

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

ملیکا میر<sup>۱</sup>، داریوش طالعی<sup>۲\*</sup>، فرناز رفیعی<sup>۳</sup>

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 پذیرش: ۱۳۹۸/۰۶/۰۲

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۰۴/۱۳

### چکیده

در این تحقیق به منظور بررسی واکنش‌های مورفوفیزیولوژیکی گیاه خرفه به اسید هیومیک تحت تنش نیکل آزمایشی به صورت کرت‌های خردشده با دو فاکتور بر پایه طرح کاملاً 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 میلی‌گرم در لیتر) به‌عنوان فاکتور فرعی مورد بررسی قرار گرفتند. نتایج نشان داد که غلظت‌های مختلف نیکل و اسید هیومیک روی اکثر صفات مورفوفیزیولوژیکی 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 حالی که مقدار پرولین، مالون‌دی‌آلدهید و کاتالاز افزایش یافت.

بیشترین میزان رشد و عملکرد گیاه و محتوای کلروفیل و کاروتنوئید در غلظت ۶۰۰ میلی‌گرم بر لیتر هیومیک اسید و غلظت ۰/۴ میلی‌مولار نیکل به‌دست آمد. بنابراین می‌توان 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، سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز، مالون‌دی‌آلدهید، تنش نیکل

## مقدمه

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 تنش‌زا 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.

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 ۴۰ 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 A، C 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 ضد درد، تب-بر، ضد عفونی کننده، ضد اسکوربوت، ضد سرفه، ضد التهاب، تصفیه کننده خون، ضد سوختگی 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 آلاینده‌های 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

ملیکا میر و همکاران: واکنش‌های مورفوفیزیولوژیکی گیاه خرفه (*Portulaca oleracea L.*) به اسید هیومیک تحت تنش نیکل.

می‌شود. کاربرد اسید هیومیک به صورت محلول‌پاشی در غلظت مناسب باعث افزایش کارایی اندامک‌های آنتی‌اکسیدانی می‌شود (Hayat et al., 2010). در بررسی تأثیر اسید هیومیک روی گلرنگ (*Carthamus tinctorius L.*) تحت تنش خشکی گزارش شد که مصرف شش لیتر در هکتار اسید هیومیک به طور قابل توجهی عملکرد دانه و عملکرد روغن را افزایش داد (Karimi and Tadayyon, 2018). همچنین گزارش شده است که مصرف اسید هیومیک با غلظت ۴۰۰ 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). گزارش شده است که افزایش کاربرد اسید هیومیک 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 اسید هیومیک 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 قابل توجهی در رابطه با نقش اسید هیومیک به عنوان 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 اسید هیومیک تحت تنش نیکل و تعیین آستانه تحمل این گیاه به نیکل بود.

مقادیر بسیار کم از اسیدهای آلی به دلیل وجود ترکیبات هورمونی، اثرات قابل ملاحظه‌ای 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 اسید هیومیک، بدون اثر مخرب زیست محیطی، جهت بالا بردن عملکرد می‌تواند مثمر ثمر واقع شود. اسید هیومیک 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 اسید هیومیک 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). اسید هیومیک با اصلاح فیزیکی و بهبود دانه‌بندی خاک فضای بیشتری برای نفوذ آب ایجاد می‌کند. به علاوه، مولکول‌های اسید هیومیک با مولکول‌های آب پیوندی تشکیل می‌دهند که تا حدود زیادی مانع تبخیر آب می‌شود (Abedi and Pakniyat, 2010). همچنین اسید هیومیک از طریق اثرات مثبت فیزیولوژیکی از جمله اثر بر متابولیسم سلول‌های گیاهی و افزایش غلظت کلروفیل با افزایش فعالیت آنزیم رویسکو، 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، پراکسید هیدروژن و رادیکال‌های هیدروکسیل باعث ایجاد تنش اکسیدانی

## 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 هیپوکلریت سدیم 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 کاملاً تصادفی با سه تکرار در گلخانه تحقیقاتی مرکز تحقیقات گیاهان دارویی دانشگاه شاهد در سال ۱۳۹۶ انجام شد، که در آن غلظت‌های نیکل ( $\text{NiCl}_2$ ) با ۴ سطح (۰، ۰/۲، ۰/۴، ۰/۶ میلی‌مولار) به‌عنوان فاکتور اصلی و غلظت‌های اسیدهیومیک با ۴ سطح (۰، ۲۰۰، ۴۰۰ و ۶۰۰ میلی گرم در لیتر) به‌عنوان فاکتور فرعی مورد بررسی قرار گرفتند. برای تهیه غلظت‌های مختلف نیکل از نمک کلرید نیکل ( $\text{NiCl}_2$ ) 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  $\text{NiCl}_2$  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 فتوستتزی، پرولین، مالون‌دی‌آلدهید برگ و آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی از قبیل کاتالاز و سوپراکسیددیسموتاز اندازه‌گیری شدند.

### اندازه‌گیری 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، وزن تر 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 ۶۳ درجه سانتی‌گراد در آون اندازه‌گیری شد.

### سنجش محتوای رنگیزه‌های فتوستتزی

برای اندازه‌گیری رنگیزه‌های فتوستتزی، مقدار ۰/۳ گرم برگ تازه توزین و در هاون با سه میلی لیتر استون ۸۰ درصد به خوبی ساییده و مقدار کلروفیل a، کلروفیل b، کلروفیل کل و کاروتنوئید در طول موج های ۴۷۰، ۶۴۵ و ۶۶۳ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر (Perkin Elmer Lambda25; UV/VS, USA) اندازه‌گیری و غلظت رنگیزه‌ها بر حسب میلی‌گرم بر گرم بافت تر محاسبه گردید (Lichtenthaler, 1987).

ملیکا میر و همکاران: واکنش‌های مورفوفیز یولوژیکی گیاه خرفه (*Portulaca oleracea L.*) به اسید هیومیک تحت تنش نیکل.

### سنجش محتوای پرولین

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  $\epsilon = 155 \mu \text{mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$  استفاده شد و در نهایت مقدار مالون‌دی‌آلدهید بر حسب میکرومول بر گرم وزن تر 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 کاملاً 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).

$$\text{CAT} (\text{mmol H}_2\text{O}_2 \text{ min}^{-1} \text{mg}_{\text{protein}}^{-1}) =$$

$$(\Delta A_{240} / \Delta t) V_{\text{mix}} / \epsilon d P V_{\text{extr}}$$

$\Delta A$ : میزان جذب،  $\Delta t$ : زمان واکنش (دقیقه)،  $V_{\text{mix}}$ : حجم

نهایی واکنش (لیتر)،  $\epsilon$ : ضریب خاموشی  $\text{H}_2\text{O}_2$  (مولار) در

۲۴۰ نانومتر که برابر است با  $4.0 \text{ mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$ ،  $d$ : پهنای کوت

مقدار ۰/۲۵ گرم برگ‌تر با پنج میلی‌لیتر 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 میلی‌لیتر محلول نین هیدرین (۱/۲۵) گرم نین هیدرین ۹۹ درصد در ۳۰ میلی‌لیتر استیک‌اسید و ۲۰ میلی‌لیتر فسفریک‌اسید شش مولار) و دو میلی‌لیتر استیک‌اسید مخلوط شد و به مدت 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 اندازه‌گیری 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

$$[(\mu\text{g proline/mL} \times \text{mL toluene}) / 115.5 \mu\text{g}/\mu\text{mole}] / [(g \text{ sample}) / 5] =$$

### سنجش محتوای مالون‌دی‌آلدهید برگ

در این روش مقدار ۰/۹ گرم از بافت تر 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 تیوباربتوریک‌اسید 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

## 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).

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

### 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 فسفات سدیم (pH 7.8)، ۱۳ میلی‌مولار متیونین، ۷۵ میکرومولار نیتروبلو تترازولیوم<sup>۱</sup>، ۰/۱ میلی‌مولار EDTA و ۵۰ میکرومولار ریپوفلاوین 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 ۵۶۰ 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 ۵۶۰ نانومتر می‌باشد. میزان فعالیت آنزیم بر حسب یک واحد در دقیقه به ازای میلی‌گرم پروتئین محاسبه گردید (Beauchamp and Fridovich, 1971).

تجزیه و تحلیل داده‌های آماری با استفاده از نرم افزار SPSS (نسخه ۲۴) 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.

<sup>1</sup> Nitro Blue Tetrazolium (NBT)

ملیکا میر و همکاران: واکنش‌های مورفوفیزیولوژیکی گیاه خرفه (*Portulaca oleracea L.*) به اسید هیومیک تحت تنش نیکل.

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.

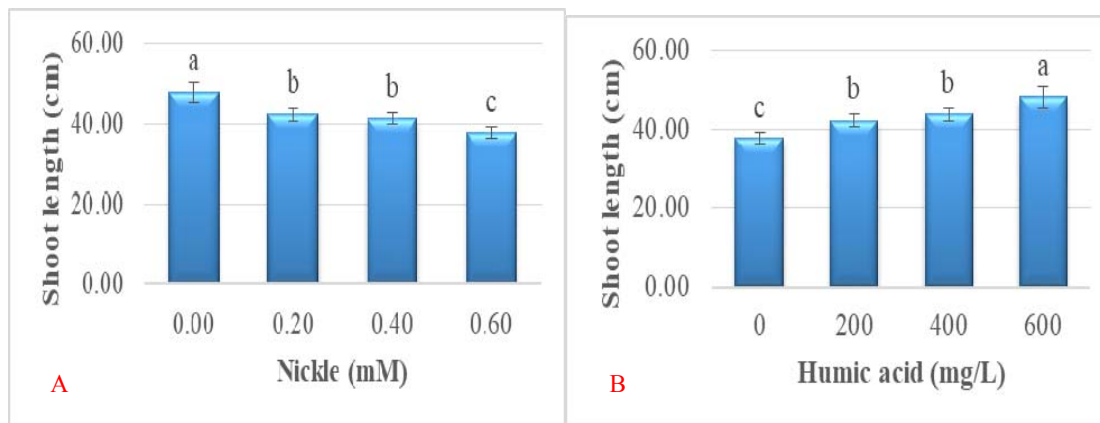
میانگین مربعات					درجه	منابع تغییرات
وزن خشک	وزن تر	طول ریشه	تعداد شاخه جانبی	ارتفاع گیاه	آزادی	
SDW	SFW	RL	NB	SL	df	Source of variance
8.96**	797.33**	14.48*	13.12**	149.87**	3	نیکل
3.31	294.67	8.12	9.77	91.01	8	خطای اصلی
3.84**	341.63**	6.84ns	10.72**	154.66**	3	اسیدهیومیک
0.68ns	60.60*	8.51*	1.05ns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

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.

آن در غلظت ۰/۶ میلی مولار نیکل ( $37/67 \pm 1/35$  سانتی متر) بود (شکل ۱) و بیشترین مقدار ارتفاع گیاه در غلظت ۶۰۰ میلی گرم در لیتر اسیدهیومیک ( $48/11 \pm 2/79$  سانتی متر) و کمترین آن در تیمار شاهد ( $37/64 \pm 1/49$  سانتی متر) بود (شکل ۱). اثرات متقابل نیکل و اسیدهیومیک روی ارتفاع گیاه اختلاف معنی‌داری نشان نداد.

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 ( $47/86 \pm 2/55$  سانتی متر) و کمترین

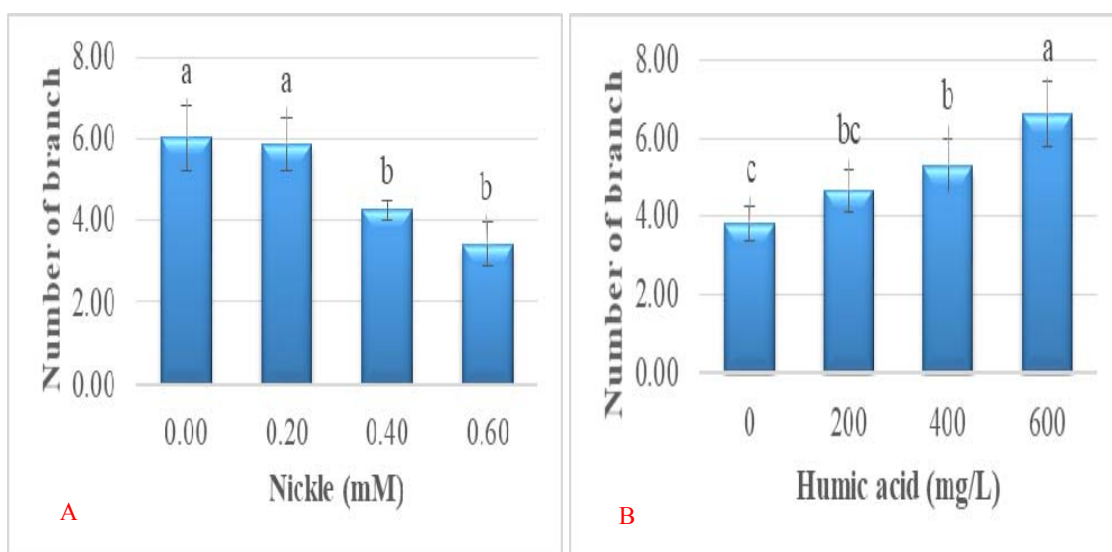


شکل ۱. مقایسه میانگین ارتفاع گیاه تحت غلظت‌های مختلف نیکل (A) و غلظت‌های مختلف اسیدهیومیک (B)

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

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 معنی داری نشان نداد.

مقایسه میانگین غلظت های مختلف نیکل و اسیدهیومیک روی تعداد شاخه های جانبی نشان داد که اختلاف معنی داری بین غلظت های 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 ( $6.03 \pm 0.79$  میلی متر) و کمترین آن در غلظت ۰/۶ میلی مولار نیکل ( $3.42 \pm 0.54$ )



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

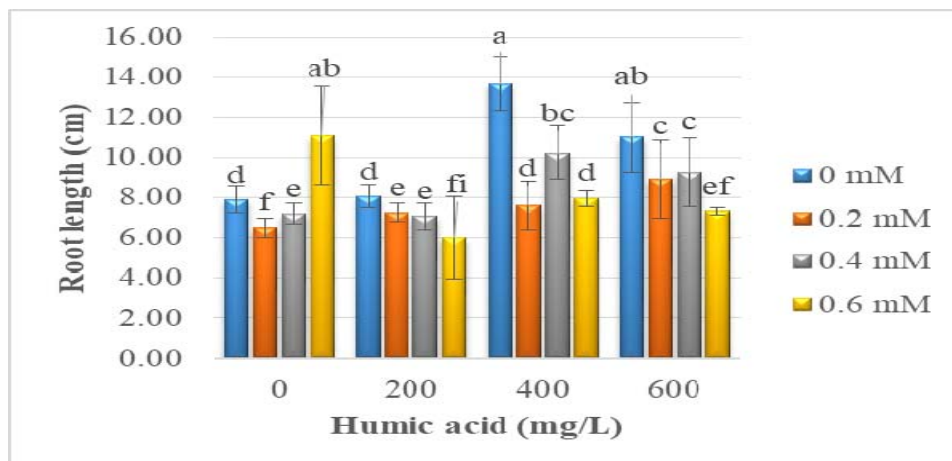
Figure 2. Mean comparison of number of branch under different concentration of Nickle (A) and humic acid (B).

طول ریشه اختلاف معنی داری نشان داد، به طوریکه 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).

مقایسه میانگین غلظت های مختلف نیکل و اسیدهیومیک روی طول ریشه نشان داد که اختلاف معنی داری بین غلظت های 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



ملیکا میر و همکاران: واکنش‌های مورفوفیزیولوژیکی گیاه خرفه (*Portulaca oleracea* L.) به اسید هیومیک تحت تنش نیکل.

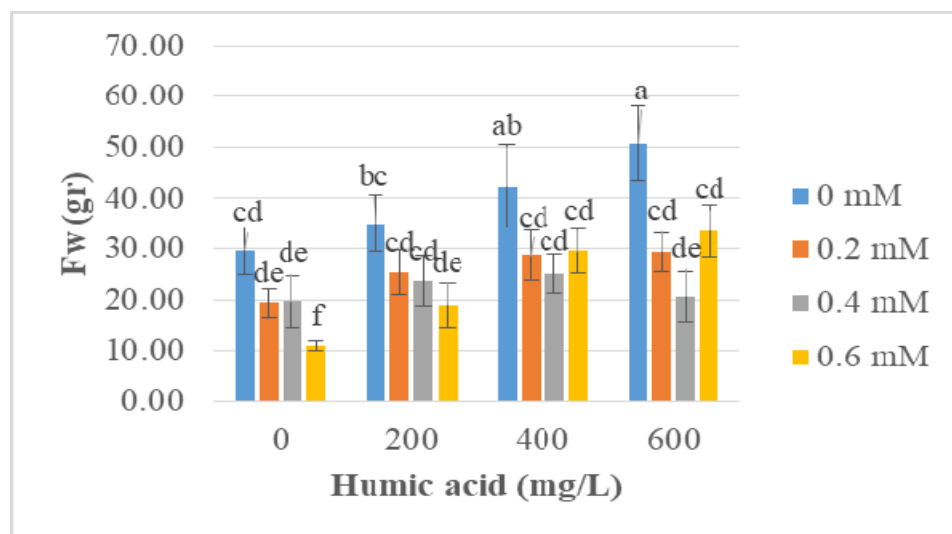


شکل ۳. مقایسه میانگین اثرات متقابل نیکل و اسیدهیومیک روی طول ریشه گیاه خرفه

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

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 ۴).

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-

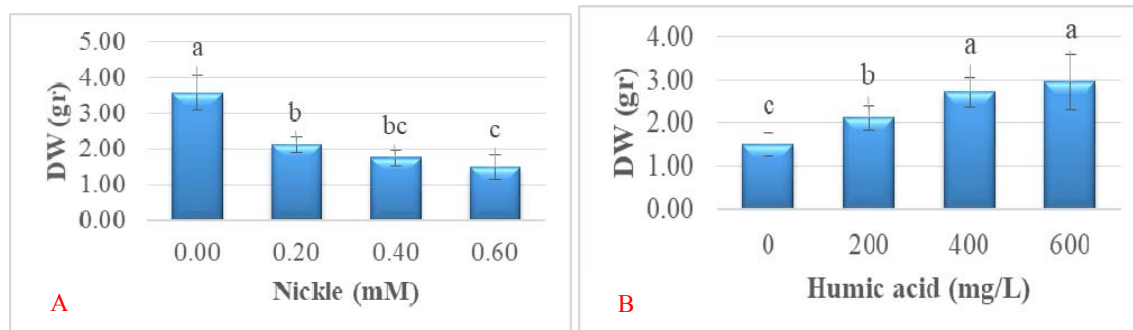


شکل ۴. مقایسه میانگین اثرات متقابل نیکل و اسیدهیومیک روی وزن تر گیاه خرفه

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

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 معنی داری نشان نداد.

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



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).

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، تقریباً 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

تنش نیکل رشد و بهره‌وری گیاه را با تأثیر بر صفات مورفولوژیکی، بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی و فرایندها 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 معنی داری 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.

ملیکا میر و همکاران: واکنش‌های مورفوفیزیولوژیکی گیاه خرفه (*Portulaca oleracea* L.) به اسید هیومیک تحت تنش نیکل.

### تجزیه واریانس اعمال محلول پاشی اسید هیومیک روی صفات فیزیولوژیکی گیاه خرفه تحت تنش نیکل

نتایج تجزیه واریانس نشان داد که غلظت‌های مختلف نیکل روی کلروفیل a، کاروتنوئید، پرولین، مالون‌دی‌آلدئید (MDA)، سوپراکسید دیسموتاز (SOD) و کاتالاز (CAT) اثر معنی‌داری در سطح ۱ درصد نشان داد، در حالی که غلظت‌های مختلف نیکل روی کلروفیل b اختلاف معنی‌داری نشان نداد. غلظت‌های مختلف اسید هیومیک روی صفت کلروفیل a، پرولین و مالون‌دی‌آلدئید 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 معنی‌داری نشان نداد. نتایج تجزیه واریانس همچنین نشان داد که اثرات متقابل نیکل و اسید هیومیک روی صفت کلروفیل a در سطح ۵ درصد و کاروتنوئید در سطح ۱ درصد اثر معنی‌داری نشان داد (جدول ۲).

(*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 می‌شود. در مطالعه‌ای، کاربرد اسید هیومیک 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 گلخانه‌ای اثر اسید هیومیک را بر وزن تر و خشک و عملکرد یولاف بررسی کردند و دریافتند که با کاربرد ۱۰۰ میلی گرم اسید هیومیک 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 اسید هیومیک روی وزن تر و خشک اختلاف معنی‌داری نشان داد، اما با افزایش سطح نیکل مقدار وزن خشک کاهش و با افزایش غلظت اسید هیومیک مقدار وزن خشک افزایش یافت.

جدول ۲. تجزیه واریانس اثر غلظت‌های مختلف اسید هیومیک روی صفات فیزیولوژیکی خرفه تحت تنش نیکل

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

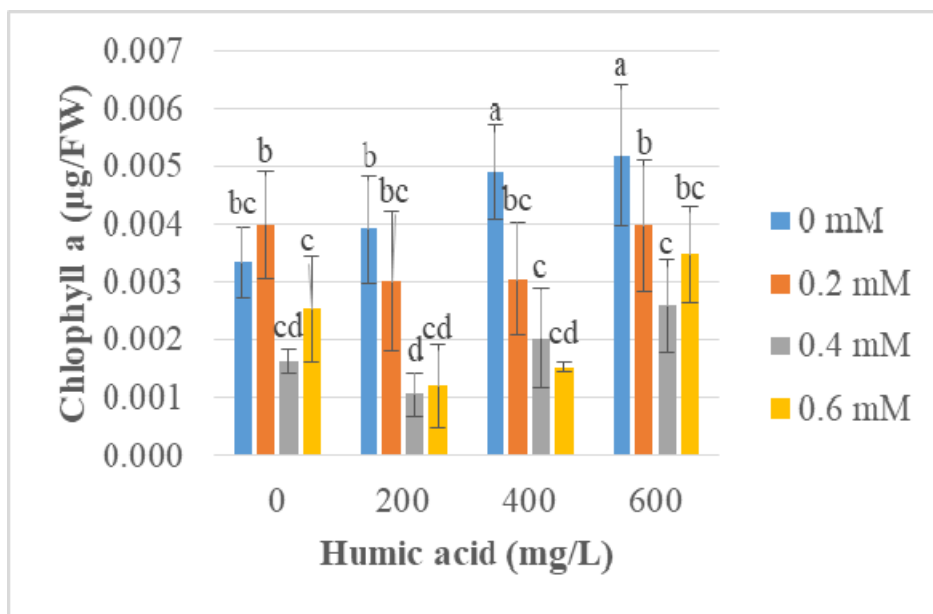
میانگین مربعات							درجه	منابع	
کاتالاز	سوپر-اکسید دیسموتاز	مالون‌دی‌آلدئید	پرولین	کاروتنوئید	کلروفیل کل	کلروفیل b	کلروفیل a	آزادی	تغییرات
CAT	SOD	MDA	Proline	Carotenoid	Chlo	Chlo.b	Chlo.a	df	Source of variance
2.793**	0.027**	0.009**	314199.62**	0.196**	319.05**	0.000ns	0.000**	3	نیکل
0.577	0.001	0.003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

ns, \*\*, \* به ترتیب غیر معنی‌دار، 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.

اثرات متقابل نیکل و اسیدهیومیک براساس کلروفیل a اختلاف معنی داری نشان داد، به طوریکه بیشترین مقدار کلروفیل a در غلظت صفر میلی مولار نیکل (کنترل) و غلظت ۶۰۰ میلی گرم بر لیتر اسیدهیومیک و کمترین مقدار کلروفیل a در غلظت ۰/۴ میلی مولار نیکل و غلظت ۲۰۰ میلی گرم بر لیتر اسیدهیومیک مشاهده گردید (شکل ۶). غلظت‌های مختلف اسیدهیومیک، نیکل و اثرات متقابل نیکل و اسیدهیومیک روی کلروفیل b اختلاف معنی داری نشان نداد.

مقایسه میانگین غلظت‌های مختلف نیکل روی کلروفیل کل نشان داد که اختلاف معنی داری 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 معنی داری نشان نداد. غلظت‌های مختلف نیکل و اسید-هیومیک روی کلروفیل a اختلاف معنی داری نشان داد و



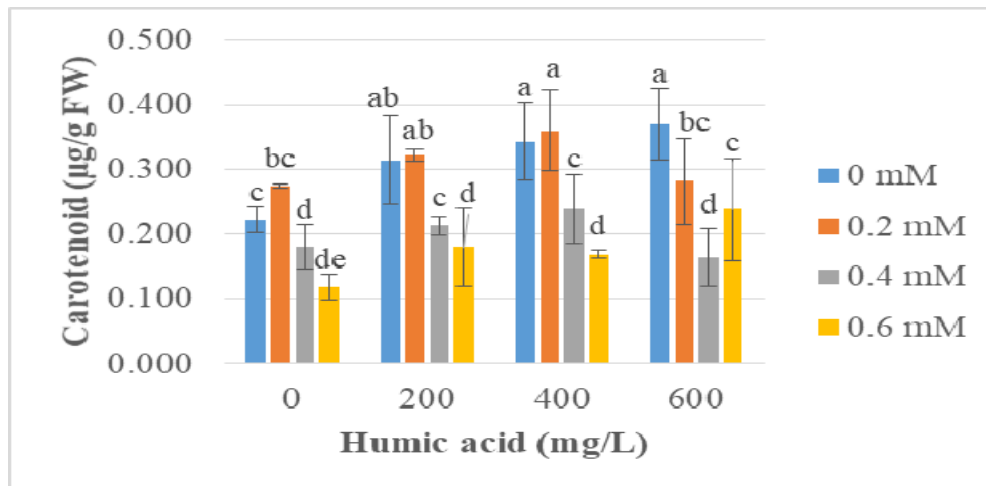
شکل ۶. مقایسه میانگین اثرات متقابل نیکل و اسیدهیومیک بر محتوای کلروفیل a گیاه خرفه

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

بر لیتر اسیدهیومیک و کمترین مقدار محتوای کاروتنوئید در غلظت ۰/۶ میلی مولار نیکل و غلظت صفر میلی گرم بر لیتر اسیدهیومیک مشاهده گردید (شکل ۷).

نتایج مقایسه میانگین اثرات متقابل نیکل و اسیدهیومیک براساس محتوای کاروتنوئید اختلاف معنی داری نشان داد، به طوریکه بیشترین مقدار محتوای کاروتنوئید در غلظت صفر میلی مولار نیکل (کنترل) و غلظت ۶۰۰ میلی گرم

ملیکا میر و همکاران: واکنش‌های مورفوفیزیولوژیکی گیاه خرفه (*Portulaca oleracea* L.) به اسید هیومیک تحت تنش نیکل.



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

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

محتوای کلروفیل تحت تیمار اسید هیومیک 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 اسید هیومیک روی محتوای پرولین نشان داد که اختلاف معنی‌داری بین غلظت‌های مختلف براساس محتوای پرولین وجود دارد، به طوری که با افزایش غلظت نیکل تا غلظت ۰/۴ میلی مولار محتوای پرولین افزایش یافت، در حالیکه غلظت ۰/۶ میلی مولار نیکل بدلیل ایجاد سمیت شدید منجر به کاهش محتوای پرولین گردید (جدول ۴). غلظت‌های مختلف اسید هیومیک و اثرات متقابل نیکل و اسید هیومیک روی محتوای پرولین اختلاف معنی‌داری نشان نداد. یکی از سازوکارهای مهم گیاهان عالی تحت تیمار تنش انباشت ترکیبات سازگار مانند پرولین است که به عنوان یک ماده

تأثیر اسید هیومیک به عواملی نظیر گونه، مرحله نمو گیاه، نحوه اعمال تیمار و غلظت آن وابسته است (Kovacic et al., 2009). گزارش شده است که اسید هیومیک 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 می‌بیند. 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 آمینولولینیک 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

که اثرات متقابل نیکل و اسیدهیومیک روی مالون‌دی‌آلدهید اختلاف معنی‌داری نشان نداد.

مالون‌دی‌آلدهید یک محصول پراکسیداسیون اسیدهای چرب اشباع نشده در فسفولیپ‌ها 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 آسیب‌های 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

محافظت‌کننده 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 می‌شود. 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 ۶۶/۰۱ میکرو گرم بر گرم وزن تر در تیمار شاهد به مقدار ۲۴۶/۷۹ میکرو گرم بر گرم وزن تر در غلظت ۴۰۰ 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 داد که اختلاف معنی‌داری بین غلظت‌های مختلف براساس محتوای مالون‌دی‌آلدهید وجود دارد، نتایج نشان داد که با افزایش غلظت نیکل تا غلظت ۰/۴ میلی مولار مالون‌دی‌آلدهید افزایش یافت، در حالیکه غلظت ۰/۶ میلی مولار نیکل بدلیل ایجاد سمیت شدید منجر به کاهش مالون‌دی‌آلدهید گردید (جدول ۴). مقایسه میانگین غلظت‌های مختلف اسید-هیومیک روی مالون‌دی‌آلدهید نشان داد که اختلاف معنی‌داری بین غلظت‌های مختلف اسیدهیومیک براساس مالون‌دی‌آلدهید وجود دارد و با افزایش غلظت اسیدهیومیک مقدار مالون‌دی‌آلدهید کاهش یافت (جدول ۴)، در حالی-

ملیکا میر و همکاران: واکنش‌های مورفوفیزیولوژیکی گیاه خرفه (*Portulaca oleracea* L.) به اسید هیومیک تحت تنش نیکل.

یافت و بیشترین میزان کاهش در غلظت  $0.4$  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، هنگامی که 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.

فعالیت آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز کاهش یافت (جدول ۴). 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 ۴). در حالیکه با افزایش غلظت اسیدهیومیک تا  $400$  میلی گرم در لیتر میزان فعالیت آنزیم کاتالاز افزایش یافت و در غلظت  $600$  میلی گرم در لیتر میزان فعالیت آنزیم کاتالاز کاهش یافت (جدول ۴). 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

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*.

فعالیت کاتالاز	سوپراکسید- دیسموتاز	مالون‌دی- الدهید	پرولین	کلروفیل کل	سطوح	تیمار
CAT (mmol H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> min <sup>-1</sup> mgprotein <sup>-1</sup> )	SOD (mmolH <sub>2</sub> O <sub>2</sub> mgprotein <sup>-1</sup> )	MDA (μmol/g ) (FW)	Proline (μg/g FW)	Chlo (μg/g FW)	Levels	Factor
1.05±0.15c	51.23±2.86a	0.15±0.00c	66.01±2.61d	35.52±1.98a	0	نیکل
1.10±0.10c	37.22±2.38b	0.17±0.01b	94.75±6.73c	31.24±2.36ab	0.2	Nickle (mM)
1.64±0.08b	33.96±1.56c	0.21±0.01a	246.79±9.25a	25.38±2.50bc	0.4	
2.14±0.09a	35.07±2.35c	0.17±0.01b	146.79±18.28b	22.44±2.34c	0.6	
1.36±0.16b	43.27±3.92a	0.19±0.02a	227.82±48.06a	26.49±2.11b	0	اسید-
1.42±0.17ab	38.32±3.81b	0.18±0.01ab	223.66±39.53ab	29.49±2.59ab	200	هیومیک Humic acid (mg/L)
1.54±0.15a	35.62±3.71bc	0.16±0.01c	219.87±45.78b	27.19±2.84b	400	
1.43±0.08ab	31.42±3.53c	0.17±0.01c	184.41±35.88c	34.393.06a	600	

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.

نتایج همبستگی بین صفات به روش ضریب همبستگی پیرسون نشان داد که بین اکثر صفات همبستگی وجود دارد. به طوری که بین برخی از صفات همبستگی مثبت و برخی صفات همبستگی از نوع منفی است. بیشترین مقدار همبستگی مثبت معنی داری بین مقدار وزن تر و خشک ( $r=1$ ) و بیشترین مقدار همبستگی منفی معنی داری بین پرولین و سوپراکسید دیسموتاز ( $r=-0.77$ ) مشاهده شد (جدول ۴).

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

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

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

SL: ارتفاع بوته، NB: تعداد شاخه جانبی، FW: وزن تر، DW: وزن خشک، Chlo: محتوای کلروفیل، MDA: مالون دی-

آلدئید، SOD: سوپر اکسید دیسموتاز و CAT: کاتالاز

### نتیجه گیری

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 محلول پاشی ۶۰۰ میلی گرم بر لیتر اسید هیومیک می‌تواند یک روش مناسب برای کاهش اثرات مضر نیکل و بهبود شاخص‌های فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی

سمیت نیکل باعث کاهش رشد و عملکرد گیاه گردید، تیمار گیاه با اسید هیومیک به عنوان 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 اسید هیومیک سبب بالا بردن 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. به طور کلی، کاربرد اسید هیومیک در گیاه خرفه گردد.



## 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. Nickel. 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 officinale* 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.

- 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 vignier, 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.
- Musco, 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.

ملیکا میر و همکاران : واکنش‌های مورفوفیزیولوژیکی گیاه خرفه (*Portulaca oleracea* L.) به اسید هیومیک تحت تنش نیکل.

- 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.

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

Melika Mir<sup>1</sup>, Daryush Talei<sup>2,\*</sup>, Farnaz Rafiei<sup>3</sup>

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