مقاله پژوهشی

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

قادر حبیبی* و فرزانه رستم‌پور

گروه زیست‌شناسی، دانشگاه پیام نور، ایران

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۰۶/۱٤، تاریخ پذیرش نهایی: ۱۳۹۹/۰۲/۱۰)

چکیده

در این پژوهش، تأثیر غلظت‌های مختلف مس بر فعالیت دستگاه فتوسنتزی و ظرفیت آنتی‌اکسیدانت گیاه فلومیس توبروزا (*Phlomis tuberosa*) مورد بررسی قرار گرفت. گیاهان در محیط پرلیت به‌مدت پنج هفته رشد کردند و سپس با غلظت‌های صفر، ۱۰۰، ۲۰۰، ۳۰۰ و ٤۰۰ میکرومولار مس به‌مدت ۲۱ روز تیمار شدند. نتایج نشان داد که گیاه فلومیس توبروزا نسبت به ۱۰۰ و ۲۰۰ میکرومولار مس مقاوم است. این مقاومت به‌واسطه افزایش ظرفیت سیستم آنتی‌اکسیدانت گیاه حاصل شد. با این حال غلظت‌های زیاد مس (۳۰۰ و٤۰۰ 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 کارآیی 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 توبروزا، غلظت ۳۰۰ میکرومولار تعیین گردید. جالب آنکه گیاهانی که در معرض سطوح متوسط مس به‌مدت ۲۱ روز قرار گرفته بودند، بالاترین مقادیر انباشت نیتریک اکساید (NO) را نشان دادند و این انباشت با بالاترین فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیداتیو و همچنین تداوم فتوسنتز همراه بود.

واژگان کلیدی: آستانه سمیت، غلظت مؤثر، فتوسیستم II، فلورسانس کلروفیل *a*، فلومیس توبروزا، مس، نیتریک اکساید

مقدمه

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 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

*نویسنده مسؤل، نشانی پست الکترونیکی: gader.habibi@gmail.com

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2026-11-18]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1399.9.38.15.2]

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 درنهایت 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 ($^1O_2$) 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، فیتوکلاتین‌ها، تجمع آنها در محفظه درون واکوئل و همچنین فراتنظیم 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، گلوتاتیون 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 فلومیس توبروزا وجود ندارد. گیاه فلومیس توبروزا متعلق به خانواده لامیاسه بوده و در خاک‌های سبک (ماسه‌ای)، لومی و سنگین در همه pHها به‌خوبی رشد می‌کند (Javzan and Selenge, 2013). در صورتی‌که 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 استریل‌شدن به‌وسیله محلول ضدعفونی کننده سدیم هیپوکلریت ۱۵ درصد به‌مدت یک هفته در یخچال به‌صورت 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 آب‌مقطر، 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°C–۲۵ و دمای شبانه ۱۷°C–۱۵، رطوبت نسبی ۷۰ تا ۸۰ درصد و نور دورگی ۱۲ ساعت تاریکی و ۱۲ ساعت روشنایی و شدت نور $200 \mu mol\ m^{-2}\ s^{-1}$ (فراهم‌شده 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 فلوئورسانس کلروفیل بر روی سومین برگ جوان و قبل از برداشت و توزین گیاهان انجام شد و سنجش رنگیزه‌ها و متابولیت‌ها بر روی نمونه‌های تازه برداشت‌شده و یا نگهداری‌شده در ازت مایع

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2026-11-18]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1399.9.38.15.2]

جدول ۱- ترکیب محلول غذایی هوگلند تغییریافته

عناصر کم‌مصرف		عناصر پرمصرف	
نام ترکیب	غلظت (µM)	نام ترکیب	غلظت (mM)
Fe-EDTA	۱۰۰	$Ca(NO_3)_2$	۲
H_3BO_3	۲	$MgSO_4$	۱
$ZnSO_4$	۱	K_2SO_4	۰/۹
$CuSO_4$	۰/٤	KH_2PO_4	۰/۲۵
$MnSO_4$	۰/٤	KCl	۰/۱
$(NH_4)_6Mo_7O_{24}$	۰/۰٤		

انجام شد.

پارامترهای تعیین آستانه سمیت فلز: برای محاسبه پارامتر غلظت مؤثر (EC_{50}) 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 به‌دست آمد:

PR = مس ساقه / (مس ساقه + مس ریشه) × ۱۰۰

سنجش پارامترهای فلورسانس کلروفیل: جهت تعیین فلورسانس کلروفیل، از دستگاه فلورسانس‌سنج (دستگاه فلوریمتر Pocket PEA، شرکت Hansatech، انگلستان) استفاده شد. پارامترهای فلورسانس کلروفیل در برگ‌های سازش‌یافته با تاریکی (به‌مدت حداقل ۲۰ دقیقه) شامل F_0 (فلورسانس پایه) و F_m (فلورسانس بیشینه) اندازه‌گیری شد. برای رسم منحنی فلورسانس از تست JIP بهره گرفته شد. تست JIP داده‌های ثبت‌شده اولیه توسط دستگاه فلورسانس‌سنج 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 طول‌موج 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 ۵۰µs (به‌عنوان F_o در نظر گرفته شد)، شدت فلورسانس در ۳۰۰µs ($F_{300\mu s}$) و شدت فلورسانس در ۲ میلی‌ثانیه (مرحله J). برای رسم منحنی‌گذار فلورسانس کلروفیل از نرم‌افزار PEA Plus V1.10 استفاده شد. در منحنی گذار 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). درنهایت پارامترهای کارآیی 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 تهییج‌شده برگ‌ها (ET_o/CS)، شاخص کارآیی 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 ($O_2^{\bullet-}$) حاصل از فتولیز ریبوفلاوین، توسط آنزیم موجود در عصاره مورد اندازه‌گیری قرار گرفت (Giannopolitis and Ries, 1977). نمونه‌ها بلافاصله پس از برداشت در ازت مایع پودرشده و عصاره آنزیمی در بافر ۲۵ mM از هیدروکسی اتیل پیپرازین اتان

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2026-11-18]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1399.9.38.15.2]

سولفونیک اسید (HEPES) با pH=۷/۸ و حاوی اتیلن دی‌آمین ترا استیک اسید (EDTA) با غلظت ۰/۱ میلی‌مولار استخراج شد. عصاره‌ها به‌مدت ۱۵ دقیقه در ۱۵۰۰۰ دور سانتریفوژ شده و روشناور برای سنجش فعالیت مورد استفاده قرار گرفت. ۱۰۰ میکرولیتر از عصاره به یک میلی‌لیتر از محلول واکنشی شامل ۲۵ میلی‌مولار HEPES با pH=۷/٦، ۰/۱ میلی‌مولار EDTA، ۵۰ میلی‌مولار Na_2CO_3 (pH=۱۰/۲)، ۱۲ میلی‌مولار L–متیونین، ۷۵ میکرومولار NBT و ۱ میکرومولار ریبوفلاوین اضافه شده و مخلوط حاصل به‌مدت ۲۰ دقیقه در شدت نور ۱۵۰ میکرومول/ مترمربع/ ثانیه به‌منظور انجام واکنش قرار گرفت. برای تهیه نمونه‌های شاهد مخلوط فوق بدون افزودن عصاره آنزیمی تهیه گردید و جذب نمونه‌ها در ٥٦٠ نانومتر توسط اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شد. یک واحد فعالیت آنزیم براساس غلظت پروتئین آنزیمی لازم برای القا ۵۰ درصد ممانعت از احیا NBT در مقایسه با نمونه‌های شاهد بدون عصاره آنزیمی محاسبه شده و به‌صورت واحد فعالیت بر میلی‌گرم پروتئین بیان گردید.

فعالیت آنزیم کاتالاز (CAT) مطابق روش Simon و همکاران (۱۹۷٤)، براساس کاهش جذب هیدروژن پراکسید (H_2O_2) در ۲٤۰ نانومتر مورد اندازه‌گیری قرار گرفت. عصاره آنزیمی پس از پودرشدن نمونه‌ها در ازت مایع، در بافر فسفات با غلظت ۵۰ mM و pH=۷ استخراج شده و به‌مدت ۱۰ دقیقه در ۱۰۰۰۰ دور سانتریفوژ گردید. برای سنجش فعالیت آنزیم غلظت مناسبی از عصاره به محلول واکنش شامل بافر فسفات ۵۰ میلی‌مولار (pH=۷) و ۱۰ میلی‌مولار از H_2O_2 افزوده شده و تغییرات جذب به‌مدت دو دقیقه توسط اسپکتروفتومتر مورد اندازه‌گیری قرار گرفت. درنهایت فعالیت آنزیم براساس ضریب خاموشی H_2O_2 ($0/041$ mM^{-1} cm^{-1}) برحسب میکرومول هیدروژن پراکسید بر میلی‌گرم پروتئین در دقیقه محاسبه شد.

فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز مطابق روش Boominathan و Doran (۲۰۰۲) و براساس اکسیداسیون اسید آسکوربیک و کاهش جذب در ۲۹۰ nm مورد اندازه‌گیری قرار گرفت. نمونه‌ها در ازت مایع پودر شده و عصاره آنزیمی در بافر Na_2HPO_4/KH_2PO_4 با غلظت ۵۰ mM و pH=۷ استخراج شده و به‌مدت ۲۰ دقیقه در ۱٤۰۰۰g سانتریفوژ گردید. برای سنجش فعالیت آنزیم ٦٧٥ میکرولیتر از بافر فسفات سدیم (pH=۷) 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 به‌وسیله افزودن ۵۰ میکرولیتر H_2O_2 با غلظت ۲۵۰ mM آغاز گردید. تغییرات جذب به‌مدت سه دقیقه توسط اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شده و فعالیت آنزیم با ضریب خاموشی اسید آسکوربیک ($2/٦$ mM^{-1} cm^{-1}) بر حسب واحد μM ascorbic acid mg^{-1} protein min^{-1} محاسبه گردید.

سنجش متابولیت‌های مرتبط با دفاع آنتی‌اکسیدانت: سنجش مالون دی‌آلدئید (MDA) به‌عنوان 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 به‌مدت پنج دقیقه در ۱۰۰۰۰ دور سانتریفوژ گردید. نسبت ۱ به ٤ از روشناور با محلول ۲۰ درصد از تری کلرواستیک اسید حاوی ۰/۵ درصد تیوباربیتوریک اسید در لوله آزمایش با هم مخلوط شده و به‌مدت ۳۰ دقیقه در حمام آب‌گرم با دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. سپس لوله‌ها به‌سرعت در یخ سرد شده و به‌مدت ۱۵ دقیقه در ۱۰۰۰۰ دور سانتریفوژ شدند. هم‌زمان با عصاره‌های برگ محلول‌های استاندارد در محدوده صفر تا ۱۰۰ نانومول از ۱،۱،۳،۳– تترا اتوکسی پروپان تهیه شده و جذب نمونه‌ها در ۵۳۲ نانومتر توسط اسپکتروفتومتر مورد اندازه‌گیری قرار گرفت. درنهایت غلظت مالون دی‌آلدئید نمونه‌ها برحسب نانومول بر گرم وزن تر محاسبه شد.

غلظت هیدروژن پراکسید (H_2O_2) براساس روش Velikova و همکاران (۲۰۰۰) به‌دست آمد. محلول استخراج برگ‌ها محلول تری کلرواستیک اسید (۰/۱ درصد وزنی به حجمی) بود. عصاره‌ها به‌مدت ۱۵ دقیقه در ۱۲۰۰۰ دور سانتریفوژ شده و روشناور مورد استفاده قرار گرفت. ۵۰۰ میکرولیتر از عصاره به یک میلی‌لیتر از محلول واکنشی شامل

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2026-11-18]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1399.9.38.15.2]

۱۰ میلی‌مولار بافر فسفات پتاسیم (pH=۷) 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=۶/۸ استخراج شده و به‌مدت ۲۰ دقیقه در۱۵۰۰۰ 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 میلی‌لیتراز بافر استیک اسید خنک ۵۰ میلی‌مول با PH ۳/۶ و دارای ٤ درصد دی‌استات روی محلول، هضم شده و به‌مدت ۱۵ دقیقه و در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شد. روشناور جداشده و رسوبات به‌وسیله ۱ میکرومول از بافر استخراج شسته شد. رسوبات مانند شرایط توضیح داده‌شده در بالا دوباره سانتریفیوژ شد و سپس هر دو روشناور با هم مخلوط شدند و ۰/۱ گرم چارکول به آن اضافه شد. بعد از ورتکس (vortex) و صاف‌کردن، محلول موجود دوباره صاف شد. مخلوطی از ۱/۵ میلی‌لیتر فیلترا با ۱/۵ میلی‌لیتر از معرف گریز (Greiss) در دمای اتاق به‌مدت ۳۰ دقیقه قرار داده شد. جذب در ٥٤٠ 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

تأثیر غلظت‌های مختلف مس بر میزان انباشت آن در ساقه و ریشه گیاه فلومیس توبروز: بررسی مقدار انباشت مس در قسمت‌های مختلف گیاه فلومیس توبروزا 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 1a). هر چند که با افزایش غلظت اعمال مس به ٤۰۰ میکرومولار مقدار انباشت این عنصر در اندام هوایی فلومیس توبروزا به‌طور معنی‌دار و قابل توجهی افزایش نشان داد. مطالعه تأثیر اعمال غلظت‌های مختلف مس در ریشه فلومیس توبروزا 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 ٤۰۰ میکرومولار مس به‌دست می‌آید (شکل 1b).

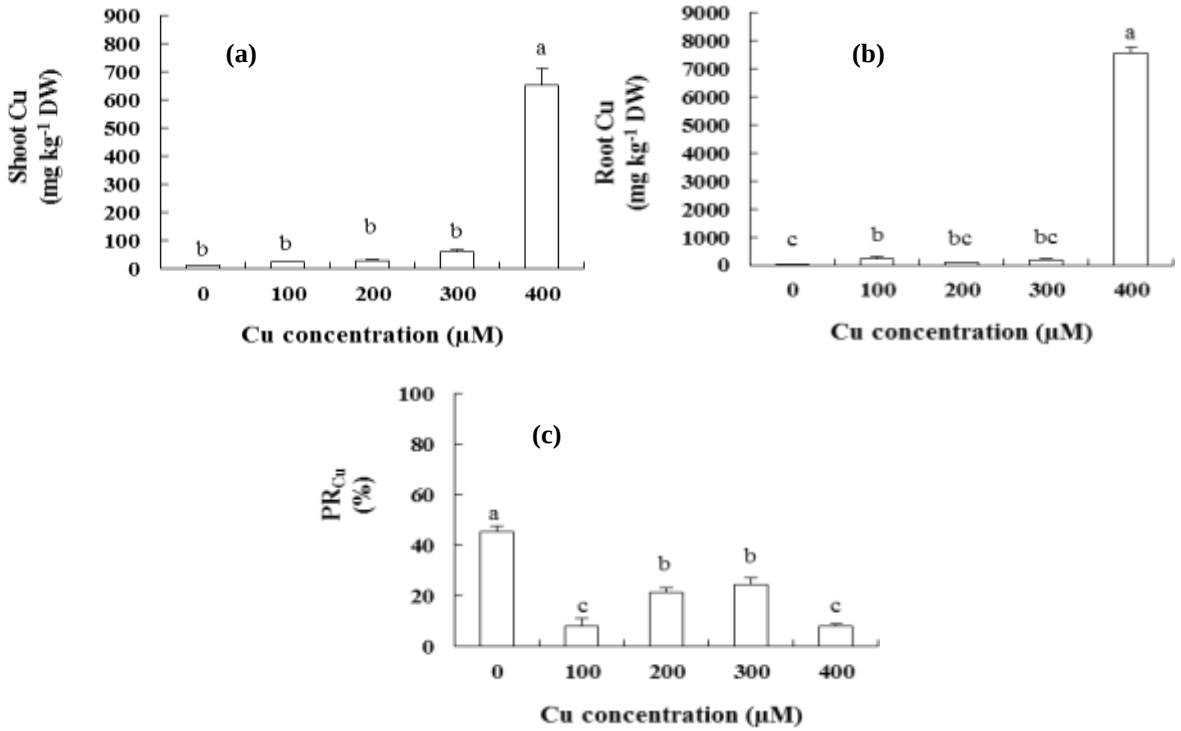
بررسی شاخص نسبت پارتیشن مس (PR_{cu}) نشان داد که تیمار شاهد بیشترین سهم انباشت مس در ساقه را دارا است و کمترین نسبت پارتیشن (نسبت انباشت مس در ساقه نسبت به کل مس انباشته‌شده)، در تیمارهای ۱۰۰ و ٤۰۰ میکرومولار مس به‌دست آمد (تصویر ۱) (شکل 1c).

تأثیر غلظت‌های مختلف مس بیومس ساقه و ریشه گیاه فلومیس توبروز: 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 درنتیجه 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 توبروز 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 بین‌رفتن 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

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2026-11-18]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1399.9.38.15.2]



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 انباشته‌شده) در گیاه فلومیس توبروزا. مقادیر، میانگین چهار تکرار ± StD (انحراف معیار) است. حروف یکسان بیانگر عدم‌اختلاف معنی‌دار بین میانگین‌ها در سطح احتمال پنج درصد است.

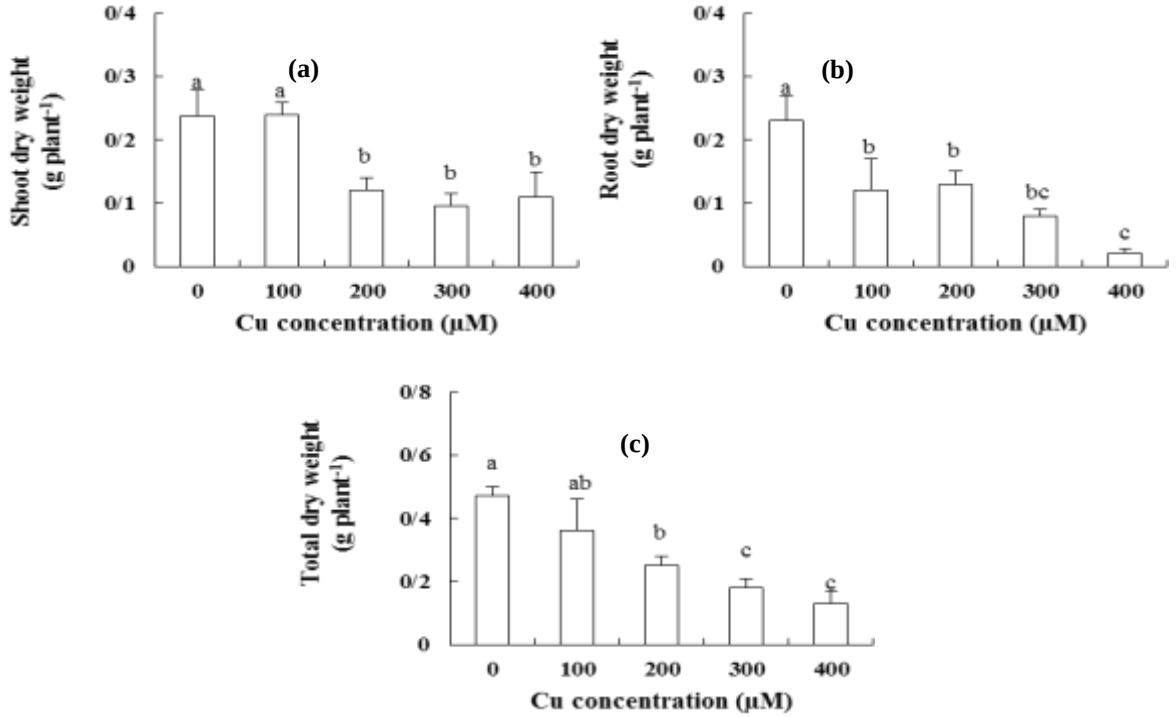


تصویر ۱- تأثیر اعمال ۲۱ روز سطوح مختلف مس بر مورفولوژی فلومیس توبروزا

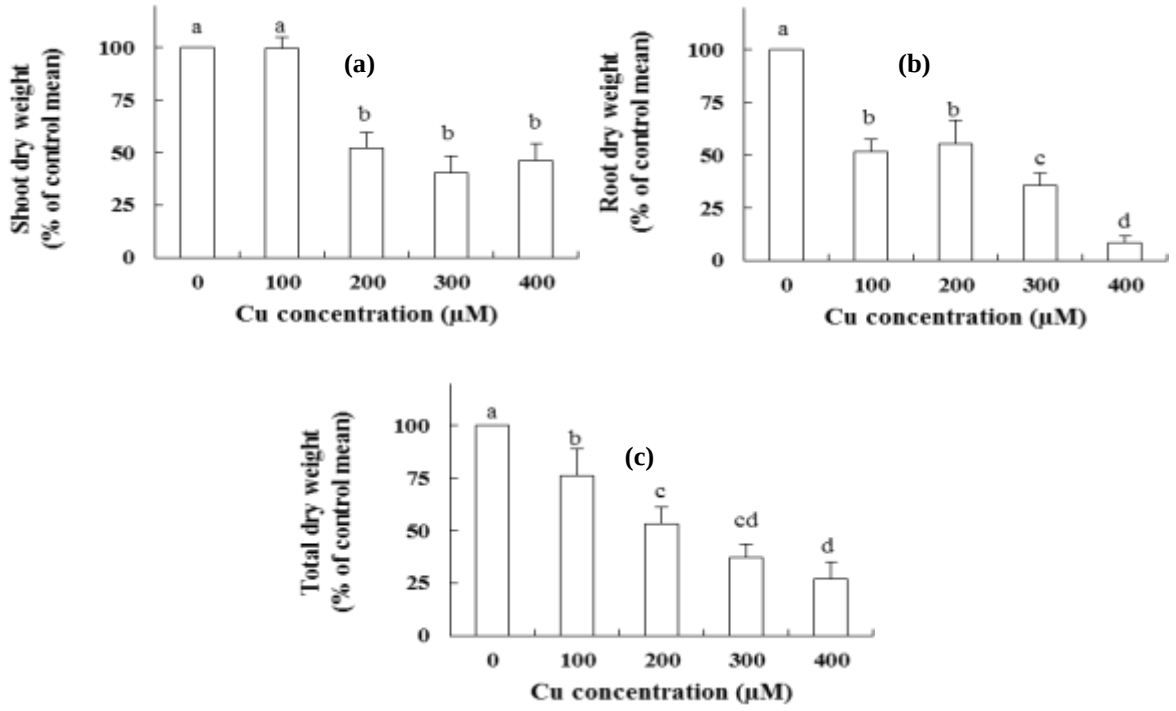
غلظت ۳۰۰ میکرومولار مس باعث افت بیش از ۵۰ درصد بیومس کل فلومیس توبروز شده است درنتیجه غلظت ۳۰۰ میکرومولار به‌عنوان EC_{50} گیاه تعیین شد (شکل ۳).

تأثیر غلظت‌های مختلف مس بر روی شاخص‌های فتوشیمیایی فتوسنتز در گیاه فلومیس توبروز: برای آنالیز فتوشیمیایی فتوسنتز در گیاه فلومیس توبروزا از تست OJIP استفاده شد. غلظت‌های ۱۰۰ و ۲۰۰ میکرومولار مس باعث افزایش فاز IP در منحنی OJIP شده و شدت فلورسانس را افزایش دادند درحالی‌که غلظت‌های ۳۰۰ و ٤۰۰ میکرومولار مس باعث کاهش معنی‌دار فاز IP و F_m (شدت

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2026-11-18]
[DOR: 20.1001.1.23222727.1399.9.38.15.2]



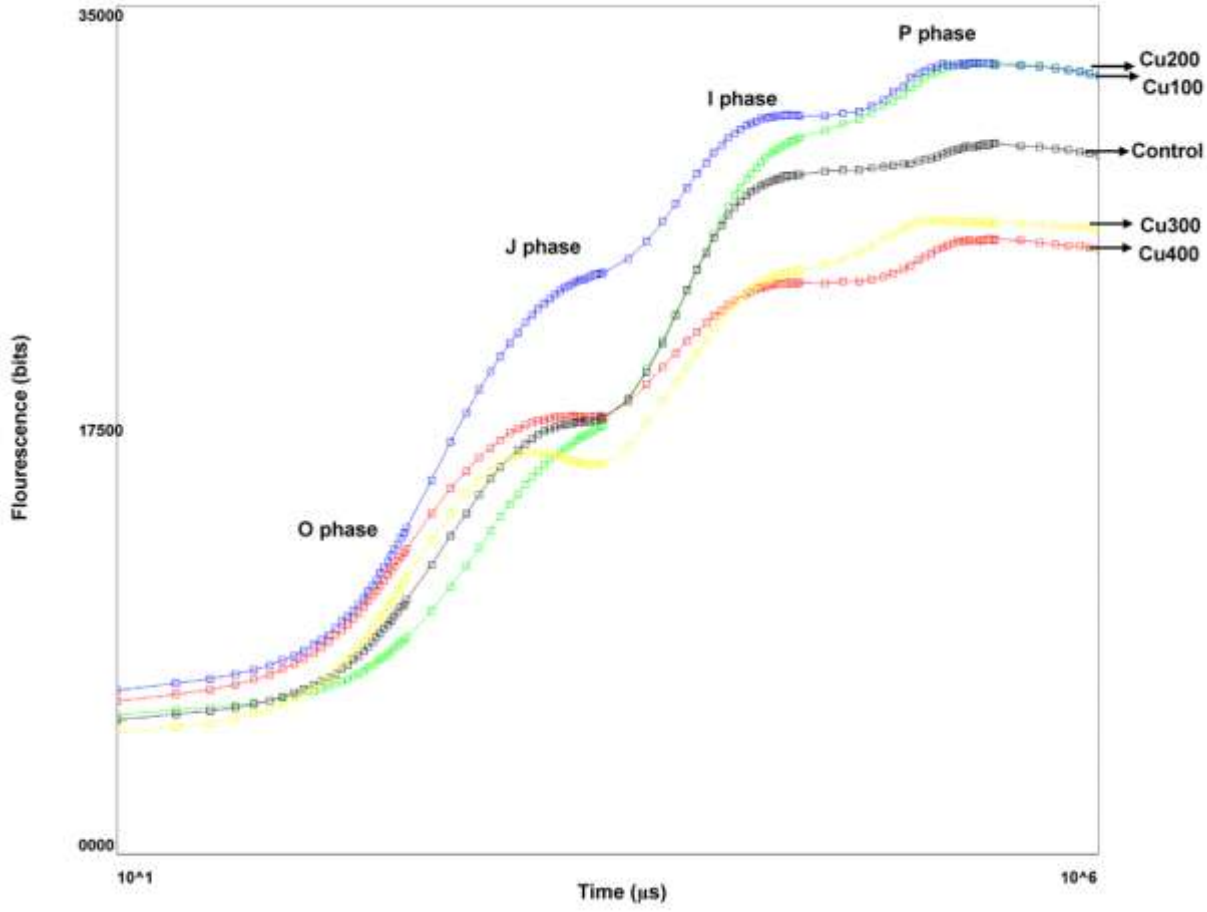
شکل ۲- تأثیر اعمال سطوح مختلف مس بر بیومس و شاخص‌های رشد گیاه فلومیس توبروزا. مقادیر، میانگین چهار تکرار ± StD (انحراف معیار) است. حروف یکسان بیانگر عدم‌اختلاف معنی‌دار بین میانگین‌ها در سطح احتمال پنج درصد است.



شکل ۳- تأثیر اعمال سطوح مختلف مس بر شاخص غلظت مؤثر (EC_{50} یعنی غلظتی از مس که منجر به کاهش ۵۰ درصدی تولید ماده خشک می‌شود) در گیاه فلومیس توبروزا. مقادیر، میانگین چهار تکرار ± StD (انحراف معیار) است. حروف یکسان بیانگر عدم‌اختلاف معنی‌دار بین میانگین‌ها در سطح احتمال پنج درصد است.

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2026-11-18]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1399.9.38.15.2]

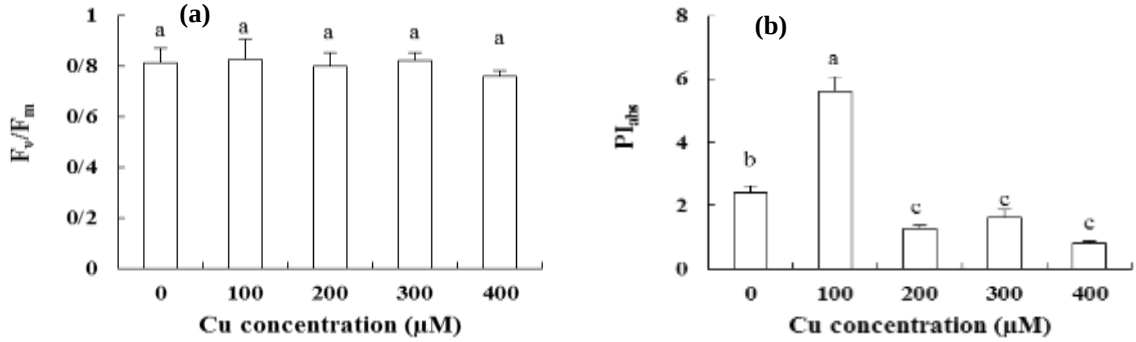


شکل ٤- تأثیر اعمال سطوح مختلف مس بر تغییرات شکل منحنی فلورسانس کلروفیل *a* (OJIP) (محور عمودی شدت فلورسانس و محور افقی زمان براساس میکروثانیه است) در گیاه فلومیس توبروزا. مقادیر، میانگین چهار تکرار ± StD (انحراف معیار) است. حروف یکسان بیانگر عدم‌اختلاف معنی‌دار بین میانگین‌ها در سطح احتمال پنج درصد است.

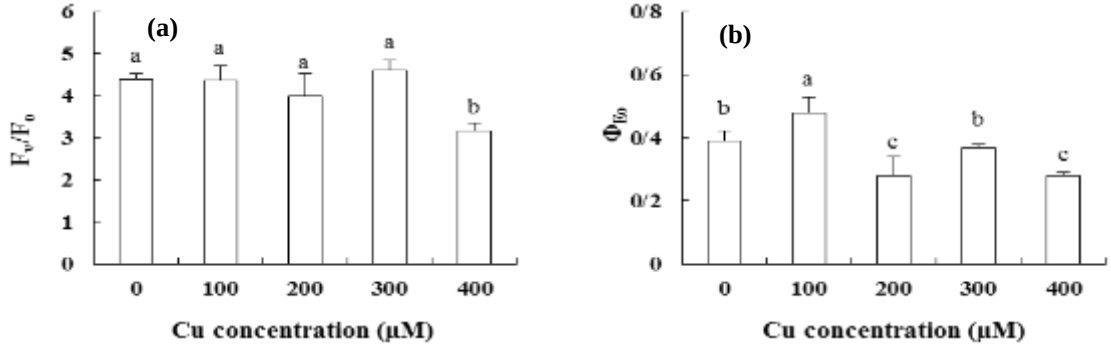
فلورسانس بیشینه) گردیدند و درنتیجه شدت فلورسانس کاهش یافت (شکل ٤). هیچ یک از غلظت‌های اعمال‌شده مس در تیمارهای مختلف تأثیر معنی‌داری بر مقدار شاخص بیشینه عملکرد کوانتومی فتوسیستم II (F_v/F_m) نداشتند (شکل ٥a). بررسی تغییرات منحنی فلورسانس OJIP با استفاده از تست JIP (این تست داده‌های ثبت‌شده اولیه توسط دستگاه فلوئورسانس‌سنج 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 معنی‌دار پارامتر شاخص کارایی فتوسیستم‌ها (PI_{abs}) در این گونه گیاهی گردید (شکل ٥b). درحالی‌که اعمال غلظت‌های بالاتر مس در تیمارهای ۲۰۰، ۳۰۰ و ٤۰۰ میکرومولار باعث افت معنی‌دار پارامتر شاخص کارایی فتوسیستم‌ها گردید. اعمال غلظت ٤۰۰ میکرومولار مس باعث افت فعالیت کمپلکس فتولیزکننده آب (F_v/F_o) شد (شکل ٦a). تیمارهای ۲۰۰ و ٤۰۰ میکرومولار مس عملکرد کوانتومی انتقال الکترون (ΦEo) در برگ‌های فلومیس توبروز را کاهش دادند (شکل ٦b).

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 CAT، SOD و APX افزایش معنی‌داری را نشان دادند (شکل ۷). بیشترین فعالیت

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2026-11-18]
[DOR: 20.1001.1.23222727.1399.9.38.15.2]



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



شکل ٦- تأثیر اعمال سطوح مختلف مس بر فعالیت کمپلکس فتولیزکننده آب (F_v/F_o) (a) و عملکرد کوانتومی انتقال الکترون (ΦEo) (b) در گیاه فلومیس توبروزا. مقادیر، میانگین چهار تکرار ± StD (انحراف معیار) است. حروف یکسان بیانگر عدم‌اختلاف معنی‌دار بین میانگین-ها در سطح احتمال پنج درصد است.

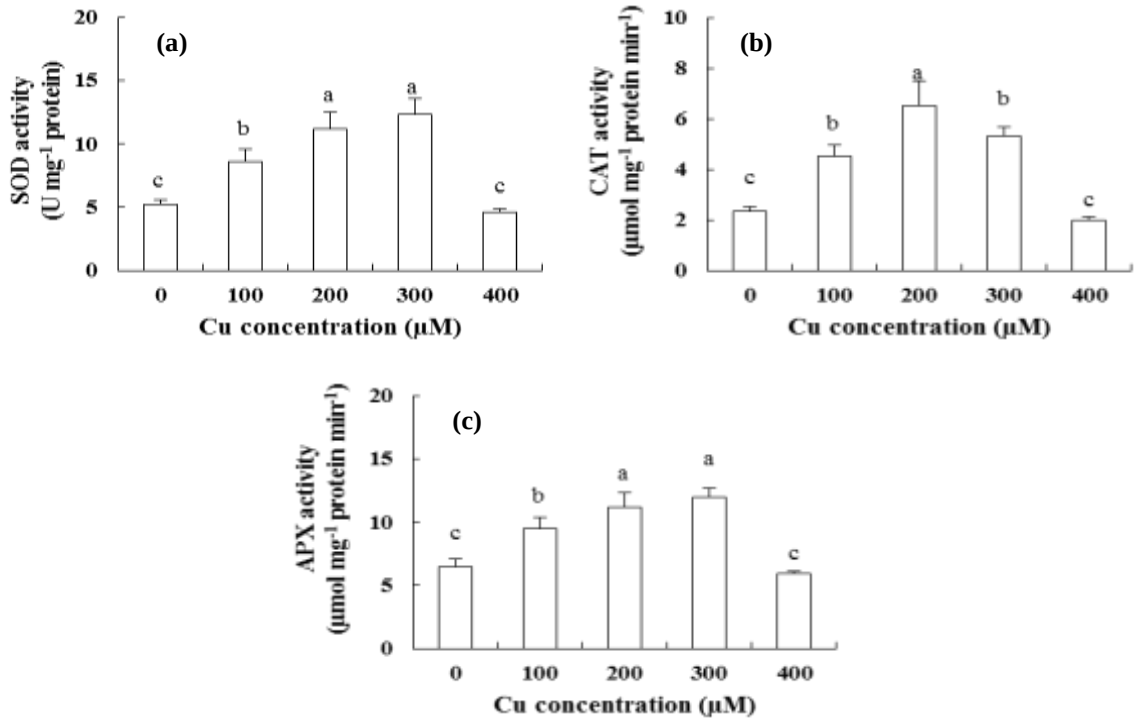
آنزیم‌های SOD و APX در تیمارهای ۲۰۰ و ۳۰۰ میکرومولار مس به‌دست آمد. با افزایش غلظت به ٤۰۰ میکرومولار فعالیت آنزیم‌ها به‌شدت افت کرد و به مقدار فعالیت آنزیم‌ها در تیمار شاهد رسید. با افزایش غلظت مس از ۱۰۰ به ٤۰۰ شاهد افزایش معنی‌دار مقدار H_2O_2 بودیم. بیشترین انباشت H_2O_2 در تیمار ٤۰۰ میکرومولار مشاهده گردید (شکل ۸a). افزایش مقدار MDA تنها در غلظت‌های ۳۰۰ و ٤۰۰ میکرومولار نسبت به شاهد معنی‌دار بود (شکل ۸b).

تأثیر غلظت‌های مس بر مقدار نیتریک اکسید (NO): سنجش مقدارNO در برگ‌های فلومیس نشان داد که مقدار این پیک ثانویه در تیمارهای ۱۰۰ و۲۰۰ افزایش معنی‌دار نشان داد ولی در تیمارهای ۳۰۰ و ٤۰۰ به مقدار شاهد برگشت (شکل ۹).

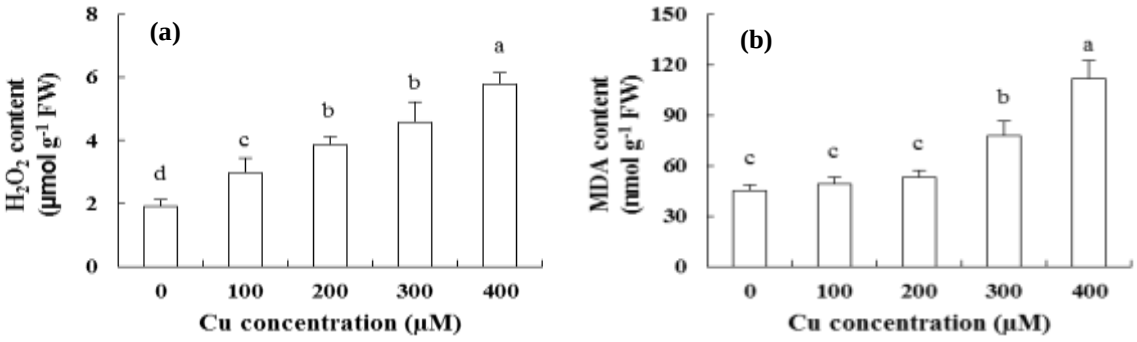
بحث

آستانه سمیت مس در فلومیس توبروزا: مطالعه میزان انباشت مس در بخش‌های مختلف فلومیس نشان داد که با افزایش سطوح تیمار مس از ۱۰۰ به ٤۰۰ 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 توبروزا با افزایش سطوح غلظت مس با نتایج آزمایش Hippler و

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2026-11-18]
[DOR: 20.1001.1.23222727.1399.9.38.15.2]



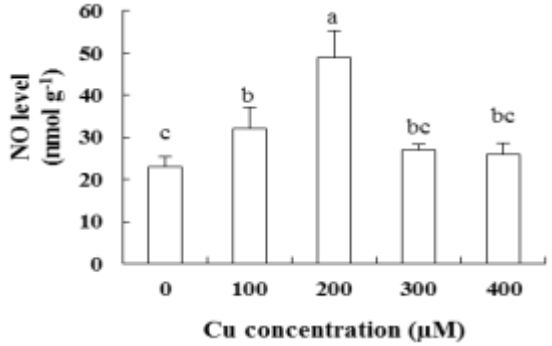
شکل ۷- تأثیر اعمال سطوح مختلف مس بر فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت شامل آنزیم‌های SOD (a)، CAT (b) و APX (c) در گیاه فلومیس توبروزا. مقادیر، میانگین چهار تکرار ± StD (انحراف معیار) است. حروف یکسان بیانگر عدم‌اختلاف معنی‌دار بین میانگین‌ها در سطح احتمال پنج درصد است.



شکل ۸- تأثیر اعمال سطوح مختلف مس بر انباشت H_2O_2 (a) و MDA (b) در گیاه فلومیس توبروزا. مقادیر، میانگین چهار تکرار ± StD (انحراف معیار) است. حروف یکسان بیانگر عدم‌اختلاف معنی‌دار بین میانگین‌ها در سطح احتمال پنج درصد است.

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 ٤٠٠ میکرومولار به‌دست آمد. این نتایج ثابت می‌کنند که بین انباشتگی مس در ساقه و ریشه 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.

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2026-11-18]
[DOR: 20.1001.1.23222727.1399.9.38.15.2]



شکل ۹- تأثیر اعمال سطوح مختلف مس بر مقدار نیتریک اکسید (NO) در گیاه فلومیس توبروزا. مقادیر، میانگین چهار تکرار ± StD (انحراف معیار) است. حروف یکسان بیانگر عدم‌اختلاف معنی‌دار بین میانگین‌ها در سطح احتمال پنج درصد است.

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 اعمال‌شده برای فلومیس قابل تحمل بود.

برای تعیین میزان آستانه سمیت عناصر سنگین ازجمله مس در گیاهان از شاخص Ec_{50} بهره گرفته می‌شود. این پارامتر برای ساقه و ریشه و کل گیاه به‌صورت جداگانه تعریف می‌گردد. برای مثال Ec_{50} ساقه غلظتی از فلز سنگین است که باعث از بین‌رفتن 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 توبروزا غلظت ۳۰۰ میکرومولار مس تعیین گردید. غلظت ٤۰۰ میکرومولار مس باعث کاهش ۷۲ درصدی بیومس فلومیس شد. کاهش قابل‌توجه 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 ٤۰۰ 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 دهنده غیرفعال‌شدن 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 تیمارشده 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 بلوکه‌شدن 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). عدم‌تغییر معنی‌دار مقدار بیشینه عملکرد کوانتومی فتوسیستم II در برگ‌های فلومیس توبروزا 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 تیمارشده با ۱۰۰ میکرومولار نسبت به برگ‌های شاهد نشان داد که کاربرد ۱۰۰ میکرومولار مس باعث افزایش ظرفیت فتوسنتزی در برگ‌های فلومیس گردید. همچنین بررسی جزیی‌تر اثر مس بر سایر پارامترهای فلورسانس کلروفیل نشان داد که علت کاهش شاخص کارآیی فتوسیستم‌ها در تنش مس، کاهش کارآیی فعالیت کمپلکس آزادکننده اکسیژن (F_v/F_o) و عملکرد

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2026-11-18]
[DOR: 20.1001.1.23222727.1399.9.38.15.2]

کوانتومی انتقال الکترون (φE_o) در برگ‌های فلومیس بود. همان‌طور که افزایش شاخص کارآیی 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 ٤۰۰ 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 ٤۰۰ میکرومولار دیده شد که با کاهش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت همراه بود. بیشترین فعالیت آنزیم‌ها متعلق به تیمار ۲۰۰ میکرومولار مس بود. گیاه فلومیس توبروزا 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 ٤۰۰ 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 ٤۰۰ میکرومولار مس به‌خاطر تولید مقادیر بالایی ازMDA 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 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 ٤۰۰ 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 روشن‌شدن 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 اعمال‌شده برای فلومیس قابل تحمل بود. در این تحقیق، میزان Ec_{50} ساقه و ریشه و همچنین Ec_{50} کل برای گیاه فلومیس توبروزا غلظت ۳۰۰ میکرومولار مس تعیین گردید. عدم‌تغییر 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 ٤۰۰ میکرومولار مس به‌خاطر تولید مقادیر بالایی از MDA تنش‌زا بودند به‌طوری‌که غلظت ٤۰۰ 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.

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2026-11-18]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1399.9.38.15.2]

از آن‌جایی‌که آستانه سمیت برای بسیاری از گیاهان در گلخانه و یا آزمایشگاه، با رشد گیاهان در محلول‌های غذایی، با غلظت‌های مشخص از فلزات بررسی می‌شود درحالی‌که این شرایط با شرایط واقعی رویشگاه طبیعی متفاوت است. عواملی از قبیل زیادی میکروارگانیسم‌های محیط ریشه مانند مایکوریز و اتصال این فلزات به مواد آلی خاک، وجود علفخواران، رقابت و پاتوژن‌ها توانایی گیاهان برای تحمل تنش سمیت فلزات را تغییر می‌دهند. بنابراین نتایج حاصله از آزمایش‌های کشت کنترل‌شده در مقایسه با نتایج حاصله از آزمایش‌های رویشگاه طبیعی متفاوت خواهد بود. از ای‌نرو پیشنهاد می‌شود آستانه سمیت فلزات مذکور در شرایط کشت خاکی و همچنین در رویشگاه طبیعی در تحقیقات آتی مورد بررسی قرار گیرد.

منابع

Ambrosini, V. G., Rosa, D. J., Prado, J. P. C., Borghezan, 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 hyperaccumlator, *Alyssum 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., Cazevieille, 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., Dovis, 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 reguirements 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.

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2026-11-18]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1399.9.38.15.2]

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 Matkovics, 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.

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2026-11-18]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1399.9.38.15.2]

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 (EC50 – 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

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2026-11-18]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1399.9.38.15.2]