< 0.01 according Duncan's multiple comparisons test.

www.SID.ir

Archive of SID

نتایج همبستگی بین صفات به روش ضریب همبستگی پیرسون نشان داد که بین اکثر صفات همبستگی وجود دارد. به‌طوری‌که بین برخی از صفات همبستگی مثبت و برخی صفات همبستگی از نوع منفی است. بیشترین مقدار همبستگی مثبت معنی‌داری بین مقدار وزن تر و خشک (r=۱) و بیشترین مقدار همبستگی منفی معنی‌داری بین پرولین و سوپراکسیددیسموتاز (r=-۰/۷۷) مشاهده شد (جدول ٤).

جدول ۴. ضرایب همبستگی صفات مورد بررسی گیاه خرفه تحت تأثیر غلظت‌های مختلف اسیدهیومیک و تنش نیکل

Table 4. Correlation coefficient of studied characteristics of in *Portulaca oleracea* under Nickel stress and humic acid treatment.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
SL(1)	1											
NB(2)	.654**	1										
FW(3)	.739**	.719**	1									
DW(4)	.739**	.719**	1.00**	1								
Chlo (5)	.592**	.652**	.583**	.583**	1							
Chlo.a (6)	.472**	.380*	.483**	.483**	.448**	1						
Chlo.b (7)	.480**	.555**	.650**	.650**	.454**	.716**	1					
Carotenoid (8)	.483**	.578**	.711**	.711**	.445**	.665**	.793**	1				
Proline (9)	-.455**	-.521**	-.480**	-.480**	-.558**	-.460**	-.416**	-.568**	1			
MDA (10)	-0.272	-0.231	-.409**	-.409**	-0.212	-.317*	-.375*	-.501**	0.245	1		
SOD (11)	0.190	.322*	.326*	.326*	.393**	0.291	.366*	.443**	-.767**	-.403**	1	
CAT (12)	-0.235	-0.080	-0.023	-0.023	-0.169	-0.292	-0.133	-0.273	.723**	0.235	-.632**	1

SL: ارتفاع بوته، NB: تعداد شاخه جانبی، FW: وزن تر، DW: وزن خشک، Chlo: محتوای کلروفیل، MDA: مالوندی-آلدهید، SOD: سوپر اکسید دیسموتاز و CAT: کاتالاز

نتیجه گیری

سمیت نیکل باعث کاهش رشد و عملکرد گیاه گردید، تیمار گیاه با اسیدهیومیک به‌عنوان عامل بهبود دهنده رشد گیاهی می‌تواند تحمل گیاه را برای مقابله با تنش نیکل و آسیب‌های ناشی از آن بالا ببرد. نتایج کلی نشان داد که تیمار اسیدهیومیک سبب بالا بردن توان آنتی اکسیدانی گیاه در مقابله با تنش نیکل شد. با این حال، برای نتیجه‌گیری بهتر در مورد تأثیر این ماده استفاده از این ترکیب در دامنه وسیع‌تری مورد نیاز باشد. به‌طورکلی، کاربرد اسیدهیومیک در گیاه خرفه گردد. منجر به بهبود پارامترهای بیوشیمیایی و افزایش تحمل گیاه در برابر تنش نیکل گردید. بنابراین، می‌توان گفت که تیمار این ماده می‌تواند راهکار مناسبی برای کاهش اثرات مضر ناشی از تنش نیکل در خرفه باشد. از بررسی کلیه صفات اندازه‌گیری شده می‌توان چنین نتیجه‌گیری کرد که محلول‌پاشی ٦۰۰ میلی گرم بر لیتر اسیدهیومیک می‌تواند یک روش مناسب برای کاهش اثرات مضر نیکل و بهبود شاخص‌های فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی

www.SID.ir

Archive of SID

منابع

Abedi, T. and H.Pakniyat. 2010. Antioxidant Enzyme Changes in Response to Drought Stress in Ten Cultivars of Oilseed Rape (*Brassica napus* L.). *Czech J. Genet. Plant Breed*. 46 (1): 27–34.

Aebi, H.E. 1984. Catalase. In Method of Enzymatic analysis, VCH, Weinheim, Germany-Deerfield, FL. 3:273-286.

Alam, M.M. Hayat, S. Ali, B. and A. Ahmad. 2007. Effect of 28- homobrassinolide treatment on nickel toxicity in *Brassica juncea*. *Photosynthetica*. 45:139–142.

Bates, L.S. Waldren, R.P. and I.D. Teare. 1973. Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant and Soil*. 39(1): 205-207.

Baycu, G. Tolunay, D. Özden, H. and S. Guenenebakan. 2006. Ecophysiological and seasonal variations in Cd, Pb, Zn and Ni concentrations in the leaves of urban deciduous trees in Istanbul. *Environ Pollut*. 143:545–554.

Beauchamp, C. and I. Fridovich. 1971. Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Analytical Biochemistry*. 44. 276 –287.

Brouki-Milan, E. Hassni, L. Abdollahi-Mandoulakani, B. Darvishzadeh, R. Kheradmand, F. and A. Hassani. 2016. The effect of different concentrations of methyl jasmonate on the activity of antioxidant enzymes and total protein in basil. *Journal of Crop Improvement*. 18(1): 103-115.

Cayley, S. Lewis, B.A. and M.T. Record. 1992. Origins of the osmoprotective properties of betaine and proline in *Esherichia coli* K-12. *Journal of Bacteriology*. 174: 1586-1595.

Cempel, M. and G. Nikel. 2006. Nickel: A Review of Its Sources and Environmental Toxicology. *Polish Journal of Environmental Studies*. 15: 375-382.

Chen, C. Huang, D. and J. Liu. 2009. Functions and Toxicity of Nickel in Plants: Recent Advances and Future Prospects. Clean, 37 (4–5): 304 – 313.

Delfine, S. Tognetti, R. Desiderio, E. and A. Alvino. 2005. Effect of foliar application of N and humic acids on growth and yield of durum wheat. *Agron. Sustain*. 25: 183-191.

Duman, F. and F. Ozturk. 2010. Nickel accumulation and its effect on biomass, protein content and antioxidative enzymes in roots and leaves of watercress (*Nasturtium offcinale* R. Br.). *Journal of Environmental Sciences*. 22: 526–532.

Garratt, L.C. Janagoudar, B.S. Lowe, K.C. Anthony, P. Power, J.B. and M.R. Davey. 2002. Salinity tolerance and antioxidant status in cotton cultures. *Free Radical Biology and Medicine*. 33(4): 502-511.

Hayat, Q. Hayat, S. Irfan, M. and A. Ahmad. 2010. Effect of exogenous methyl jasmonate under changing environment: A review. *Environmental and Experimental Botany*. 68: 14–25.

Heath, R.L. and L. Packer. 1968. Photoperoxidation in isolated chloroplasts: I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Archives of biochemistry and biophysics*. 125(1): 189-198.

Holm, L.G. Plunkett, D.L. Pancho, J.V. and J.P. Herberger. 1977. The world's worst weeds - distribution and biology. University Press of Hawaii, Honolulu. 609 pages.

www.SID.ir

Archive of SID

Gorgini-Shabankareh, H. Sabouri, F. Saedi, F. and B. A. Fakheri. 2017. Effects of different levels of humic acid on growth indices and essential oil of lemon balm (*Melissa officinalis* L.) under different irrigation regimes. *Journal of Crop Science Research in Arid Regions*. 1(2): 166-176.

Jaleel, C.A. Gopi, B. Sankor, P. Manivannaon, A. Kishorekumar, R.S. and L. Panneers. 2007. Studies on germination, seedling vigner, lipid peroxidatoin and proline metabolism in *Catharathus roseus* seedling under salt stress. *South African Jolurnal of Botany*. 73 (2): 190- 195.

Kabata-Pendias, A. 2000. Trace elements in soils and plants. CRC press LLC, 403 pages.

Karimi, E. and A. Tadayyon. 2018. Effect of humic acid spraying on yield and some morphological characteristic of safflower (*Carthamus tinctorius* L.) under drought stress conditions. *Applied Research in Field Crops*. 31(1): 19-38.

Kim, H.J. Chen, F. Wang, X. and N.C. Rajapakse. 2006. Effect of on secondary metabolites of sweet basil (*Ocimum basilicum* L.). *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 54(6): 2327-2332.

Kovacik, J. Backor, M. Strnad, M. and M. Repcak. 2009. Methyl jasmonate-induced changes to growth and phenolic metabolism in *Matricaria chamomilla* plants. *Plant Cell Reports*. 28:135–143.

Lichtenthaler, H.K. 1987. Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. *Methods in enzymology*. 148: 350-382.

Maccarthy, P. 2001. The principles of humic substances. *Soil Sci.* 166: 738– 751.

Masoodi, M.H. Ahmad, B. Mir, S.R. Zargar, B.A. and N. Tabasum. 2011. *Portulaca oleracea* L. A review. *Journal of Pharmacy Research*. 4(9):3044-8.

Molassiotis, A. Sotiropoulos, T. Tanou, G. Diamantidis, G. and I. Therios. 2006. Boron-induced oxidative damage and antioxidant and nucleolytic responses in shoot tips culture of the apple rootstock EM 9 (*Malus domestica* Borkh). *Environmental and Experimental Botany*. 56(1): 54-62.

Muhammad, Z. and F. Hussain. 2010. Vegetative growth performance of five medicinal plants under NaCl salt stress. *Pakistan Journal of Botany*. 42(1): 303-316.

Muscolo, A. Sidari, M. and S. Nardi. 2013. Humic substance: relationship between structure and activity. Deeper information suggests univocal findings. *Journal of Geochemical. Exploration*. 129: 57-63.

Noctor, G. and C.H. Foyer. 1998. Ascorbate and glutathione: Keeping active oxygen under control. *Annual Review Plant Physiology Plant Molecular Biology*. 49: 249-279.

Rahimi-Tashi, T. and V. Niknam. 2015. Evaluation of methyl jasmonate pretreatment and salinity stress on some physiological and biochemical parameters in *Triticum aestivum* L. *Iranian Journal of Plant Biology*. 28(2): 297-306.

Sabzevari, S. and H.R. Khazaei. 2009. The Effect of foliar application with humic acid on growth, yield and yield components of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Journal of Agroecology*. 1(2):53-63.

Seregin I. V. and A. D. Kozhevnikova. 2006. Physiological Role of Nickel and Its Toxic Effects on Higher Plants. *Russian Journal of Plant Physiology*. 53: 257–277.

Seth, C. S. Chaturvedi, P. K. and V. Misra. 2008. The role of phytochelatins and antioxidants in tolerance to Cd accumulation in *Brassica juncea* L. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 71: 76 – 85.

www.SID.ir

Archive of SID

Singh, H.P. and G. Kaur. 2012 Growth, photosynthetic activity and oxidative stress in wheat after exposure of lead to *Triticum aestivum* soil. *J. Environ. Biol*. 33:265-269.

Turan, M.A. Turkmen, N. and N. Taban. 2007. Effect of NaCl on stomatal resistance and proline, chlorophyll, Na, Cl and K concentrations of lentil plants. *Journal of Agronomy*. 6(2): 378-381.

Turkman, O. Demi, S. Sensoy, S. and A. Dursun. 2005. Effect of arbuscular mycorrhizal fungus and humic acid on the seedling development and nutrient content of pepper grown under salin soil conditions. *J. Biol. Sci.* 5: 565-574.

Yusuf, M. Fariduddin, Q. Hayat, S. and A. Ahmad. 2011. Nickel: An Overview of Uptake, Essentiality and Toxicity in Plants. *Bull Environ Contam Toxicol*. 86:1–17.

Zargari, A. 1997. Medicinal Plants. University Press of Tehran, Tehran. 1010 pages.

Zhao, J. Davis, L. and R. Verpoorte. 2005. Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites. *Biotechnology Advances*. 23(4): 283–333.

www.SID.ir

Archive of SID

Morpho-physiological responses of purslane (*Portulaca oleracea* L) to humic acid under Nickle stress

Melika Mir[1], Daryush Talei[2,*], Farnaz Rafiei[3]

1-Faculty of Marine Science and Technology, Islamic Azad University, North Tehran Branch
melikamir65@gmail.com
2-Medicinal Plants Research Center, Shahed University, Tehran, Iran
d.talei1348@gmail.com
3- Faculty of Marine Science and Technology, Islamic Azad University, North Tehran Branch
f_rafiei@yahoo.com

Received Date: 2019/07/04 **Accepted Date: 2019/08/24**

ABSTRACT

In order to investigate the morpho-physiological responses of purslane plant to humic acid under Nickle stress a split plot experiment based on a completely randomized design with two factors and three replications were carried out in the greenhouse. The factors were nickel concentrations with four levels (0, 0.2, 0.4 and 0.6 mM) as the main plots and four levels of humic acid concentrations (0, 200, 400 and 600 mg/L) as sub-main plots. The results showed that different nickel and humic acid concentrations had significant effects on most of morpho-physiological traits such as; root length, MDA, SOD, CAT chlorophyll and carotenoid contents. By increasing nickel levels, the growth indices such as shoot and root length, fresh and dry weight, chlorophyll, a, total chlorophyll and the amount of carotenoid decreased, while by increasing the nickel levels the proline content, MDA and CAT decreased. By increasing humic acid level, the proline content and the activity of CAT increased, while the amount of MDA and SOD enzymes decreased

. The highest yield and chlorophyll and carotenoid contents was obtained at 0.4 mM nickel and 600 mg/L humic acid. However, it can be concluded that applying the humic acid can be a suitable procedure to reduce the harmful effects of nickel stress and improving in physiological and biochemical parameters and plant tolerance to nickel stress in *Portulaca oleracea*

Keywords: Catalase, Humic acid, Malondialdehyde, Nickel stress, Superoxide dismutase

.

www.SID.ir