

مقاومت بالای گیاه دارویی فلومیس توپروزا به تنش مس با واسطه انباشت نیتریک اکساید

قادر حبیبی* و فرزانه رستم‌پور

گروه زیست‌شناسی، دانشگاه پیام نور، ایران

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۰۶/۱۴، تاریخ پذیرش نهایی: ۱۳۹۹/۰۲/۱۰)

چکیده

در این پژوهش، تأثیر غلظت‌های مختلف مس بر فعالیت دستگاه فتوسنتزی و ظرفیت آنتی‌اکسیدانت گیاه فلومیس توپروزا (*Phlomis tuberosa*) مورد بررسی قرار گرفت. گیاهان در محیط پرلیت به مدت پنج هفته رشد کردند و سپس با غلظت‌های صفر، ۱۰۰، ۲۰۰، ۳۰۰ و ۴۰۰ میکرومولار مس به مدت ۲۱ روز تیمار شدند. نتایج نشان داد که گیاه فلومیس توپروزا نسبت به ۱۰۰ و ۲۰۰ میکرومولار مس مقاوم است. این مقاومت به واسطه افزایش ظرفیت سیستم آنتی‌اکسیدانت گیاه حاصل شد. با این حال غلظت‌های زیاد مس (۳۰۰ و ۴۰۰ میکرومولار) تنش‌زا بودند و باعث افزایش انباشت هیدروژن پراکسید (H_2O_2) و مالون دی‌آلدئید (MDA) و کاهش معنی‌دار فعالیت کمپلکس آزادکننده اکسیژن (F_v/F_o) و شاخص کارایی فتوسیستم II (PI_{abs}) گردیدند. براساس شاخص غلظت مؤثر (EC_{50}) یعنی غلظتی از فلز که منجر به کاهش ۵۰ درصدی تولید ماده خشک می‌شود، آستانه سمیت مس برای گیاه فلومیس توپروزا، غلظت ۳۰۰ میکرومولار تعیین گردید. جالب آنکه گیاهانی که در معرض سطوح متوسط مس به مدت ۲۱ روز قرار گرفته بودند، بالاترین مقادیر انباشت نیتریک اکساید (NO) را نشان دادند و این انباشت با بالاترین فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانتیو و همچنین تداوم فتوسنتز همراه بود.

واژگان کلیدی: آستانه سمیت، غلظت مؤثر، فتوسیستم II، فلورسانس کلروفیل α ، فلومیس توپروزا، مس، نیتریک اکساید

مقدمه

۹۳۹۰۰۰ تن مس در سراسر جهان در طبیعت آزاد شده است (Singh *et al.*, 2003). بکارگیری گیاهان برای مقاصد گیاه پالایی، روشی ارزان محسوب می‌شود و در محیط‌های آسیب‌پذیر کاربرد دارد. بهترین انباشته‌گرها گیاهانی هستند که هم توانایی انباشت در سطح بالایی را دارند و در عین حال سرعت رشد حداکثری خود را در تولید بیومس حفظ می‌کنند. از میان ۷۰ گونه انباشته‌گر تنها ۳۷ مورد شناسایی شده‌اند که نسبت به مس انباشته‌گر هستند و در عین حال توان حفظ بیومس را دارا هستند (Sherameti and Varma, 2011). سمیت فلزات برای گیاهان معمولاً به قابلیت در دسترس

مس عنصری ریزمغذی و ضروری در گیاهان است که جز لاینفک آنزیم‌های متعدد انتقال الکترون بوده و در تسریع واکنش‌های ردوکس درون میتوکندری و کلروپلاست شرکت می‌کند. با این حال، تجمع زیاد مس در گیاهان، فرآیندهای فتوسنتز، تنفس، فعالیت آنزیم‌ها و یکپارچگی غشا را تحت تأثیر قرار می‌دهد و رشد را محدود می‌کند (Hippler *et al.*, 2018). به‌علت فعالیت‌های انسانی مقدار زیادی از مس در طبیعت آزاد شده است که به‌صورت نامطلوبی رشد گیاهان را تحت تأثیر قرار می‌دهد. در طی پنج دهه گذشته حدود

فلومیس توبروزا وجود ندارد. گیاه فلومیس توبروزا متعلق به خانواده لامیاسه بوده و در خاک‌های سبک (ماسه‌ای)، لومی و سنگین در همه pHها به خوبی رشد می‌کند (Javzan and Selenge, 2013). در صورتی که این گیاه بتواند مقادیری از سمیت مس را تحمل کند نتایج این تحقیق می‌تواند در پژوهش‌های مربوط به جستجوی کاندیدای مناسب گیاه پالایی از میان گونه‌های جنس فلومیس، مورد بهره‌برداری قرار گیرد. در این تحقیق، تأثیر غلظت‌های مختلف مس بر رشد، میزان انباشت فلز، فعالیت دستگاه فتوسنتزی و ظرفیت آنتی‌اکسیدانت گیاه فلومیس توبروزا مورد بررسی قرار خواهد گرفت و آستانه سمیت مس در این گونه گزارش خواهد شد.

مواد و روش‌ها

شرایط کشت گیاه: بذر گیاه فلومیس از کوه میشوداغ مرند تهیه شد. بذرها بعد از استریل شدن به وسیله محلول ضدعفونی کننده سدیم هیپوکلریت ۱۵ درصد به مدت یک هفته در یخچال به صورت مرطوب نگهداری شدند. سپس به تشتک یک لیتری با بستر پرلیت منتقل شدند و در شرایط تاریکی جوانه زدند سپس دانه‌رست‌ها در شرایط نوری اتاق کشت قرار داده شده و در طی دوره آزمایش (پنج هفته پیش از تیمار و سه هفته پس از تیمار) ضمن کنترل روزانه رطوبت بستر از طریق آبیاری با آب مقطر، هر پنج روز یکبار با محلول غذایی هوگلند تغذیه شدند (جدول ۱) (Johnson et al., 1957). گیاهان در شرایط اتاق رشد با دمای روزانه ۲۸-۲۵°C و دمای شبانه ۱۷-۱۵°C، رطوبت نسبی ۷۰ تا ۸۰ درصد و نور دورگی ۱۲ ساعت تاریکی و ۱۲ ساعت روشنایی و شدت نور $200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (فراهم شده با لامپ فلورسنت) قرار گرفتند. ۳۵ روز پس از رشد، تیمار مس در غلظت‌های ۱۰۰، ۲۰۰، ۳۰۰ و ۴۰۰ میکرومولار هنگام آبیاری اعمال گردید. ۲۱ روز پس از اعمال تیمار برداشت انجام شد. سنجش پارامترهای فلئورسانس کلروفیل بر روی سومین برگ جوان و قبل از برداشت و توزین گیاهان انجام شد و سنجش رنگیزه‌ها و متابولیت‌ها بر روی نمونه‌های تازه برداشت شده و یا نگهداری شده در ازت مایع

بودن فلزات در خاک‌ها و همچنین به شکل و فرم شیمیایی آنها در خاک مرتبط است (Verdejo, 2015). سالانه ۳۰ کیلوگرم آفت‌کش حامل فلز مس در هر هکتار مصرف می‌شود که در نهایت در خاک رسوب می‌کند (Behlau et al., 2016). مهم‌ترین علامت سمیت مس در گیاه، بروز تنش اکسیداتیو است. مس مازاد می‌تواند تولید گونه‌های فعال و مضر اکسیژن (ROS) شامل فنوکسی (RO)، رادیکال‌های هیدروکسیل (OH)، سوپراکسید (O_2^-)، پراکسی (ROO)، هیدروژن پراکسید (H_2O_2) و اکسیژن منفرد (O_2^1) را تسریع کند. تعدادی از گیاهان برای مقابله با اثرات سمی فلزات و شبه فلزات، فرآیند اجتناب (Avoidance) را در پیش گرفته و جذب فلز سمی را محدود می‌کنند. گیاهان رشدیافته در خاک‌هایی با غلظت بالای فلزات از طریق اتخاذ سازوکارهای مقاومت (Tolerance) شامل افزایش انباشت اسیدهای آمینه و اسیدهای آلی، اتصال فلزات به لیگاندهایی از قبیل متالوتیونین‌ها، فیتوکلانتین‌ها، تجمع آنها در محفظه درون واکوئل و همچنین فرانتظیم سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانت، با اثرات زیان‌بار ناشی از فلزات سنگین مقابله می‌کنند (Sherameti and Varma, 2011; Ambrosini et al., 2015). گیاهان برای مقابله با تنش اکسیداتیو حاصل از فلزات سنگین دارای دو سیستم پاسخ‌گر آنتی‌اکسیداتیو شامل سیستم آنزیمی (آنزیم‌های آسکوربات پراکسیداز، کاتالاز، سوپراکسید دیسموتاز و پراکسیداز و غیره) و سیستم غیرآنزیمی (آسکوربات، گلوکاتایون احیاشده، توکوفرول و غیره) بر علیه ROS هستند (Habibi, 2014). گزارش شده است که نیتریک اکسید (NO) به‌عنوان یک مولکول علامت‌دهنده دارای فعل و انفعال با ROS ناشی از سمیت فلزات سنگین است (Habibi, 2019). عملکرد NO در تنظیم سمیت کادمیم و کمبود آهن ثابت شده است (Habibi, 2019). سمیت روی سبب انباشت NO، تغییر در فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت و بهبود تحمل گیاه نسبت به سمیت این فلز می‌شود (Xu et al., 2010).

سازوکارهای سمیت مس در گیاهان زراعی به‌طور مفصل مورد بررسی قرار گرفته است. با این حال، اطلاعات دقیقی درباره سازوکارهای سمیت مس در گیاهان دارویی از جمله

جدول ۱- ترکیب محلول غذایی هوگلند تغییر یافته

عناصر کم مصرف		عناصر پر مصرف	
نام ترکیب	غلظت (μM)	نام ترکیب	غلظت (mM)
Fe-EDTA	۱۰۰	Ca(NO ₃) ₂	۲
H ₃ BO ₃	۲	MgSO ₄	۱
ZnSO ₄	۱	K ₂ SO ₄	۰/۹
CuSO ₄	۰/۴	KH ₂ PO ₄	۰/۲۵
MnSO ₄	۰/۴	KCl	۰/۱
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄	۰/۰۴		

انجام شد.

پارامترهای تعیین آستانه سمیت فلز: برای محاسبه پارامتر غلظت مؤثر (EC₅₀) از روش Paschke و همکاران (۲۰۰۶) استفاده گردید. برای محاسبه پارامتر نسبت پارتیشن (PR) از روش Hippler و همکاران (۲۰۱۸) استفاده گردید. ابتدا مقادیر مس ساقه و مس ریشه تعیین گردید و سپس با فرمول زیر نسبت پارتیشن به دست آمد:

$$PR = 100 \times (\text{مس ساقه} + \text{مس ریشه}) / \text{مس ساقه}$$

سنجش پارامترهای فلورسانس کلروفیل: جهت تعیین فلورسانس کلروفیل، از دستگاه فلورسانس سنج (دستگاه فلوریمتر Pocket PEA، شرکت Hansatech، انگلستان) استفاده شد. پارامترهای فلورسانس کلروفیل در برگ‌های سازش یافته با تاریکی (به مدت حداقل ۲۰ دقیقه) شامل F₀ (فلورسانس پایه) و F_m (فلورسانس بیشینه) اندازه‌گیری شد. برای رسم منحنی فلورسانس از تست JIP بهره گرفته شد. تست JIP داده‌های ثبت شده اولیه توسط دستگاه فلورسانس سنج را به پارامترهای بیوفیزیکی تبدیل می‌کند و کمیت مراحل جریان انرژی را طی فتوسیستم II تعیین می‌کند. برای رسم منحنی فلورسانس OJIP، از نور قرمز با طول موج ۶۲۷ نانومتر و شدت ۳۵۰۰ میکرومول/مترمربع/ثانیه (برای اطمینان از رسیدن به پیک F_m) استفاده شد. شاخص‌های زیر در اندازه‌گیری‌های فلورسانس اولیه مورد استفاده قرار گرفت: شدت فلورسانس بیشینه (F_m)، شدت فلورسانس در ۵۰ μs (به عنوان F_o در نظر گرفته شد)، شدت فلورسانس در ۳۰۰ μs (F_{300μs}) و شدت فلورسانس در

۲ میلی‌ثانیه (مرحله J). برای رسم منحنی‌گذار فلورسانس کلروفیل از نرم‌افزار PEA Plus V1.10 استفاده شد. در منحنی‌گذار فلورسانس OJIP برگ‌ها، گذار فلورسانس کلروفیل از سطح پایه «O» (فلورسانس کمینه) به سطح «J» که حدود ۲ میلی‌ثانیه طول می‌کشد، مربوط به احیا QA توسط فتوسیستم PSII است. تداوم فلورسانس از سطح «J» به سطح «I» که حدود ۳۰ میلی‌ثانیه طول می‌کشد با احیا کامل ذخایر پلاستوکوئینونی (PQ) مرتبط است. گذار فلورسانس از سطح «I» به سطح «P» نتیجه احیا جایگاه گیرنده الکترون فتوسیستم PSI است (Kalaji *et al.*, 2011). در نهایت پارامترهای کارایی فعالیت کمپلکس آزادکننده اکسیژن (F_v/F_o)، میزان جذب نور در فتوسیستم II به‌ازای هر مرکز واکنش (ABS/RC)، عملکرد کوانتومی انتقال الکترون (φE_o)، میزان انتقال الکترون در واحد تهییج شده برگ‌ها (ET_o/CS)، شاخص کارایی فتوسیستم‌ها (PI_{abs}) و بیشینه عملکرد کوانتومی فتوسیستم II (F_v/F_m) مورد مطالعه قرار گرفتند (Strasser *et al.*, 2004).

سنجش فعالیت آنزیم‌ها: فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز (SOD) براساس درصد ممانعت از احیا نیتروبلو تترازولیوم (NBT) به ترکیب ارغوانی رنگ دی‌فورمازان به‌وسیله رادیکال سوپراکسید (O₂^{•-}) حاصل از فتولیز ریوفلاوین، توسط آنزیم موجود در عصاره مورد اندازه‌گیری قرار گرفت (Giannopolitis and Ries, 1977). نمونه‌ها بلافاصله پس از برداشت در ازت مایع پودر شده و عصاره آنزیمی در بافر ۲۵ mM از هیدروکسی اتیل پیرازین اتان

بافر $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$ با غلظت ۵۰ mM و $\text{pH}=7$ استخراج شده و به مدت ۲۰ دقیقه در 14000g سانتریفوژ گردید. برای سنجش فعالیت آنزیم ۶۷۵ میکرولیتر از بافر فسفات سدیم ($\text{pH}=7$) حاوی ۰/۲ mM EDTA، ۱۷۵ میکرولیتر اسید آسکوربیک با غلظت ۰/۵ mM، ۵۰ میکروگرم سرم آلبومین گاوی (BSA) و ۵۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی با هم مخلوط شده و واکنش به وسیله افزودن ۵۰ میکرولیتر H_2O_2 با غلظت ۲۵۰ mM آغاز گردید. تغییرات جذب به مدت سه دقیقه توسط اسپکتروفتومتر اندازه گیری شده و فعالیت آنزیم با ضریب خاموشی اسید آسکوربیک ($2/6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) بر حسب واحد $\mu\text{M ascorbic acid mg}^{-1} \text{ protein min}^{-1}$ محاسبه گردید.

سنجش متابولیت های مرتبط با دفاع آنتی اکسیدانت:

سنجش مالون دی آلدئید (MDA) به عنوان معیاری برای بررسی میزان پراکسیداسیون لیپیدها براساس روش Boominathan و Doran (۲۰۰۲) صورت گرفت. عصاره برگ در محلول ۰/۱ درصد تری کلرواستیک اسید (TCA) استخراج شده و به مدت پنج دقیقه در 10000 دور سانتریفوژ گردید. نسبت ۱ به ۴ از روشناور با محلول ۲۰ درصد از تری کلرواستیک اسید حاوی ۰/۵ درصد تیوباربتوریک اسید در لوله آزمایش با هم مخلوط شده و به مدت ۳۰ دقیقه در حمام آب گرم با دمای ۹۵ درجه سانتی گراد قرار گرفت. سپس لوله ها به سرعت در یخ سرد شده و به مدت ۱۵ دقیقه در 10000 دور سانتریفوژ شدند. هم زمان با عصاره های برگ محلول های استاندارد در محدوده صفر تا ۱۰۰ نانومول از ۱،۱،۳،۳- تترائوکسی پروپان تهیه شده و جذب نمونه ها در 532 نانومتر توسط اسپکتروفتومتر مورد اندازه گیری قرار گرفت. در نهایت غلظت مالون دی آلدئید نمونه ها بر حسب نانومول بر گرم وزن تر محاسبه شد.

غلظت هیدروژن پراکسید (H_2O_2) براساس روش Velikova و همکاران (۲۰۰۰) به دست آمد. محلول استخراج برگ ها محلول تری کلرواستیک اسید (۰/۱ درصد وزنی به حجمی) بود. عصاره ها به مدت ۱۵ دقیقه در 12000 دور سانتریفوژ شده و روشناور مورد استفاده قرار گرفت. ۵۰۰ میکرولیتر از عصاره به یک میلی لیتر از محلول واکنشی شامل

سولفونیک اسید (HEPES) با $\text{pH}=7/8$ و حاوی اتیلن دی آمین تتراستیک اسید (EDTA) با غلظت ۰/۱ میلی مولار استخراج شد. عصاره ها به مدت ۱۵ دقیقه در 15000 دور سانتریفوژ شده و روشناور برای سنجش فعالیت مورد استفاده قرار گرفت. ۱۰۰ میکرولیتر از عصاره به یک میلی لیتر از محلول واکنشی شامل ۲۵ میلی مولار HEPES با $\text{pH}=7/6$ ، ۰/۱ میلی مولار EDTA، ۵۰ میلی مولار Na_2CO_3 ($\text{pH}=10/2$)، ۱۲ میلی مولار L-متیونین، ۷۵ میکرومولار NBT و ۱ میکرومولار ریبوفلاوین اضافه شده و مخلوط حاصل به مدت ۲۰ دقیقه در شدت نور ۱۵۰ میکرومول/مترمربع/ثانیه به منظور انجام واکنش قرار گرفت. برای تهیه نمونه های شاهد مخلوط فوق بدون افزودن عصاره آنزیمی تهیه گردید و جذب نمونه ها در 560 نانومتر توسط اسپکتروفتومتر اندازه گیری شد. یک واحد فعالیت آنزیم براساس غلظت پروتئین آنزیمی لازم برای القا ۵۰ درصد ممانعت از احیا NBT در مقایسه با نمونه های شاهد بدون عصاره آنزیمی محاسبه شده و به صورت واحد فعالیت بر میلی گرم پروتئین بیان گردید.

فعالیت آنزیم کاتالاز (CAT) مطابق روش Simon و همکاران (۱۹۷۴)، براساس کاهش جذب هیدروژن پراکسید (H_2O_2) در 240 نانومتر مورد اندازه گیری قرار گرفت. عصاره آنزیمی پس از پودر شدن نمونه ها در ازت مایع، در بافر فسفات با غلظت ۵۰ mM و $\text{pH}=7$ استخراج شده و به مدت ۱۰ دقیقه در 10000 دور سانتریفوژ گردید. برای سنجش فعالیت آنزیم غلظت مناسبی از عصاره به محلول واکنش شامل بافر فسفات ۵۰ میلی مولار ($\text{pH}=7$) و ۱۰ میلی مولار H_2O_2 افزوده شده و تغییرات جذب به مدت دو دقیقه توسط اسپکتروفتومتر مورد اندازه گیری قرار گرفت. در نهایت فعالیت آنزیم براساس ضریب خاموشی H_2O_2 ($0/041 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) بر حسب میکرومول هیدروژن پراکسید بر میلی گرم پروتئین در دقیقه محاسبه شد.

فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز مطابق روش Boominathan و Doran (۲۰۰۲) و براساس اکسیداسیون اسید آسکوربیک و کاهش جذب در 290 nm مورد اندازه گیری قرار گرفت. نمونه ها در ازت مایع پودر شده و عصاره آنزیمی در

تأثیر غلظت‌های مختلف مس بر میزان انباشت آن در ساقه و ریشه گیاه فلومیس توپروزا: بررسی مقدار انباشت مس در قسمت‌های مختلف گیاه فلومیس توپروزا در تیمارهای مختلف مس نشان داد که اعمال غلظت‌های ۱۰۰، ۲۰۰ و ۳۰۰ میکرومولار مس در محیط‌کشت گیاه نتوانست باعث افزایش معنی‌دار مقدار مس در ساقه شود (شکل ۱a). هر چند که با افزایش غلظت اعمال مس به ۴۰۰ میکرومولار مقدار انباشت این عنصر در اندام هوایی فلومیس توپروزا به‌طور معنی‌دار و قابل توجهی افزایش نشان داد. مطالعه تأثیر اعمال غلظت‌های مختلف مس در ریشه فلومیس توپروزا بر مقدار انباشت این عنصر در ریشه نشان داد که اعمال تیمار ۱۰۰ میکرومولار مس باعث افزایش معنی‌دار این عنصر در ریشه می‌شود. نتایج نشان داد که بیشترین مقدار انباشت مس در ریشه در تیمار ۴۰۰ میکرومولار مس به‌دست می‌آید (شکل ۱b).

بررسی شاخص نسبت پارتیشن مس (PR_{cu}) نشان داد که تیمار شاهد بیشترین سهم انباشت مس در ساقه را دارا است و کمترین نسبت پارتیشن (نسبت انباشت مس در ساقه نسبت به کل مس انباشته‌شده)، در تیمارهای ۱۰۰ و ۴۰۰ میکرومولار مس به‌دست آمد (تصویر ۱) (شکل ۱c).

تأثیر غلظت‌های مختلف مس بیومس ساقه و ریشه گیاه فلومیس توپروزا: بررسی شاخص‌های مختلف رشد در پاسخ به اعمال سطوح مختلف مس نشان داد که هر چند در تیمار ۱۰۰ میکرومولار رشد ریشه کاهش نشان داد ولی رشد ساقه در این شرایط متأثر نگردید در نتیجه مقدار بیومس کل گیاه تغییری نیافت با این حال با افزایش غلظت مس به ۲۰۰ میکرومولار کاهش بیومس مشاهده گردید (شکل ۲). از این رو می‌توان نتیجه گرفت که غلظت ۱۰۰ میکرومولار مس برای گیاه فلومیس توپروزا قابل تحمل است ولی با افزایش غلظت مس به ۲۰۰ میکرومولار کاهش شاخص رشد ملاحظه گردید. در این پژوهش بررسی شاخص EC_{50} برای ساقه و ریشه نشان داد که تیمار ۳۰۰ میکرومولار مس باعث از بین رفتن بیش از ۵۰ درصد عملکرد و بیومس ریشه و ساقه گردید. تعیین EC_{50} کل نیز نتایج فوق را تأیید کرد. این بدان معناست که

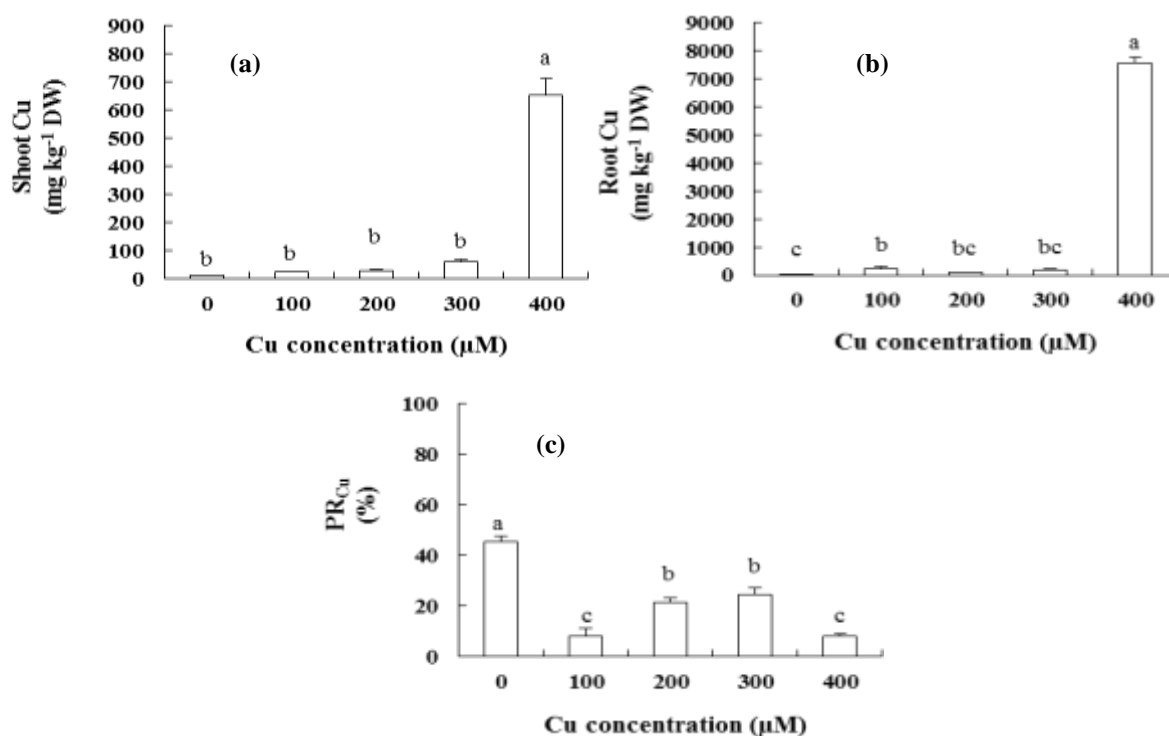
۱۰ میلی‌مولار بافر فسفات پتاسیم ($pH=7$) و یک مولار یدید پتاسیم اضافه شده و مخلوط حاصل به‌مدت ۶۰ دقیقه در تاریکی به‌منظور انجام واکنش قرار گرفت. جذب نمونه‌ها در ۳۹۰ نانومتر توسط اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شد. مقادیر براساس منحنی استاندارد H_2O_2 در محدوده صفر تا ۵۰ نانومول محاسبه شد.

اندازه‌گیری پروتئین کل: عصاره پروتئینی در بافر فسفات سدیم با غلظت ۵۰ میلی‌مولار و $pH=6.8$ استخراج شده و به‌مدت ۲۰ دقیقه در ۱۵۰۰۰ دور سانتریفوژ شد. از روش‌ناور حاصل برای سنجش پروتئین کل به روش برادفورد (Bradford, 1976) استفاده به‌عمل آمد.

تعیین غلظت نیتریک اکساید: غلظت نیتریک اکساید با روش توضیح داده‌شده به‌وسیله Hu و همکاران (۲۰۰۳) با اندکی تغییرات (Wu et al., 2016) تعیین شد. یک گرم از ماده خشک در هاون چینی پودر شده و سپس در ۸ میلی‌لیتر بافر استیک اسید خنک ۵۰ میلی‌مول با $PH\ 3/6$ و دارای ۴ درصد دی‌استات روی محلول، هضم شده و به‌مدت ۱۵ دقیقه و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفوژ شد. روش‌ناور جداشده و رسوبات به‌وسیله ۱ میکرومول از بافر استخراج شسته شد. رسوبات مانند شرایط توضیح داده‌شده در بالا دوباره سانتریفوژ شد و سپس هر دو روش‌ناور با هم مخلوط شدند و ۰/۱ گرم چارکول به آن اضافه شد. بعد از ورتکس (vortex) و صاف کردن، محلول موجود دوباره صاف شد. مخلوطی از ۱/۵ میلی‌لیتر فیلتر با ۱/۵ میلی‌لیتر از معرف گریز (Greiss) در دمای اتاق به‌مدت ۳۰ دقیقه قرار داده شد. جذب در ۵۴۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. غلظت نیتریک اکساید براساس منحنی استاندارد تهیه‌شده با $NaNO_2$ محاسبه شد.

این آزمایش در قالب طرح بلوک‌های کاملاً تصادفی با چهار تکرار اجرا شد. تجزیه و تحلیل داده‌ها با کمک نرم‌افزار سیگما استات (نسخه ۳/۵) با استفاده از تست توکی در سطح پنج درصد انجام گردید.

نتایج



شکل ۱- تأثیر اعمال سطوح مختلف مس بر میزان انباشت فلز در ساقه (a)، ریشه (b) و نسبت پارتیشن (c) (نسبت انباشت مس در ساقه نسبت به کل مس انباشته شده) در گیاه فلومیس توپروزا. مقادیر، میانگین چهار تکرار \pm StD (انحراف معیار) است. حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی دار بین میانگین ها در سطح احتمال پنج درصد است.

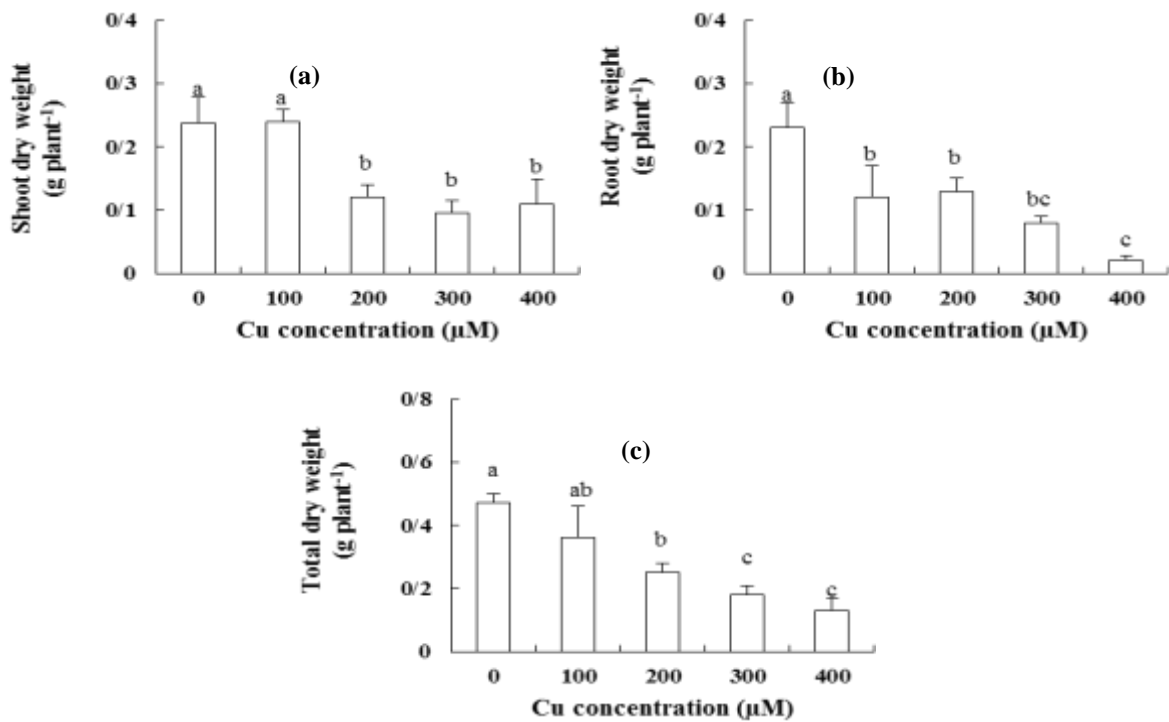


تصویر ۱- تأثیر اعمال ۲۱ روز سطوح مختلف مس بر مورفولوژی فلومیس توپروزا

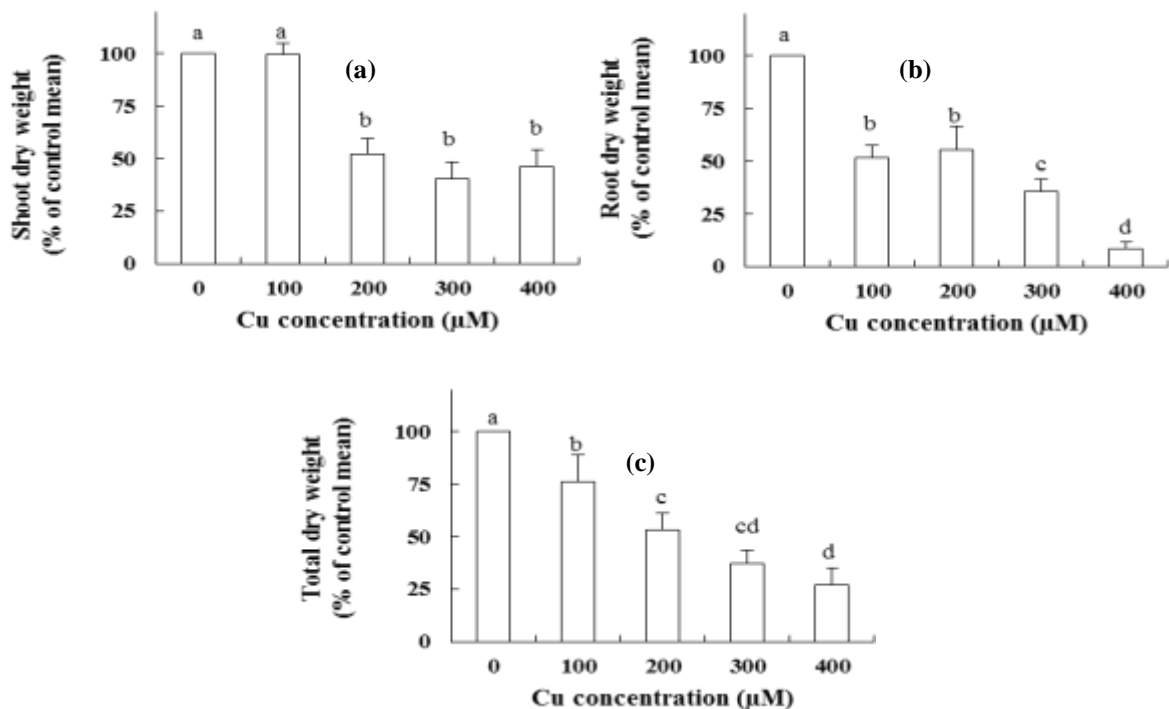
فتوشیمیایی فتوستتزر در گیاه فلومیس توپروزا از تست OJIP استفاده شد. غلظت های ۱۰۰ و ۲۰۰ میکرومولار مس باعث افزایش فاز IP در منحنی OJIP شده و شدت فلورسانس را افزایش دادند درحالی که غلظت های ۳۰۰ و ۴۰۰ میکرومولار مس باعث کاهش معنی دار فاز IP و F_m (شدت

غلظت ۳۰۰ میکرومولار مس باعث افت بیش از ۵۰ درصد بیومس کل فلومیس توپروزا شده است در نتیجه غلظت ۳۰۰ میکرومولار به عنوان EC_{50} گیاه تعیین شد (شکل ۳).

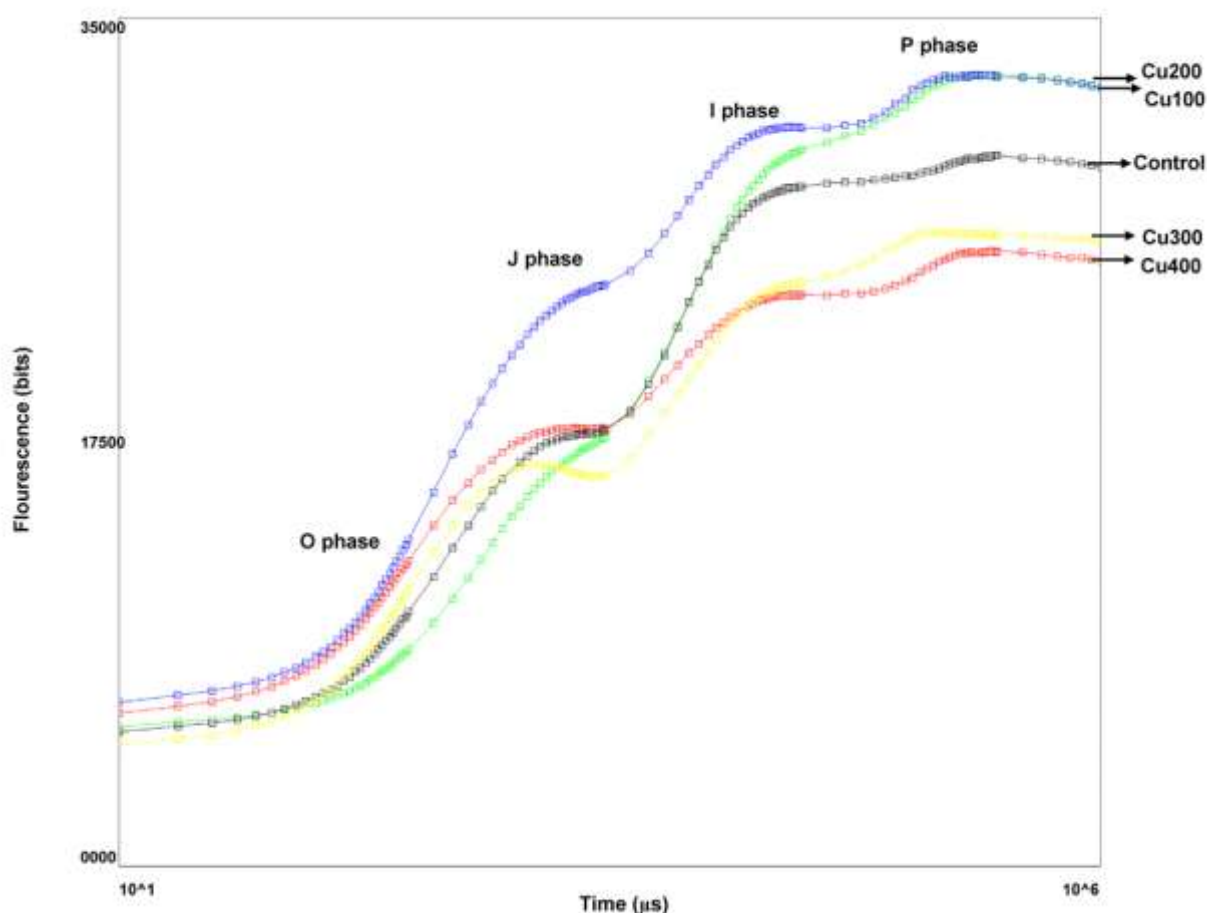
تأثیر غلظت های مختلف مس بر روی شاخص های فتوشیمیایی فتوستتزر در گیاه فلومیس توپروزا: برای آنالیز



شکل ۲- تأثیر اعمال سطوح مختلف مس بر بیومس و شاخص‌های رشد گیاه فلومیس توبروزا. مقادیر، میانگین چهار تکرار \pm StD (انحراف معیار) است. حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار بین میانگین‌ها در سطح احتمال پنج درصد است.



شکل ۳- تأثیر اعمال سطوح مختلف مس بر شاخص غلظت مؤثر (EC₅₀) یعنی غلظتی از مس که منجر به کاهش ۵۰ درصدی تولید ماده خشک می‌شود) در گیاه فلومیس توبروزا. مقادیر، میانگین چهار تکرار \pm StD (انحراف معیار) است. حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار بین میانگین‌ها در سطح احتمال پنج درصد است.

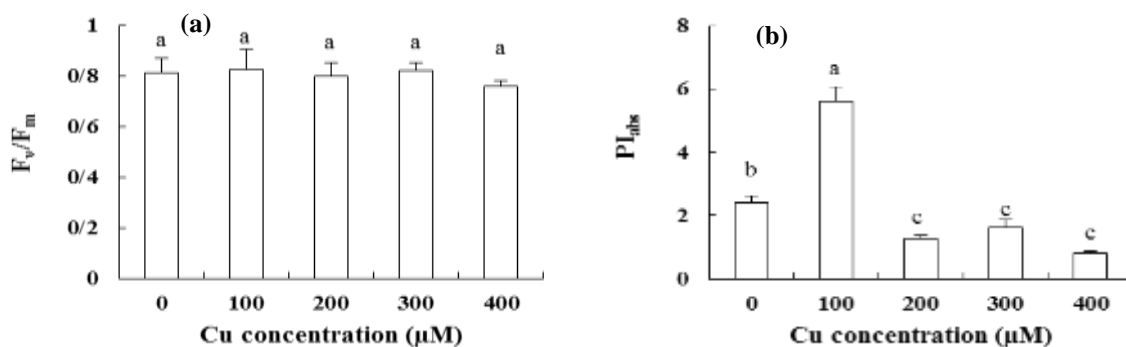


شکل ۴- تأثیر اعمال سطوح مختلف مس بر تغییرات شکل منحنی فلورسانس کلروفیل *a* (OJIP) (محور عمودی شدت فلورسانس و محور افقی زمان براساس میکروثانیه است) در گیاه فلومیس توپروزا. مقادیر، میانگین چهار تکرار \pm Std (انحراف معیار) است. حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی دار بین میانگین‌ها در سطح احتمال پنج درصد است.

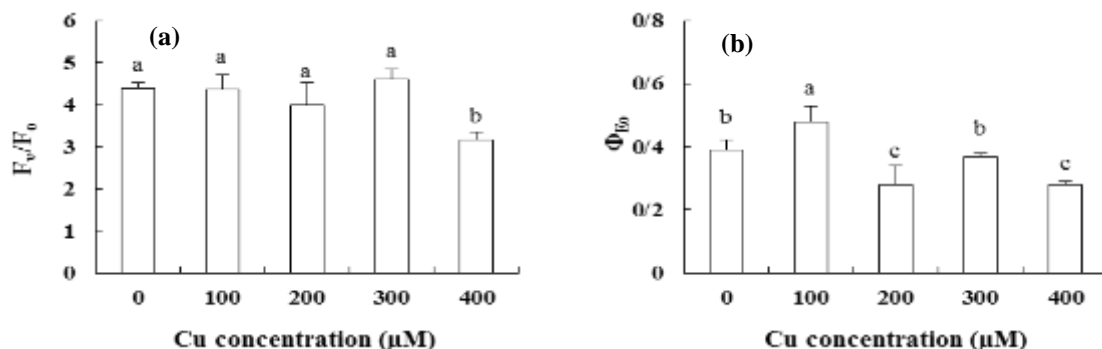
بالاتر مس در تیمارهای ۲۰۰، ۳۰۰ و ۴۰۰ میکرومولار باعث افت معنی دار پارامتر شاخص کارایی فتوسیستم‌ها گردید. اعمال غلظت ۴۰۰ میکرومولار مس باعث افت فعالیت کمپلکس فتولیزکننده آب (F_v/F_o) شد (شکل ۶a). تیمارهای ۲۰۰ و ۴۰۰ میکرومولار مس عملکرد کوانتومی انتقال الکترون (Φ_{Eo}) در برگ‌های فلومیس توپروزا را کاهش دادند (شکل ۶b).

تأثیر غلظت‌های مختلف مس بر فعالیت سیستم آنتی‌اکسیدانی در گیاه فلومیس: نتایج این بررسی نشان داد که با افزایش غلظت مس از ۱۰۰ به ۳۰۰ میکرومولار، فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت شامل آنزیم‌های SOD، CAT و APX افزایش معنی داری را نشان دادند (شکل ۷). بیشترین فعالیت

فلورسانس بیشینه) گردیدند و در نتیجه شدت فلورسانس کاهش یافت (شکل ۴). هیچ یک از غلظت‌های اعمال شده مس در تیمارهای مختلف تأثیر معنی داری بر مقدار شاخص بیشینه عملکرد کوانتومی فتوسیستم II (F_v/F_m) نداشتند (شکل ۵a). بررسی تغییرات منحنی فلورسانس OJIP با استفاده از تست JIP (این تست داده‌های ثبت شده اولیه توسط دستگاه فلورسانس‌سنج را به پارامترهای بیوفیزیکی تبدیل می‌کند و کمیت مراحل جریان انرژی را طی فتوسیستم II تعیین می‌کند) نشان داد که اعمال تیمار ۱۰۰ میکرومولار مس باعث افزایش معنی دار پارامتر شاخص کارایی فتوسیستم‌ها (PI_{abs}) در این گونه گیاهی گردید (شکل ۵b). درحالی‌که اعمال غلظت‌های



شکل ۵- تأثیر اعمال سطوح مختلف مس بر تغییرات بیشینه عملکرد کوانتومی فتوسیستم II (F_v/F_m) (a) و شاخص کارایی فتوسیستمها (PI_{abs}) (b) در گیاه فلومیس توپروزا. مقادیر، میانگین چهار تکرار $\pm StD$ (انحراف معیار) است. حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار بین میانگین‌ها در سطح احتمال پنج درصد است.



شکل ۶- تأثیر اعمال سطوح مختلف مس بر فعالیت کمپلکس فتولیزکننده آب (F_v/F_0) (a) و عملکرد کوانتومی انتقال الکترون (Φ_{Eo}) (b) در گیاه فلومیس توپروزا. مقادیر، میانگین چهار تکرار $\pm StD$ (انحراف معیار) است. حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار بین میانگین‌ها در سطح احتمال پنج درصد است.

ولی در تیمارهای ۳۰۰ و ۴۰۰ به مقدار شاهد برگشت (شکل ۹).

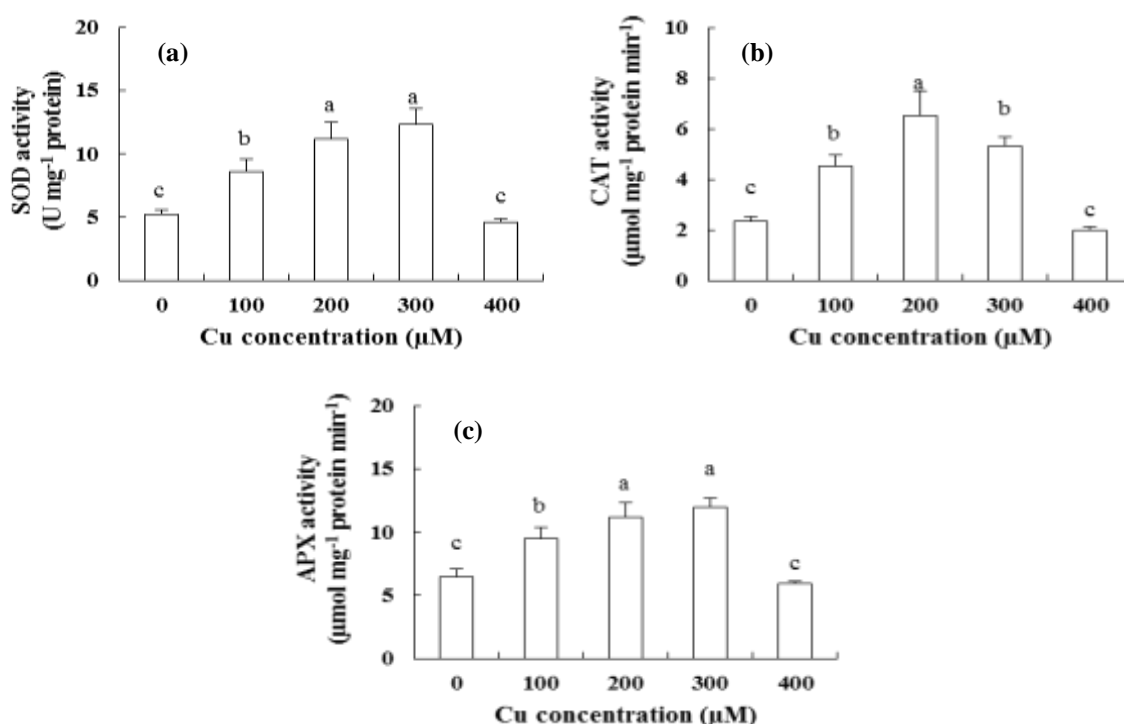
بحث

آستانه سمیت مس در فلومیس توپروزا: مطالعه میزان انباشت مس در بخش‌های مختلف فلومیس نشان داد که با افزایش سطوح تیمار مس از ۱۰۰ به ۴۰۰ میکرومولار شاخص PR_{Cu} (سهم‌بندی مس بین ساقه و ریشه) نسبت به شاهد کاهش معنی‌دار نشان داد که بیانگر انباشت مس در ریشه و کاهش انتقال آن به ساقه است. کاهش PR_{Cu} در گیاه فلومیس توپروزا با افزایش سطوح غلظت مس با نتایج آزمایش Hippler و

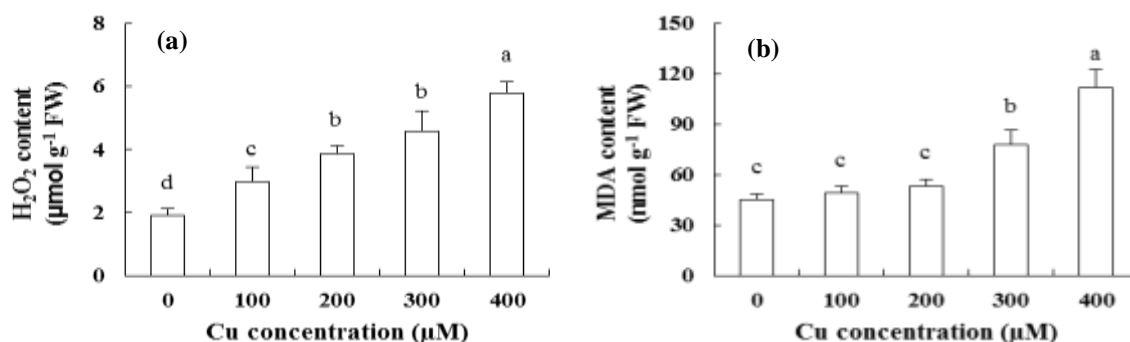
آنزیم‌های SOD و APX در تیمارهای ۲۰۰ و ۳۰۰ میکرومولار مس به‌دست آمد. با افزایش غلظت به ۴۰۰ میکرومولار فعالیت آنزیم‌ها به‌شدت افت کرد و به مقدار فعالیت آنزیم‌ها در تیمار شاهد رسید. با افزایش غلظت مس از ۱۰۰ به ۴۰۰ شاهد افزایش معنی‌دار مقدار H₂O₂ بودیم. بیشترین انباشت H₂O₂ در تیمار ۴۰۰ میکرومولار مشاهده گردید (شکل ۸a). مقدار MDA تنها در غلظت‌های ۳۰۰ و ۴۰۰ میکرومولار نسبت به شاهد معنی‌دار بود (شکل ۸b).

تأثیر غلظت‌های مس بر مقدار نیتریک اکسید (NO):

سنجش مقدار NO در برگ‌های فلومیس نشان داد که مقدار این پیک ثانویه در تیمارهای ۱۰۰ و ۲۰۰ افزایش معنی‌دار نشان داد



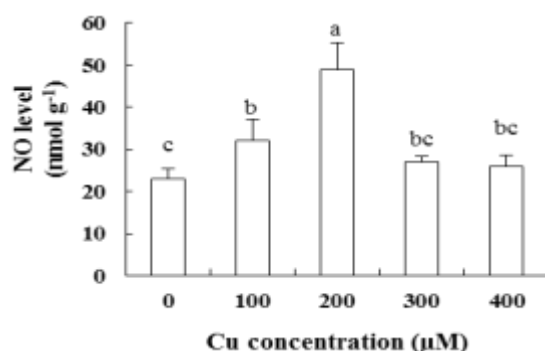
شکل ۷- تأثیر اعمال سطوح مختلف مس بر فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت شامل آنزیم‌های (a) SOD، (b) CAT و (c) APX در گیاه فلومیس توپروزا. مقادیر، میانگین چهار تکرار \pm StD (انحراف معیار) است. حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار بین میانگین‌ها در سطح احتمال پنج درصد است.



شکل ۸- تأثیر اعمال سطوح مختلف مس بر انباشت (a) H₂O₂ و (b) MDA در گیاه فلومیس توپروزا. مقادیر، میانگین چهار تکرار \pm StD (انحراف معیار) است. حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار بین میانگین‌ها در سطح احتمال پنج درصد است.

فلومیس همبستگی مثبت وجود دارد. با افزایش غلظت مس اعمال‌شده از ۱۰۰ میکرومولار به ۲۰۰ میکرومولار، وزن خشک ساقه فلومیس کاهش معنی‌دار نشان داد (شکل ۲) هر چند تیمار ۱۰۰ میکرومولار اثر معنی‌داری بر وزن خشک ساقه نداشت ولی باعث کاهش معنی‌دار وزن خشک ریشه گردید.

همکاران (۲۰۱۸) در گیاه Citrus مطابقت داشت. آنها نشان دادند که با افزایش غلظت مس، پارامتر PR_{Cu} کاهش می‌یابد. همچنین مطالعه حاضر نشان داد که بیشترین انباشت مس در ساقه و ریشه فلومیس در تیمار ۴۰۰ میکرومولار به‌دست آمد. این نتایج ثابت می‌کنند که بین انباشتگی مس در ساقه و ریشه



شکل ۹- تأثیر اعمال سطوح مختلف مس بر مقدار نیتریک اکسید (NO) در گیاه فلومیس توروزا. مقادیر، میانگین چهار تکرار \pm StD (انحراف معیار) است. حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی دار بین میانگین‌ها در سطح احتمال پنج درصد است.

دهنده غیرفعال شدن پروتئین‌ها در ساختار فتوسیستم II است (Hazrati *et al.*, 2016; Habibi, 2017)، که در همه برگ‌ها در پاسخ به تنش مس مشاهده شد.

بررسی تأثیر غلظت ۲۰۰ میکرومولار بر تغییرات منحنی فلورسانس در برگ‌های فلومیس نشان داد که شدت فلورسانس در فاز J در برگ‌های تیمار شده با مس افزایش یافته است. افزایش شدت فلورسانس در فاز J با کاهش ذخایر کوئینون A احیا (QAH2) و پلاستوکوئینون احیا (PQH2) مرتبط است (Habibi, 2017). کاهش غیرنرمال ذخایر QAH2 و PQH2 احتمالاً نشان می‌دهد که جریان انتقال در ناقل‌های پایین دست در حال بلوکه شدن است (Strasser *et al.*, 2004).

شاخص F_v/F_m یکی از شاخص‌های مهم جهت تعیین مقاومت به انواع تنش‌ها است (Rousseau *et al.*, 2013). عدم تغییر معنی دار مقدار بیشینه عملکرد کوانتومی فتوسیستم II در برگ‌های فلومیس توروزا در شرایط تنش مس این واقعیت را نشان می‌دهد که مهار نوری رخ نداده است (Xu *et al.*, 2014). مقدار بالای پارامتر PI_{abs} در برگ‌های تیمار شده با ۱۰۰ میکرومولار نسبت به برگ‌های شاهد نشان داد که کاربرد ۱۰۰ میکرومولار مس باعث افزایش ظرفیت فتوستتزی در برگ‌های فلومیس گردید. همچنین بررسی جزئی‌تر اثر مس بر سایر پارامترهای فلورسانس کلروفیل نشان داد که علت کاهش شاخص کارایی فتوسیستم‌ها در تنش مس، کاهش کارایی فعالیت کمپلکس آزادکننده اکسیژن (F_v/F_o) و عملکرد

بررسی بیومس کل گیاه در پاسخ به سطوح مختلف مس نشان داد که تیمار ۱۰۰ میکرومولار مس تأثیر منفی بر رشد فلومیس نداشته و این مقدار از مس اعمال شده برای فلومیس قابل تحمل بود.

برای تعیین میزان آستانه سمیت عناصر سنگین از جمله مس در گیاهان از شاخص EC_{50} بهره گرفته می‌شود. این پارامتر برای ساقه و ریشه و کل گیاه به صورت جداگانه تعریف می‌گردد. برای مثال EC_{50} ساقه غلظتی از فلز سنگین است که باعث از بین رفتن بیش از ۵۰ درصد بیومس ساقه می‌شود (Paschke *et al.*, 2006). در این تحقیق، میزان EC_{50} ساقه و ریشه و همچنین EC_{50} کل برای گیاه فلومیس توروزا غلظت ۳۰۰ میکرومولار مس تعیین گردید. غلظت ۴۰۰ میکرومولار مس باعث کاهش ۷۲ درصدی بیومس فلومیس شد. کاهش قابل توجه بیومس در پاسخ به تنش مس در گیاه *Phyllostachys fastuosa* نیز گزارش شده است (Collin *et al.*, 2014).

فعالیت فتوشیمیایی فلومیس در غلظت‌های مختلف مس:

گذار فلورسانس از سطح «I» به سطح «P» نتیجه احیا جایگاه گیرنده الکترون فتوسیستم PSI است (Kalaji *et al.*, 2011). با اعمال غلظت‌های ۳۰۰ و ۴۰۰ میکرومولار مس، منحنی فلورسانس برگ‌ها شکل مسطح‌تری را نشان داد و شدت فلورسانس در فاز I-P کاهش شدیدی یافت. کاهش فاز I-P که با کاهش شدت فلورسانس بیشینه (F_m) در ارتباط است نشان

می‌دهد (Imran *et al.*, 2018; Nabi *et al.*, 2019). در این تحقیق نیز تحمل بالای فلومیس به تنش ۱۰۰ و ۲۰۰ میکرومولار مس با افزایش غلظت NO داخلی همراه بود و نقش مؤثری را در افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت ایفا نمود. افزایش NO داخلی در تیمارهای ۱۰۰ و ۲۰۰ با افزایش فعالیت آنزیم‌های SOD، CAT و APX در تیمارهای ۱۰۰ و ۲۰۰ و کاهش معنی‌دار NO داخلی در تیمار ۴۰۰ میکرومولار با کاهش معنی‌دار آنزیم‌ها همبستگی کامل دارد. افزایش فعالیت آنزیم‌های SOD، CAT و APX در غلظت متعادل مس و کاهش فعالیت در غلظت‌های سمی در این تحقیق، با نتایج Hippler و همکاران (۲۰۱۸) مطابقت داشت. افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت در سطوح مختلف روی همزمان با افزایش انباشت پیک ثانویه NO نشان داد که این مولکول سیگنال نقش مهمی در پاسخ به تنش روی دارد. هر چند جزئیات این یافته نیازمند روشن شدن در تحقیقات بیشتر است.

نتیجه‌گیری

بررسی بیومس کل گیاه در پاسخ به سطوح مختلف مس نشان داد که تیمار ۱۰۰ میکرومولار مس تأثیر منفی بر رشد فلومیس نداشته و این مقدار از مس اعمال شده برای فلومیس قابل تحمل بود. در این تحقیق، میزان EC_{50} ساقه و ریشه و همچنین EC_{50} کل برای گیاه فلومیس توپروزا غلظت ۳۰۰ میکرومولار مس تعیین گردید. عدم تغییر معنی‌دار مقدار بیشینه عملکرد کوانتومی فتوسیستم II در برگ‌های فلومیس در شرایط تنش مس این واقعیت را نشان می‌دهد که مهار نوری رخ نداده است. غلظت‌های ۳۰۰ و ۴۰۰ میکرومولار مس به‌خاطر تولید مقادیر بالایی از MDA تنش‌زا بودند به‌طوری‌که غلظت ۴۰۰ میکرومولار مس باعث کاهش ۷۲ درصدی بیومس فلومیس شد. براساس داده‌های EC_{50} آستانه سمیت مس در این گیاه غلظت ۳۰۰ میکرومولار مس تعیین گردید. افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت در سطوح مختلف مس همزمان با افزایش انباشت پیک ثانویه NO نشان داد که این مولکول سیگنال، نقش مهمی در پاسخ به تنش فلزات سنگین مس دارد.

کوانتومی انتقال الکترون (ϕE_o) در برگ‌های فلومیس بود. همان‌طور که افزایش شاخص کارایی فتوسیستم‌ها در تیمار ۱۰۰ میکرومولار مس با افزایش عملکرد کوانتومی انتقال الکترون همراه بود.

فعالیت آنتی‌اکسیدانت فلومیس در پاسخ به سطوح

مختلف مس: کاهش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت در تیمار ۴۰۰ میکرومولار احتمالاً به‌خاطر آسیب به پروتئین‌ها و لیپیدهای غشایی است (Hippler *et al.*, 2018) چرا که این کاهش فعالیت با افزایش شاخص پراکسیداسیون لیپیدهای غشا یعنی مقدار MDA همبستگی مثبت داشت. بیشترین مقدار MDA در تیمار ۴۰۰ میکرومولار دیده شد که با کاهش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت همراه بود. بیشترین فعالیت آنزیم‌ها متعلق به تیمار ۲۰۰ میکرومولار مس بود. گیاه فلومیس توپروزا با افزایش مؤثر فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت در غلظت ۲۰۰ میکرومولار به‌خوبی توانست از پراکسیداسیون لیپیدها در این تیمار ممانعت کند. این نتایج با یافته‌های Shams و همکاران (۲۰۱۹) در گیاه *Lactuca sativa* که نقش آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت در افزایش تحمل به تنش مس را نشان داده‌اند، مطابقت داشت. هر چند مقادیر H_2O_2 با افزایش غلظت مس در محیط‌کشت، افزایش معنی‌دار نشان داد ولی افزایش مقدار انباشت H_2O_2 در تیمار ۱۰۰ و ۲۰۰ میکرومولار مس نسبت به تیمار ۴۰۰ میکرومولار کمتر بود. به‌عبارت دیگر افزایش غلظت H_2O_2 در تیمار ۱۰۰ و ۲۰۰ میکرومولار به‌خاطر فعالیت مؤثر آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت نتوانست باعث تخریب غشاها گردد. داده‌های MDA با مقدار MDA شاهد تفاوت معنی‌دار نداشت. غلظت‌های ۳۰۰ و ۴۰۰ میکرومولار مس به‌خاطر تولید مقادیر بالایی از MDA تنش‌زا بودند.

افزایش فعالیت آنزیم‌های سیستم آنتی‌اکسیدانت در تیمارهای ۲۰۰ و ۱۰۰ میکرومولار با افزایش انباشت پیک ثانویه NO همبستگی داشت. نیتریک اکسید به‌عنوان یک پیک ثانویه نقش مهمی در افزایش تحمل تنش فلزات سنگین ایفا می‌کند و غلظت درونی آن در پاسخ به تنش‌های مختلف از قبیل خشکی، شوری و فلزات سنگین افزایش معنی‌دار نشان

فلزات را تغییر می‌دهند. بنابراین نتایج حاصله از آزمایش‌های کشت کنترل‌شده در مقایسه با نتایج حاصله از آزمایش‌های رویشگاه طبیعی متفاوت خواهد بود. از این رو پیشنهاد می‌شود آستانه سمیت فلزات مذکور در شرایط کشت خاکی و همچنین در رویشگاه طبیعی در تحقیقات آتی مورد بررسی قرار گیرد.

از آنجایی که آستانه سمیت برای بسیاری از گیاهان در گلخانه و یا آزمایشگاه، با رشد گیاهان در محلول‌های غذایی، با غلظت‌های مشخص از فلزات بررسی می‌شود درحالی که این شرایط با شرایط واقعی رویشگاه طبیعی متفاوت است. عواملی از قبیل زیادی میکروارگانسیم‌های محیط ریشه مانند مایکوریز و اتصال این فلزات به مواد آلی خاک، وجود علفخواران، رقابت و پاتوژن‌ها توانایی گیاهان برای تحمل تنش سمیت

منابع

- Ambrosini, V. G., Rosa, D. J., Prado, J. P. C., Borghezian, M., de Melo, G. W. B., de Sousa Soares, C. R. F., Comin, J. J., Simao, D. G. and Brunetto, G. (2015) Reduction of copper phytotoxicity by liming: A study of the root anatomy of young vines (*Vitis labrusca* L.). *Plant Physiology and Biochemistry* 96: 270-280.
- Behlau, F., Fonseca, A. E. and Belasque J. (2016) A comprehensive analysis of the *Asiatic citrus* canker eradication programme in Sao Paulo state, Brazil, from 1999 to 2009. *Plant Pathology* 65: 1390-1399.
- Sherameti, I. and Varma, A. (2011) Plants in heavy metal soils. In: *Detoxification of Heavy Metals*. (ed. Bothe, H.) Pp. 35-57. Springer, Berlin, Heidelberg.
- Boominathan, R. and Doran, P. M. (2002) Ni induced oxidative stress in roots of the Ni hyperaccumulator, *Alysum bertoloni*. *New Phytologist* 156: 202-205.
- Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248-254.
- Collin, B., Doelsch, E., Keller, C., Cazevieuille, P., Tella, M., Chaurand, P. and Meunier, J. D. (2014) Evidence of sulfur-bound reduced copper in bamboo exposed to high silicon and copper concentrations. *Environmental Pollution* 187: 22-30.
- Giannopolitis, C. N. and Ries, S. K. (1977) Superoxide dismutases: I. Occurrence in higher plants. *Plant Physiology* 59: 309-314.
- Habibi, G. (2017) Physiological, photochemical and ionic responses of sunflower seedlings to exogenous selenium supply under salt stress. *Acta Physiologiae Plantarum* 39: 213.
- Habibi, G. (2019) Role of exogenous hydrogen peroxide and nitric oxide on improvement of abiotic stress tolerance in plants. In: *Plant Tolerance to Environmental Stress: Role of Phytoprotectants*. (eds. Hasanuzzaman, M., Fujita, M., Oku, H. and Islam, M. T.) Pp. 159-174. CRC Press.
- Habibi, G., (2014) Hydrogen peroxide (H_2O_2) generation, scavenging and signaling in plants. In: *Oxidative Damage to Plants: Antioxidant Networks and Signaling*. (ed. Ahmad, P.) Pp. 557-574. Elsevier, USA.
- Hazrati, S., Tahmasebi-Sarvestani, Z., Modarres-Sanavy, S. A. M., Mokhtassi-Bidgoli, A. and Nicola, S. (2016) Effects of water stress and light intensity on chlorophyll fluorescence parameters and pigments of *Aloe vera* L. *Plant Physiology and Biochemistry* 106: 141-148.
- Hippler, F. W. R., Boaretto, R. M., Dosis, V. L., Quaggio, J. A., Azevedo, R. A. and Mattos-Jr, D. (2018) Oxidative stress induced by Cu nutritional disorders in Citrus depends on nitrogen and calcium availability. *Scientific Reports* 8: 1641.
- Hu, X., Fang, J., Cai, W. and Tang, Z. (2003) NO-mediated hypersensitive responses of rice suspension cultures induced by incompatible elicitor. *Chinese Science Bulletin* 48: 358-363.
- Imran, Q. M., Hussain, A., Lee, S. U., Mun, B. G., Falak, N., Loake, G. J. and Yun, B. W. (2018) Transcriptome profile of NO-induced Arabidopsis transcription factor genes suggests their putative regulatory role in multiple biological processes. *Scientific Reports* 8: 771.
- Javzan, S. and Selenge, D. (2013) Phytochemical study of aerial parts from *Phlomis tuberosa* L. *Mongolian Journal of Chemistry* 14: 20-24.
- Johnson, C. M., Stout, P. R., Broyer, T. C. and Carlton, A. B. (1957) Comparative chlorine requirements of different plant species. *Plant and Soil* 8: 337-353.
- Kalaji, H. M., Bosa, K., Koscielniak, J. and Zuk-Golaszewska, K. (2011) Effects of salt stress on photosystem II efficiency and CO_2 assimilation of two Syrian barley landraces. *Environmental and Experimental Botany* 73: 64-72.
- Nabi, R. B. S., Tayade, R., Hussain, A., Kulkarni, K. P., Imran, Q. M., Mun, B. G. and Yun, B. W. (2019) Nitric oxide regulates plant responses to drought, salinity, and heavy metal stress. *Environmental and Experimental Botany* 161: 120-133.

- Paschke, M. W., Perry, L. G. and Redente, E. F. (2006) Zinc toxicity thresholds for reclamation forb species. *Water, Air, and Soil Pollution* 170: 317-330.
- Rousseau, C., Belin, E., Bove, E., Rousseau, D., Fabre, F., Berruyer, R. and Boureau, T. (2013) High throughput quantitative phenotyping of plant resistance using chlorophyll fluorescence image analysis. *Plant Methods* 9: 17.
- Shams, M., Ekinci, M., Turan, M., Dursun, A., Kul, R. and Yildirim, E. (2019) Growth, nutrient uptake and enzyme activity response of Lettuce (*Lactuca sativa* L.) to excess copper. *Environmental Sustainability* 2: 67-73.
- Singh, O. V., Labana, S., Pandey, G., Budhiraja, R. and Jain, R. K. (2003) Phytoremediation: An overview of metallic ion decontamination from soil. *Applied Microbiology and Biotechnology* 61: 405-412.
- Papageorgiou, G. Ch. (2004) Analysis of the chlorophyll a fluorescence transient. In: *Chlorophyll a Fluorescence* (eds. Strasser, R. J., Tsimilli-Michael, M. and Srivastava, A.) Pp. 321-362. Springer, Dordrecht.
- Simon, L. M., Fatrai, Z., Jonas, D. E. and Matkovic, B. (1974) Study of peroxide metabolism enzymes during the development of *Phaseolus vulgaris*. *Biochemie und Physiologie der Pflanzen* 166: 387-392.
- Velikova, V., Yordanov, I. and Edreva, A. (2000) Oxidative stress and some antioxidant systems in acid rain-treated bean plants-protective role of exogenous polyamines. *Plant Science* 151: 59-66.
- Verdejo, J., Ginocchio, R., Sauve, S., Salgado, E. and Neaman, A. (2015) Thresholds of copper phytotoxicity in field-collected agricultural soils exposed to copper mining activities in Chile. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 122: 171-177.
- Wu, Q., Su, N., Zhang, X., Liu, Y., Cui, J. and Liang, Y. (2016) Hydrogen peroxide, nitric oxide and UV RESISTANCE LOCUS8 interact to mediate UV-B-induced anthocyanin biosynthesis in radish sprouts. *Scientific Reports* 6: 29164.
- Xu, H., Liu, G., Liu, G., Yan, B., Duan, W., Wang, L. and Li, S. (2014) Comparison of investigation methods of heat injury in grapevine (*Vitis*) and assessment to heat tolerance in different cultivars and species. *BMC Plant Biology* 14: 156.
- Xu, J., Yin, H., Li, Y. and Liu, X. (2010) Nitric oxide is associated with long-term zinc tolerance in *Solanum nigrum*. *Plant Physiology* 154: 1319-1334.

Copper-stress tolerance induced in *Phlomis tuberosa* depends on nitric oxide accumulation

Ghader Habibi* and Farzane Rostampoor

Department of Biology, Payame Noor University (PNU), Iran

(Received: 05/09/2019, Accepted: 29/04/2020)

Abstract

In this study, we compared the impact of high Cu concentrations on the photosynthetic apparatus and antioxidant capacity of the *Phlomis tuberosa*. Plants were grown in perlite culture for 5 weeks, and then treated with 0, 100, 200, 300 and 400 μM Cu for 21 days. Results indicated that *Phlomis tuberosa* plants showed tolerance to 100 and 200 μM Cu. This increased tolerance was achieved through enhancement in antioxidant system activity. However, exposure to high Cu (300 and 400 μM) showed the highest level of stress which led to higher hydrogen peroxide (H_2O_2) and malondialdehyde (MDA) levels and lower inferred oxygen evolving complex activity (F_v/F_o) and calculated Performance Index (PI_{abs}) values. Based on effective concentration (EC_{50} – substrate Cu concentration resulting in 50% biomass reduction) parameter, Cu toxicity thresholds for *Phlomis tuberosa* plants were determined at substrate Cu levels up to 300 μM . Interestingly, plants exposed to medium Cu levels for 21 days exhibited higher nitric oxide (NO) accumulation in the leaves, which was associated with enhanced levels of antioxidative enzyme activities, whilst maintaining photosynthesis.

Keywords: Toxicity thresholds, Effective concentration, Photosystem II, Chlorophyll a fluorescence, *Phlomis tuberosa*, Copper, Nitric oxide

Corresponding author, Email: gader.habibi@gmail.com