

تاثیر غلظت‌های مختلف مس و نیکل بر روی برخی شاخص‌های رشدی و فیزیولوژیکی در گیاه بامیه (*Hibiscus esculentus* L.)

سروش کارگر خرمی و رشید جامعی*

گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه ارومیه

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۱۰/۰۸، تاریخ پذیرش نهایی: ۱۳۹۳/۰۶/۲۹)

چکیده:

مس و نیکل از عناصر ضروری برای فرآیندهای پایه سلولی به شمار می‌روند، اما در غلظت‌های بالا برای گیاهان سمی می‌باشند. در مطالعه حاضر دانه رست‌های ۴ روزه به گلدان‌های ۱ لیتری محتوی محلول هوگلند انتقال داده شدند. پس از ۱۰ روز به منظور تیمار، فلزات مس و نیکل به صورت سولفات مس (CuSO_4) و سولفات نیکل (NiSO_4) و در غلظت‌های (۰، ۲۵، ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میکرو مولار) به طور جداگانه به محیط کشت اضافه شدند. نتایج نشان داد که در گیاهان تحت تاثیر تمام غلظت‌های مس و نیکل میزان رنگیزه‌های فتوستزی، سطح برگ، میزان رشد طولی، وزن تر و وزن خشک تحت تاثیر تیمارهای ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میکرو مولار مس و تیمارهای ۱۰۰ و ۲۰۰ میکرو مولار نیکل در مقایسه با نمونه-های شاهد کاهش یافته‌اند. محتوای قند محلول اندام هوایی و ریشه گیاهان تحت تیمار تمام غلظت‌های نیکل و غلظت‌های ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میکرو مولار مس افزایش معنی‌داری را نسبت به نمونه‌های شاهد نشان داد. به علاوه میزان مالون دی آلدئید پراکسید هیدروژن و فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدان (کاتالاز و آسکوربات پراکسیداز) در اندام هوایی و ریشه گیاهان تحت تیمار غلظت‌های ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میکرو مولار مس و نیکل افزایش چشم‌گیری را نسبت به نمونه‌های شاهد داشتند. نتایج نشان داد که غلظت‌های بالای مس و نیکل اثرات منفی بر روی گیاه بامیه دارند و افزایش آنزیم‌های آنتی اکسیدان و تولید پراکسید هیدروژن ممکن است به عنوان یک شاخص برای حساسیت به مس و نیکل به شمار رود.

کلمات کلیدی: آنزیم‌های آنتی اکسیدان، رنگیزه‌های فتوستزی، قند محلول، گیاه بامیه، مالون دی آلدئید.

مقدمه:

مس سبب کاهش رشد طبیعی گیاه از طریق تداخل در فرایندهایی مانند تنفس و فتوستز می‌گردد (Marschner, 1995). نیکل نیز به عنوان یک عنصر کم مصرف ضروری در مرکز واکنش آنزیم اوره آز و همچنین به عنوان کو فاکتور یکی از ایزو فرمهای آنزیم سوپراکسید دیسموتاز مورد نیاز می‌باشد (Kupper and Kroneck, 2007). این فلز به سرعت بوسیله ی ریشه‌ی گیاهان جذب و در تمام بافت‌های گیاه توزیع می‌شود (Giordani et al., 2005). غلظت نیکل در گیاهان در محدوده‌ی $0.1-5 \mu\text{g/g dw}^{-1}$ می‌باشد (Mishra and Kar, 1974) و برای

امروزه یکی از مشکلات اساسی محیط زیست در جهان افزایش فلزات سنگین رها شده طی فعالیت‌های صنعتی و کشاورزی انسان است (Prasad, 2004). مس یکی از عناصر کم مصرف و ضروری برای گیاهان و جلبک‌ها می‌باشد این عنصر در ساختار برخی پروتئین‌ها که فعالیت آنزیمی دارند شرکت می‌کند (Elisabetta, 2004). وجود ۵ تا ۳۰ میلی گرم مس در هر کیلوگرم وزن خشک برای رشد نرمال گیاهان ضروری می‌باشد (Kabata and Pendias, 1992). غلظت بالای

* نویسنده مسؤول، نشانی پست الکترونیکی: r.jamei@urmia.ac.ir

بسیاری از گونه های گیاهی برای تکمیل چرخه زندگی شان ضروری است (Seregin and Kozhevnikova, 2006). یون های آزاد مس توانایی کاتالیز و تولید رادیکالهای سمی هیدروکسیل را از آنیون های سوپر اکسید و یا پراکسید هیدروژن از طریق واکنش هابر- وایز (Haber-Weiss) دارند (Halliwell and Gutteridge, 1984). رادیکال های هیدروکسیل توانایی اکسیداسیون ماکرومولکول ها مانند DNA، پروتئین ها و همچنین لیپیدها را دارند (Dat et al., 2000, Briat and Lebrun, 1999). فلزات سنگین با کاهش محتوی رنگیزه های فتوسنتزی، تخریب دستگاه فتوسنتزی، تخریب کلروپلاست و یا تغییر ترکیب پروتئین و لیپید غشای تیلاکوئید فعالیت های فتوسنتزی را کاهش می دهند (Keshi, 2007). بررسی ها نشان داده است که با افزایش غلظت مس میزان کلروز برگ و نکروزه شدن حاشیه برگ افزایش می یابد (Zhu and Alva, 1993). از پیامدهای تنش مس می توان کاهش رشد و میزان زیست توده را اشاره کرد (Xu et al., 2006). فلز سنگین نیکل در غلظت های بالا می تواند با مهار چرخه ی تقسیم سلول های آندودرم و دایره محیطی از تولید ریشه های فرعی جلوگیری نماید، پیامد این اثر کاهش زیست توده و تولیدات گیاهی است (Seregin and Kozhevnikova, 2006). ترشح اسیدهای آلی، نگه داری مس در ریشه و عدم تحرک آن در دیواره سلولی از جمله راهکارهای گیاهان برای برطرف کردن سمیت مس می باشند (Hu et al., 2007). به طور کلی سلول های گیاهی با دارا بودن سیستم های حفاظتی آنتی اکسیدانی آنزیمی و غیر آنزیمی، می توانند اثرات مخرب ROS های تولید شده را برطرف کنند. این سیستم آنزیمی شامل آنزیم های سوپر اکسید دیسموتاز (SOD)، کاتالاز (CAT)، گلوکاتایون ردوکتاز (GR)، آسکوربات پراکسیداز (APX) و پراکسیدازها (POD) و سیستم غیر آنزیمی شامل ترکیبات (آسکوربات، گلوکاتایون، آلفاتوکوفرول و کاروتنوئیدها) می باشند (Mishra et al., 2006). گیاه بامیه با نام علمی (*Hibiscus esculentus* L.) متعلق به تیره ی پنیرکیان یا Malvaceae می باشد. بامیه یکی از مهمترین سبزیجات است که در مناطق گرم و گرمسیری کاشته می شود، و یک جایگاه خاص در برنامه ی غذایی روزانه ی این مناطق دارد. این گیاه به

عنوان یک منبع ارزان قیمت از پروتئین ها، آمینو اسیدها، کربوهیدراتها، ویتامینها (A, B, C) و مواد معدنی در این مناطق به شمار می رود. ریشه ها و ساقه های گیاه بامیه به عنوان پاک کننده ی جوهر و همچنین قهوه ای کردن شکر مورد استفاده قرار می گیرد. در صنعت از میوه های رسیده و ساقه ها که محتوی فیبر زیادی می باشند برای تهیه ی کاغذ استفاده می کنند (Javed et al., 2009). گیاه بامیه در مناطق گرمسیری ایران به ویژه در استان خوزستان کشت می شود. با توجه به اینکه تاکنون مطالعه در زمینه تنش مس و نیکل بر روی گیاه بامیه صورت نگرفته و با توجه به اهمیت کشت این گیاه در مناطق جنوبی ایران هدف از این مطالعه، بررسی اثرات زیان بار غلظت های مختلف مس و نیکل (۰، ۲۵، ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میکرو مول بر لیتر) و بررسی شدت آسیب های وارده بر شاخص های رشدی و فیزیولوژیکی و همچنین مطالعه میزان فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدان CAT و APX و بررسی نقش آنها در جهت کاهش آثار زیان بار این دو فلز سنگین بود.

مواد و روش ها:

کشت و تیمار گیاه: بذرهای گیاه بامیه (*Hibiscus esculentus* L.) رقم (Clemson Spineless) از شرکت هلندی (Bakker brother) با قدرت جوانه زنی ۸۵ تا ۹۹ درصد تهیه شدند. پس از ضد عفونی بذرهای سالم و هم اندازه با محلول هیپوکلریت سدیم ۵ درصد، جوانه زنی آنها در پتری دیش های حاوی دو لایه کاغذ صافی مرطوب به مدت ۴ روز انجام شد. به گلدان های ۱ لیتری حاوی دانه رست ها محلول هوگلند یک چهارم قدرت در هفته اول (۱۶ میلی مولار KNO_3 ، ۶ میلی مولار $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ، ۴ میلی مولار $\text{NH}_4 \text{H}_2 \text{PO}_4$ ، ۲ میلی مولار MgSO_4 ، ۵۰ میکرو مولار KCl ، ۲۵ میکرو مولار $\text{H}_3 \text{BO}_3$ ، ۲ میکرو مولار $\text{MnSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ، ۲ میکرو مولار $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ، ۰/۵ میکرو مولار $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ، ۰/۵ میکرو مولار H_2MoO_4 ، ۴۰ میکرو مولار Fe-EDTA) و یک دوم قدرت در هفته های بعد داده شدند. گلدان ها در اتاقک های کشت در دمای 25 ± 2 درجه ی سانتی گراد، با شرایط نوری ۱۶ ساعت روشنائی و ۸ ساعت تاریکی، شدت نور $150 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}$ و

$$\text{Chla} = 11.75 A_{662} - 2.350 A_{645}$$

$$\text{Chlb} = 18.61 A_{645} - 3.960 A_{662}$$

$$C_{X+C} = 1000 A_{470} - 2.270 \text{ Chla} - 81.4 \text{ Chlb} / 227$$

سنجش میزان قند های محلول: برای سنجش میزان قندهای

محلول ۰/۵ گرم از بافت تر اندام هوایی و ریشه به طور جداگانه در داخل هاون با ۵ میلی لیتر آب مقطر خوب سائیده شد و سپس با تنظیف ۴ لایه صاف گردید. روی ۱ میلی لیتر از عصاره‌ی حاصله ۱ میلی لیتر فنل ۵ درصد و ۳ میلی لیتر اسید سولفوریک ۹۸ درصد اضافه شد. سپس نمونه‌ها به مدت ۱ ساعت در دمای آزمایشگاه انکوبه شدند. بعد از ظهور رنگ میزان جذب در ۴۸۵ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتری اندازه‌گیری شد. برای تعیین میزان قندهای محلول، منحنی استاندارد با استفاده از غلظت‌های معلوم گلوکز تهیه گردید (Roberts and Martin, 1959).

سنجش میزان مالون دی آلدئید (MDA): برای اندازه‌گیری

میزان MDA ۰/۲ گرم از بافت‌تر گیاهی در ۵ میلی لیترتری کلرواستیک اسید (TCA) ۱ درصد ساینده شد. هموژنات‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در ۸۰۰۰g سانتریفوژ شدند. روی یک میلی لیتر از محلول رویی ۴ میلی لیتر از محلول محتوی TCA ۲۰ درصد و تیوباربیتوریک اسید (TBA) ۰/۵ درصد اضافه گردید. سپس نمونه‌ها به مدت ۳۰ دقیقه در حمام آب گرم با دمای ۹۵ درجه سانتی گراد گذاشته شد، نمونه‌ها بلافاصله در آب یخ سرد شدند و در نهایت پس از ۵ دقیقه سانتریفوژ در ۸۰۰۰g جذب نمونه‌ها در دو طول موج ۵۳۲ نانومتر و ۶۰۰ نانومتر خوانده شد. میزان MDA از ضریب خاموشی ($155 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) محاسبه شد (Heath and Packer, 1968).

اندازه‌گیری میزان پراکسید هیدروژن (H_2O_2): ۰/۵ گرم

بافت تر ریشه و اندام هوایی به همراه ۳ میلی لیتر بافر فسفات ($\text{pH}=7.8$) ساینده شد. هموژنات حاصل به مدت ۲۵ دقیقه در ۶۰۰۰g سانتریفوژ گردید. برای تعیین میزان پراکسید هیدروژن، روی ۳ میلی لیتر از عصاره‌ی حاصله ۱ میلی لیتر تیتانیوم کلراید ۰/۱ درصد در اسید سولفوریک ۲۰ درصد (v/v) اضافه شد و محلول فوق به مدت ۱۵ دقیقه در ۶۰۰۰g سانتریفوژ گردید. جذب محلول زرد رنگ حاصل به وسیله‌ی اسپکتروفتومتر در طول موج ۴۱۰ نانومتر خوانده شد

رطوبت ۶۵ درصد قرار داده شدند. پس از ۱۰ روز کشت در شرایط یکنواخت، به اعمال تیمارها غلظت‌های ۲۵، ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میکرومولار سولفات مس ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) و سولفات نیکل ($\text{NiSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) به مدت ۱۰ روز به محلول غذایی اضافه گردید (Pourakbar et al., 2007). در زمان برداشت اندام هوایی و ریشه گیاهان جدا شده و پس از وزن کردن نمونه‌ها به منظور انجام آزمایشات بعدی در دمای ۸۰- درجه سانتی گراد نگهداری شدند (Hosseini Sarghein et al., 2011).

اندازه‌گیری طول ریشه و ساقه: پس از برداشت نمونه‌های

شاهد و تیمار طول بلندترین ریشه از ناحیه یقه تا نوک ریشه و طول بلندترین ساقه از ناحیه یقه تا نوک مریستم انتهایی با استفاده از خط‌کش اندازه‌گیری شد.

اندازه‌گیری وزن تر و خشک اندام هوایی و ریشه: پس از

برداشت، وزن تر نمونه‌های ریشه و اندام هوایی با استفاده از ترازوی دیجیتال با حساسیت ۰/۰۰۱ گرم اندازه‌گیری شد. برای تعیین وزن خشک نمونه‌ها به مدت ۷۲ ساعت در ۷۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. پس از مدت زمان ذکر شده وزن خشک نمونه‌ها با استفاده از ترازوی دیجیتال اندازه‌گیری شد.

اندازه‌گیری سطح برگ: جهت اندازه‌گیری سطح برگ به

صورت تصادفی سه گیاه از هر تیمار انتخاب و میزان سطح آنها با استفاده از دستگاه اسکنر (Epson, V300) و نرم افزار کامپیوتری (Flächenberechnung-einer-sw-Grafik) بر حسب سانتی‌متر مربع اندازه‌گیری شد.

اندازه‌گیری رنگی‌های کلروفیل و کاروتنوئید: به منظور اندازه

گیری رنگی‌های کلروفیل و کاروتنوئید ۰/۱ گرم از وزن تر برگ به همراه ۵ میلی لیتر استون ۱۰۰ درصد در هاون چینی ساینده شد. عصاره‌ی حاصل به مدت ۱۰ دقیقه در ۲۵۰۰g سانتریفوژ گردید. سپس جذب فاز بالایی هر یک از نمونه‌های سانتریفوژ شده توسط اسپکتروفتومتر (WPAS2100, UV/Vis UK) در طول موج‌های ۶۶۲ نانومتر، ۶۴۵ نانومتر و ۴۷۰ نانومتر خوانده شد (Lichtenthaler and Wellburn, 1985). برای محاسبه‌ی مقادیر کلروفیل a، کلروفیل b و کاروتنوئیدها از فرمول‌های زیر استفاده گردید (A) میزان جذب خوانده شده در هر طول موج توسط اسپکتروفتومتر می‌باشد.

(One way Anova) و آزمون دانکن در سطح احتمال آماری $P < 0.05$ انجام گرفت. همچنین جدول‌ها و شکل‌ها با استفاده از برنامه رایانه‌ای Excel سری ۲۰۰۷ ترسیم شدند. در کلیه شکل‌ها بارهای عمودی نشان دهنده $\pm SE$ برای سه تکرار می‌باشد.

نتایج:

طول ریشه و ساقه: بر اساس نتایج بدست آمده از این تحقیق مشخص شد که میزان رشد طولی در ساقه و ریشه اندام هوایی تحت تاثیر تیمارهای مختلف مس و نیکل با افزایش میزان غلظت کاهش یافته است. این کاهش در تیمارهای ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میکرومولار مس و همچنین در تیمارهای ۱۰۰ و ۲۰۰ میکرومولار نیکل در مقایسه با نمونه‌های شاهد معنی دار بود. این روند کاهش با افزایش غلظت تیمارهای مس و نیکل به ویژه در ریشه در مقایسه با اندام هوایی مشهودتر است (جدول ۱).

وزن تر و خشک اندام هوایی و ریشه: اندازه گیری وزن تر و خشک گیاهان تیمار شده با غلظت‌های مختلف مس و نیکل و مقایسه آن با نمونه‌های شاهد نشان داد که اعمال تیمارهای ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میکرومولار مس و همچنین تیمارهای ۱۰۰ و ۲۰۰ میکرومولار نیکل باعث کاهش معنی دار وزن تر و خشک در سطح احتمال آماری ۵ درصد نسبت به گیاهان شاهد شده است. این روند کاهش با افزایش غلظت در تیمارهای مس در مقایسه با تیمارهای نیکل بیشتر است (جدول ۱).

سطح برگ: نتایج حاصل از اندازه گیری سطح برگ در جدول ۱ بیانگر آن است که میزان سطح برگ در گیاهان تیمار شده با غلظت‌های مختلف مس و نیکل در مقایسه با نمونه‌های شاهد کاهش یافته است. این کاهش در تمام تیمارهای ۲۵، ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میکرو مولار مس و نیکل در سطح احتمال آماری ۵ درصد در مقایسه با نمونه‌های شاهد معنی داری بود. میزان کاهش سطح برگ در تیمارهای مس در مقایسه با تیمارهای نیکل بیشتر است.

رنگی‌های کلروفیل و کاروتنوئید: نتایج حاصل از سنجش رنگی‌ها در گیاهان تیمار شده با غلظت‌های مختلف مس و نیکل و مقایسه آن با نمونه‌های شاهد نشان داد که تحت تاثیر تنش‌های مس و نیکل میزان رنگی‌های فتوسنتزی کاهش یافته

(Jana and Choudhuri, 1981). جهت تعیین میزان پراکسید هیدروژن، منحنی استاندارد با استفاده از غلظت‌های معلوم پراکسید هیدروژن تهیه گردید.

سنجش فعالیت آنزیم‌های آسکوربات پراکسیداز (APX, EC 1.11.1.11) و کاتالاز (CAT, EC 1.11.1.6):

استخراج عصاره ی گیاهی برای تعیین فعالیت آنزیم‌ها با استفاده از روش (Kang and Saltiveit, 2002) با اندکی تغییرات انجام شد. ۰/۵ گرم از بافت تر ریشه، ساقه و برگ به همراه ۳ میلی لیتر بافر استخراج تریس-اسید کلریدریک ۵۰ میلی مولار (pH=۷/۵) محتوی ۳ میلی مولار $MgCl_2$ ، ۱ میلی مولار EDTA در هاون سرد ساییده شد. بافر استخراجی برای آنزیم APX محتوی ۰/۲ میلی مولار آسکوربات نیز بود. هموژنات حاصل به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی گراد در ۵۰۰۰g سانتریفوژ شد. محلول رویی برای سنجش فعالیت آنزیم‌های APX و CAT مورد استفاده قرار گرفت.

سنجش فعالیت آنزیم CAT با استفاده از روش (Aebi, 1984) انجام شد. مخلوط واکنش شامل ۲/۵ میلی لیتر بافر فسفات ۵۰ میلی مولار (pH= ۷) محتوی ۰/۲ میلی لیتر پراکسید هیدروژن ۱ درصد و ۰/۳ میلی لیتر عصاره استخراجی بود. فعالیت آنزیم CAT به صورت کاهش در جذب طی ۱ دقیقه در طول موج ۲۴۰ نانومتر خوانده شد. برای محاسبه میزان فعالیت CAT از ضریب خاموشی ($0.0436 \text{ m M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) استفاده گردید.

برای سنجش فعالیت آنزیم APX از روش (Nakano and Asada, 1981) استفاده گردید. مخلوط واکنش شامل ۲/۵ میلی لیتر بافر فسفات ۵۰ میلی مولار (pH=۷) محتوی ۰/۱ میلی مولار EDTA و آسکوربات سدیم ۱ میلی مولار، ۰/۲ میلی لیتر پراکسید هیدروژن ۱ درصد و ۰/۱ میلی لیتر عصاره استخراجی بود. فعالیت APX به صورت کاهش در جذب طی ۱ دقیقه در طول موج ۲۴۰ نانومتر خوانده شد. برای محاسبه میزان فعالیت APX از ضریب خاموشی ($2/8 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) استفاده گردید.

آنالیز آماری: آنالیز داده‌ها با استفاده از برنامه رایانه‌ای SPSS سری ۱۹، طی مسیر تجزیه‌ی واریانس یک‌طرفه

جدول ۱- تغییرات القاشله توسط غلظت‌های مختلف مس و نیکل در گیاه بلیمه

میلنگین مریمات									
سطح برگ	طول ریشه	طول اندام هوایی	طول اندام	وزن خشک اندام	وزن خشک ریشه	وزن تر اندام هوایی	وزن تر ریشه	شاخص	تیمار
(cm ²)	(cm)	(cm)	(mg/plant)	(mg/plant)	(mg/plant)	(gr/plant)	(gr/plant)		
۶۲/۹۵±۰/۱۳ ^a	۱۹/۶۶±۱/۲ ^a	۱۳/۵±۰/۷ ^a	۲۴۱±۱۱ ^a	۱۰۷±۸ ^a	۷/۲±۰/۱۸ ^a	۰/۹۹۵±۰/۰۷ ^a	شاهد		
۴۷/۱۶±۰/۱۳ ^b	۱۳/۵۶±۰/۴۷ ^b	۱۱/۹±۰/۹ ^b	۲۱۶±۹ ^b	۹۶±۲ ^b	۲/۰۱±۰/۱۴ ^b	۰/۸۹±۰/۰۳ ^b	Cu-25		
۴۰/۵۵±۰/۱۳ ^c	۱۲/۱۶±۰/۶ ^c	۹±۰/۴ ^{bc}	۸۳±۳ ^c	۷۸±۲ ^c	۱/۷۳±۰/۰۶ ^c	۰/۶۴±۰/۰۳ ^c	Cu-50		
۳۶/۱۴±۰/۱۳ ^c	۸/۴۳±۰/۳۴ ^c	۸/۱۳±۰/۴ ^c	۱۰۹±۳ ^d	۴۶±۳ ^d	۱/۰۱±۰/۰۷ ^d	۰/۴۲۹±۰/۰۴ ^d	Cu-100		
۲۷/۱۲±۰/۱۳ ^d	۷/۴۳±۰/۲۹ ^c	۷/۷±۰/۳ ^c	۸۳±۴ ^e	۲۲±۴ ^e	۰/۷۷±۰/۰۶ ^e	۰/۲۰۶±۰/۰۲ ^e	Cu-200		
۵۷/۷±۰/۱۳ ^a	۱۳/۸۳±۰/۹۷ ^b	۱۱/۲±۰/۳ ^b	۲۱۸±۴ ^b	۹۹±۲ ^b	۲/۰۳۵±۰/۰۸ ^b	۰/۹۲۲±۰/۰۴ ^b	Ni-25		
۴۹/۷۴±۰/۱۳ ^b	۱۱/۳۶±۰/۲۹ ^{be}	۱۰/۱±۰/۳ ^c	۱۹۱±۲ ^c	۹۲±۵ ^b	۱/۷۸±۰/۰۳ ^c	۰/۸۶۱±۰/۰۴ ^b	Ni-50		
۴۹/۷۴±۰/۱۳ ^c	۹/۳۳±۰/۲۳ ^c	۸/۹±۰/۳ ^c	۱۱۹±۴ ^d	۵۴±۳ ^f	۱/۱±۰/۰۶ ^d	۰/۵۰۲±۰/۰۳ ^c	Ni-100		
۳۵/۴۹±۰/۱۳ ^c	۷/۶۶±۰/۲۲ ^c	۸/۴۸±۰/۲۹ ^c	۱۰۵±۱ ^d	۳۳±۲ ^g	۰/۹۷۸±۰/۰۳ ^d	۰/۳۰۹±۰/۰۱ ^c	Ni-200		

مقایسه‌ی میلنگین دامعما با آزمون دانکن انجام گرفت حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی دار است.

است. کاهش میزان کلروفیل a در تمام تیمارهای مس و تیمارهای ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میکرومولار نیکل در مقایسه با نمونه های شاهد به صورت معنی دار بود. همان طور که در شکل ۱ مشاهده می شود شدت کاهش در تیمار ۲۵ میکرومولار مس در مقایسه با نیکل بسیار بیشتر بود و در غلظت های دیگر میزان کاهش تقریباً برابر مشاهده شد. علاوه بر این مشاهده گردید که کاهش در میزان کلروفیل b (شکل ۱) با افزایش غلظت تیمارها به ویژه در تیمارهای مس به صورت خطی می باشد. کاهش در تمام تیمارهای ۲۵، ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میکرومولار مس و نیکل در مقایسه با نمونه های شاهد به صورت معنی دار مشاهده شد. علاوه بر این مشاهده گردید که کاهش در میزان کلروفیل b (شکل ۱) با افزایش غلظت تیمارها به ویژه در تیمارهای مس به صورت خطی می باشد. کاهش در تمام تیمارهای ۲۵، ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میکرومولار مس و نیکل در مقایسه با نمونه های شاهد به صورت معنی دار مشاهده شد. کاهش میزان کاروتنوئید در تمام تیمارهای مس و نیکل در مقایسه با نمونه های شاهد به صورت معنی دار بود. همان طور که در شکل ۱ نشان می دهد شدت کاهش در تیمار ۲۵ میکرومولار مس در مقایسه با نیکل بسیار بیشتر است، اما در غلظت های ۵۰ و ۱۰۰ میکرومولار میزان کاهش کاروتنوئید در نیکل بیشتر و در تیمار ۲۰۰ میکرومولار هر دو فلز سنگین تقریباً برابر می باشد.

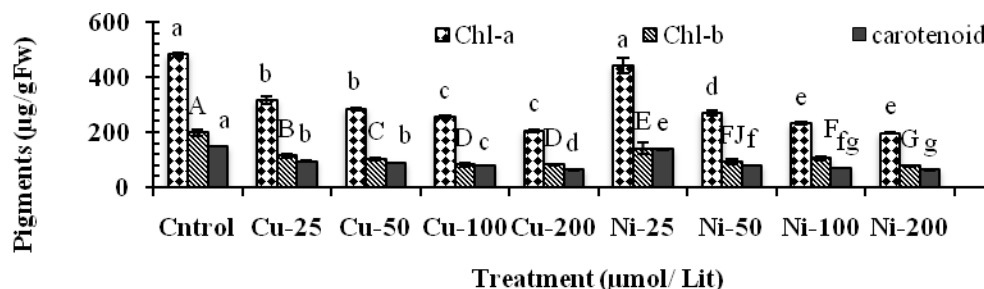
قند محلول: نتایج حاصل از اندازه گیری قندهای محلول در اندام هوایی گیاهان تیمار شده با غلظت های مختلف مس و نیکل و مقایسه آن با نمونه های شاهد در شکل ۲ نشان دهنده ی افزایش خطی قندهای محلول در اندام هوایی می باشد. روند افزایش قندهای محلول در اندام هوایی گیاهان تیمار شده با نیکل به مراتب بیشتر از گیاهان تیمار شده با مس می باشد. این افزایش قندهای محلول در اندام هوایی تیمارهای ۲۵، ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میکرومولار نیکل و تیمارهای ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میکرومولار مس در سطح احتمال آماری ۵ درصد در مقایسه با نمونه های شاهد معنی داری بود.

علاوه بر این بررسی نتایج حاصل از اندازه گیری میزان قند های محلول در ریشه گیاهان تیمار شده با مس و نیکل نشان داد که در تیمارهای ۲۵، ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میکرومولار نیکل و

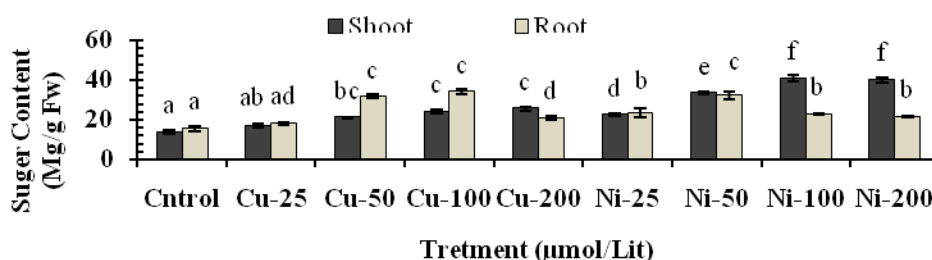
تیمارهای ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ مس در ریشه در سطح احتمال آماری ۵ درصد در مقایسه با نمونه های شاهد معنی داری بود. همان طور که شکل ۲- نشان می دهد در تیمارهای نیکل یک روند صعودی در میزان قندهای محلول ریشه تا غلظت ۵۰ میکرومولار و در تیمارهای مس این روند صعودی تا غلظت ۱۰۰ میکرومولار وجود دارد. همان طور که از شکل ۲ پیداست میزان افزایش قند های محلول در ریشه گیاهان تیمار شده با مس بیش از اندام هوایی آنها می باشد اما در گیاهان تیمار شده با نیکل افزایش قندهای محلول در اندام هوایی بیش از ریشه آنها است.

مالون دی آلدئید (MDA): اندازه گیری میزان MDA در ریشه و اندام هوایی گیاهان تیمار شده با غلظت های مختلف مس و نیکل و مقایسه آن با میزان MDA ریشه و اندام هوایی نمونه های شاهد نشان داد که اعمال تیمارهای ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میکرومولار هر دو فلز سنگین مس و نیکل باعث افزایش معنی دار میزان MDA در سطح احتمال آماری ۵ درصد نسبت به گیاهان شاهد شده اند (شکل ۳). بیشترین میزان افزایش MDA در اندام هوایی و ریشه گیاهان تیمار شده در غلظت ۲۰۰ میکرومولار هر دو عنصر مشاهده شد. همان طور که از شکل ۳ پیداست میزان افزایش MDA در اندام هوایی گیاهان تیمار شده با نیکل بیش از ریشه آنها می باشد اما در گیاهان تیمار شده با مس افزایش MDA در اندام هوایی تنها در غلظت ۲۰۰ میکرومولار بیش از ریشه آنها است و در غلظت های ۵۰، ۲۵ و ۱۰۰ میکرومولار کمتر از ریشه آنها است.

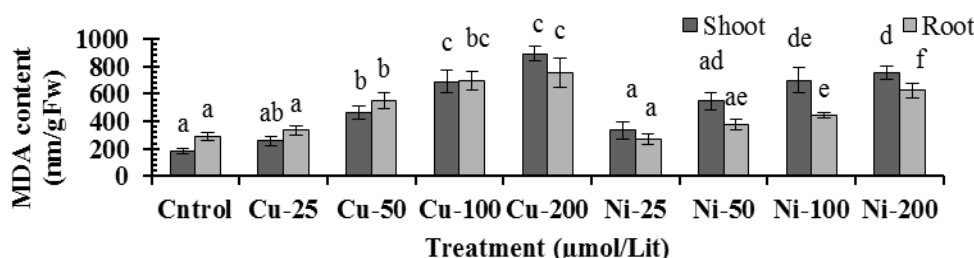
پراکسید هیدروژن (H_2O_2): بر اساس نتایج حاصله، میزان تولید H_2O_2 در گیاهان تحت تیمار مس و نیکل نسبت به گیاهان شاهد افزایش یافت (شکل ۴). این افزایش به ویژه در اندام هوایی گیاهان تیمار شده با غلظت های ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میکرومولار مس و نیکل و همچنین در ریشه گیاهان تیمار شده با غلظت های ۱۰۰ و ۲۰۰ میکرومولار مس و نیکل در سطح احتمال آماری ۵ درصد نسبت به گیاهان شاهد معنی دار بودند. بیشترین میزان تولید H_2O_2 در اندام هوایی گیاهان تیمار ۱۰۰ میکرومولار مس و نیکل و در ریشه گیاهان تیمار ۲۰۰ میکرومولار مس و نیکل مشاهده شد. شکل ۴ نشان می دهد که



شکل ۱- مقایسه‌ی میانگین ۳ تکرار $\pm$ SE میزان رنگیزه‌ها در نمونه‌های شاهد و تیمارهای مختلف مس و نیکل. مقایسه‌ی میانگین داده‌ها با آزمون دانکن انجام گرفت. حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی دار است.



شکل ۲- مقایسه‌ی میانگین ۳ تکرار $\pm$ SE قندهای محلول در اندام هوایی و ریشه در نمونه‌های شاهد و تیمارهای مختلف مس و نیکل. مقایسه‌ی میانگین داده‌ها با آزمون دانکن انجام گرفت. حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی دار است.



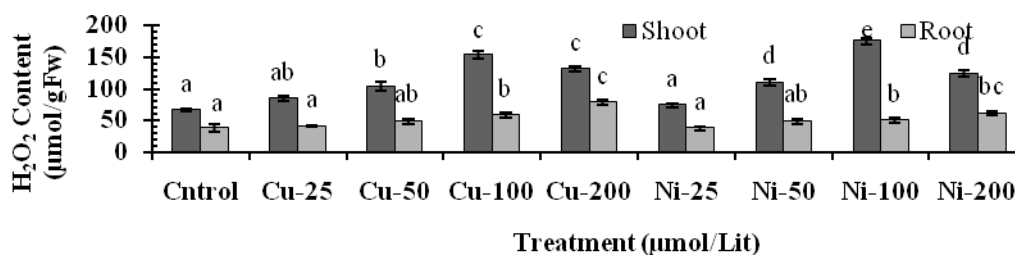
شکل ۳- مقایسه‌ی میانگین ۳ تکرار $\pm$ SE میزان MDA در اندام هوایی و ریشه نمونه‌های شاهد و تیمارهای مختلف مس و نیکل. مقایسه‌ی میانگین داده‌ها با آزمون دانکن انجام گرفت. حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی دار است.

مقایسه با نمونه‌های شاهد معنی‌داری بود. همچنین نتایج نشان می‌دهد که فعالیت آنزیم CAT در اندام هوایی و ریشه گیاهان تیمار شده با نیکل، همگام با افزایش غلظت تیمارها به صورت خطی افزایش می‌یابد، در حالی که این روند افزایشی فعالیت آنزیم در تیمارهای مس تنها تا غلظت ۱۰۰ میکرو مولار مشاهده می‌شود. شکل ۵ نشان می‌دهد که افزایش فعالیت آنزیم CAT در اندام هوایی تمام گیاهان تیمار شده مس و نیکل بیش از ریشه آنها می‌باشد.

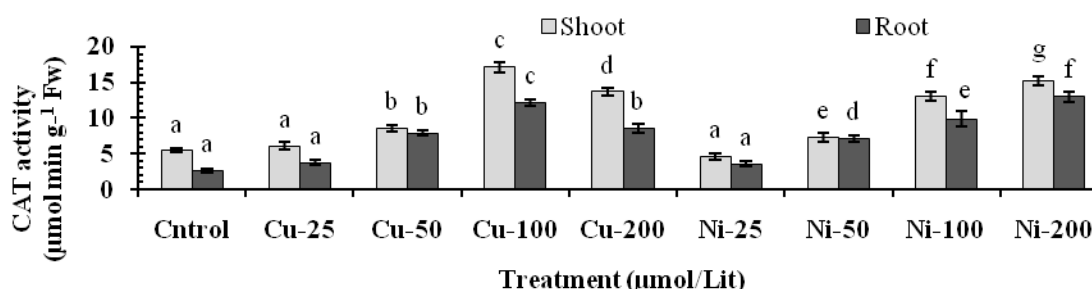
فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز (APX): نتایج حاصل از

میزان افزایش H_2O_2 در اندام هوایی تمام گیاهان تیمار شده مس و نیکل بیش از ریشه آنها می‌باشد.

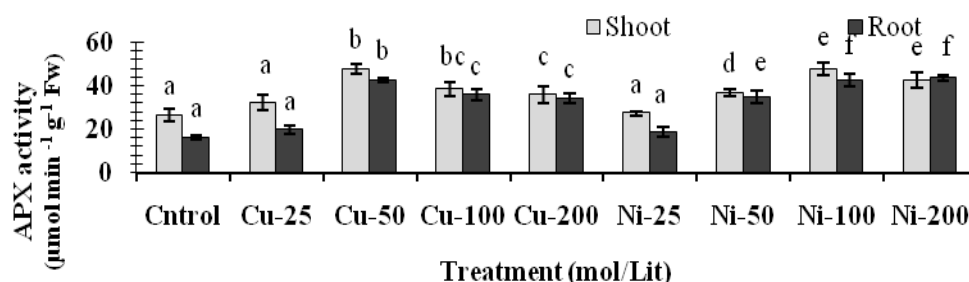
فعالیت آنزیم کاتالاز (CAT): نتایج حاصل از اندازه‌گیری فعالیت آنزیم CAT در اندام هوایی و ریشه گیاهان تیمار شده با غلظت‌های مختلف مس و نیکل و مقایسه آن با نمونه‌های شاهد در شکل ۵ نشان دهنده‌ی افزایش فعالیت این آنزیم تحت شرایط تنش می‌باشد. افزایش فعالیت CAT در اندام هوایی و ریشه گیاهان تیمار شده با غلظت‌های ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میکرومولار مس و نیکل در سطح احتمال آماری ۵ درصد در



شکل ۴- مقایسه‌ی میانگین ۳ تکرار $\pm$ SE میزان H_2O_2 در اندام هوایی و ریشه نمونه‌های شاهد و تیمارهای مختلف مس و نیکل. مقایسه‌ی میانگین داده‌ها با آزمون دانکن انجام گرفت. حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار است.



شکل ۵- مقایسه‌ی میانگین ۳ تکرار $\pm$ SE میزان فعالیت CAT در اندام هوایی و ریشه نمونه‌های شاهد و تیمارهای مختلف مس و نیکل. مقایسه‌ی میانگین داده‌ها با آزمون دانکن انجام گرفت. حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار است.



شکل ۶- مقایسه‌ی میانگین ۳ تکرار $\pm$ SE میزان فعالیت APX در اندام هوایی و ریشه نمونه‌های شاهد و تیمارهای مختلف مس و نیکل. مقایسه‌ی میانگین داده‌ها با آزمون دانکن انجام گرفت. حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار است.

غلظت‌های ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میکرومولار مس در مقایسه با نمونه‌های شاهد معنی‌دار است. همانطور که شکل ۵ نشان می‌دهد که افزایش فعالیت آنزیم APX در اندام هوایی تمام گیاهان تیمار شده مس و نیکل بیش از ریشه آنها می‌باشد.

بحث:

بررسی نتایج حاصل از اندازه‌گیری میزان رشد طولی ریشه و ساقه نشان داد که تنش فلزات سنگین مس و نیکل باعث کاهش معنی‌دار رشد طولی این اندام‌ها می‌شوند. مطالعات

اندازه‌گیری فعالیت آنزیم APX در اندام هوایی و ریشه گیاهان تیمار شده با غلظت‌های مختلف مس و نیکل و مقایسه آن با نمونه‌های شاهد نشان دهنده‌ی افزایش فعالیت این آنزیم تحت شرایط تنش می‌باشد (شکل ۶). افزایش میزان فعالیت APX در تیمارهای ۱۰۰ و ۲۰۰ میکرومولار نیکل در اندام هوایی و غلظت‌های ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میکرومولار نیکل در ریشه در مقایسه با نمونه‌های شاهد و در سطح احتمال آماری ۵ درصد معنی‌داری بود. همچنین نتایج نشان می‌دهد که میزان فعالیت آنزیم APX در اندام هوایی و ریشه گیاهان تیمار شده با

تیولی پروتئین‌های مسیر سنتز کلروفیل توانایی تخریب و غیر فعال کردن آنها را دارند (Helmy, 2010). به علاوه تحت تاثیر مس و نیکل مازاد کمبود دو عنصر آهن و منیزیم و همچنین افزایش فعالیت آنزیم کلروفیل‌از در گیاهان مشاهده شده است (Drazkiewicz and Baszynsk, 2010, Ouzounidou and Moustakas, 1997). نتایج حاصل بیانگر افزایش معنی دار قندهای محلول تحت تاثیر مس و نیکل مازاد در گیاه بامیه است. افزایش معنی‌دار در قندهای احیا کننده و غیر احیا کننده در گیاه رزماری تحت تاثیر غلظت‌های مختلف مس گزارش شده است. از عوامل افزایش قندهای محلول می‌توان افزایش آنزیم‌های تجزیه کننده ی قندهای غیر محلول مانند انورتاز و سوکروز سنتتاز و همچنین کاهش مصرف این قندها را مدنظر داشت (Verma and Dubey, 2001). Nohamed (۱۹۸۶) پیشنهاد کرده است که علت افزایش قندهای احیا کننده در برگ‌های تحت تاثیر فلزات سنگین منگنز، روی و آهن افزایش فعالیت آمیلولیتیک و افزایش قندهای محلول حاصل از پلی ساکاروئیدها می‌باشد. اندازه گیری میزان MDA تحت تاثیر تنش مس و نیکل و مقایسه آن با نمونه‌های شاهد نشان داد مس و نیکل سبب القای تولید MDA می‌شوند. این ترکیب به عنوان یک شاخص بیوشیمیایی برای تعیین آسیب‌های غشای توسط رادیکال‌های آزاد شناخته شده است. MDA در نتیجه‌ی پراکسیداسیون چربی‌های غیر اشباع به ویژه لینولئیک اسید تولید می‌شود. در واقع رادیکال‌های هیدروکسیل و اکسیژن منفرد می‌تواند با گروه‌های متیلن واکنش داده و باعث تشکیل گروه‌های دی-ان (Dienes) رادیکال‌های پراکسی لیپید و هیدروپراکسیدها شوند، این رادیکال‌ها نیز با جذب هیدروژن از اسیدهای چرب غیر اشباع باعث واکنش زنجیروار پراکسیداسیون می‌شوند (Smirnoff, 1995). افزایش در میزان MDA تحت تنش مس در مطالعه حاضر با نتایج حاصل از بررسی اثر فلز سنگین مس بر روی تولید ROS و میزان MDA در گیاه چمن هم سویی دارد (Shulan et al., 2010). همچنین افزایش در میزان MDA تولید شده در مطالعه حاضر تحت تنش نیکل نیز با نتایج حاصل از تاثیر مازاد نیکل بر روی دانه رست‌های برنج مطابقت دارد (Ruchi and Dubey, 2009).

نشان داده است که فلزات سنگین با مهار تقسم میتوزی و جلوگیری از تطویل سلولی سبب مهار رشد ریشه به عنوان اندام اصلی جذب مواد می‌شوند (Shulan et al., 2010). بررسی‌های راون و همکاران (Raven et al., 1999) نشان داد که سیتوکنین برای تقسیم سلولی و اکسین برای طولی شدن سلول‌ها مورد نیاز می‌باشد. در گیاه جو مشاهده شده است که با تحت تاثیر فلز سنگین مس فعالیت آنزیم اکسین اکسیداز افزایش می‌یابد (Coombes et al., 1976). به علاوه در غلظت‌های بالا فلزات سنگین با مهار ساخت RNA های ریبوزمی در سلول‌های مرستمی سبب کاهش رشد می‌گردند (Serida et al., 2008). کاهش معنی دار سطح برگ تحت تنش مس در مطالعه حاضر با نتایج حاصل از بررسی اثر فلز سنگین مس بر روی گسترش برگی ذرت (Mocquot et al., 1996) و گیاه *Empetrum nigrum* (Monni et al., 2000) مطابقت دارد. همچنین کاهش معنی‌دار سطح برگ تحت تنش نیکل نیز با مطالعات انجام شده بر روی گیاهان لوبیای سودانی و کلم زینتی مطابقت دارد (Molas, 1997; Sheoran et al., 1990). نتایج حاصل از اندازه‌گیری وزن تر و خشک اندام هوایی و ریشه و مقایسه آن با نمونه‌های شاهد نشان داد که میزان تولید زیست توده در حضور مس و نیکل کاهش یافته است. کاهش زیست توده تحت تاثیر مس و نیکل در گیاه *Empetrum nigrum* (Monni et al., 2000) و تحت تاثیر نیکل در دانه رست‌های برنج (Ruchi and Dubey, 2009) گزارش شده است. به علاوه کاهش زیست توده تحت تاثیر مس در این مطالعه با نتایج حاصل از بررسی اثر مس در گیاه بوزیدان هم سویی دارد (Serida et al., 2008). کاهش زیست توده تاثیر عناصر سنگین نشان دهنده کاهش و اختلال در سنتز پروتئین‌ها و همچنین کاهش فعالیت دستگاه فتوسنتزی می‌باشد (Manivasagaperumal et al., 2011). بررسی نتایج حاصل از اندازه گیری کلرفیل a, b و کارتنوئیدها نشان داد که تنش مس و نیکل سبب کاهش معنی دار آنها می‌شود. کاهش در میزان رنگیزه‌های فتوسنتزی می‌تواند به علت اثرات مخرب فلزات سنگین بر روی سنتز رنگیزه‌ها باشد (Stobart et al., 1985). گزارش شده است که فلزات سنگین با اتصال به گروه‌های

که گونه‌های فعال اکسیژن را جاروب می‌کنند و از اکسیداسیون لیپیدها، تخریب کلروفیل و آسیب‌های دیواره سلولی جلوگیری می‌کنند (Jithesh *et al.*, 2006). افزایش تولید ROSها و به دنبال آن افزایش در فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدان SOD, CAT, GR, APX و POD تحت تنش مس در گیاه بوزیدان (Serida *et al.*, 2008) و تحت تنش نیکل در گیاه علف چشمه مشاهده شد (Fatih and Fatma, 2010).

نتیجه گیری:

به عنوان نتیجه‌ی کلی می‌توان گفت که تاثیرات منفی تنش فلزات سنگین مس و نیکل در گیاه بامیه به صورت کاهش کارایی دستگاه فتوسنتزی، کاهش رشد، کاهش زیست توده و ایجاد تنش اکسیداتیو بروز یافته‌اند. با توجه به داده‌های حاصل از این آزمایش‌ها و مطالعات پیشین محققین بر روی سایر گیاهان می‌توان افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدان را در جهت کاهش اثرات تخریبی ROSهای ناشی از تنش دانست. در این راستا می‌توان گیاه بامیه را در زمره گیاهان حساس به تنش مس و نیکل دانست. به علاوه نتایج این مطالعه نشان داد که اثرات تخریبی فلز مس نسبت به نیکل بر روی گیاه بامیه بیشتر است. هر چند با افزایش بیشتر غلظت عناصر مس و نیکل فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدان افزایش یافت اما اثرات تخریبی ناشی از غلظت‌های مس و نیکل به ویژه ۱۰۰ و ۲۰۰ میکرو مولار غیر قابل مهار و ترمیم بود به گونه‌ای که ادامه تیمار سبب مرگ دسته‌ای از گیاهان شد. با توجه به اینکه تاکنون مطالعاتی در زمینه تنش فلزات مس و نیکل بر روی گیاه بامیه انجام نشده است مطالعه حاضر می‌تواند به عنوان پیشگام در زمینه شناسایی ارقام مقاوم و مناسب گیاه بامیه باشد.

تشکر و قدردانی:

از خانم مهندس ندا فرناد کارشناس آزمایشگاه بیوشیمی، خانم هانیه مراد بیگی دانشجوی دکترای فیزیولوژی گیاهی به خاطر همکاری در تهیه‌ی مواد و استفاده از دستگاه‌ها و از خانم‌ها

افزایش تولید H_2O_2 معنی دار در گیاه بامیه تحت تیمار مس و نیکل در مقایسه با نمونه‌های شاهد نشان دهنده ی افزایش تنش اکسیداتیو ناشی از غلظت های مازاد این دو عنصر می باشد. ماندل و چادوری (Mondal and Choudhuri, 1982) گزارش کرده‌اند که افزایش سطوح H_2O_2 آندوزنی موجب القاء پیری و پراکسیداسیون چربی در گیاهان می گردد. هانگ و همکاران (Hong *et al.*, 2008) اعلام کردند که گونه‌های فعال اکسیژن به ویژه سوپراکسید و پراکسید هیدروژن به عنوان پیامبر ثانویه با خیلی از فرآیندهای رشد و توسعه گیاه مرتبط می‌باشند. در حقیقت گونه‌های فعال اکسیژن، قسمتی از فرآیند های سیگنالی هشدار دهنده در گیاهان می‌باشد که باعث تغییر متابولیسم و یا بیان ژن‌ها تحت شرایط تنش محیطی می‌شوند (Katerova, 2009). مشاهداتی مبنی بر اینکه H_2O_2 می‌تواند به عنوان یک مولکول سیگنالی عمل کند و باعث افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدان شود، توسط کاتروا (Katerova, 2009) گزارش شده است. در مطالعه ی حاضر مشخص شد که میزان فعالیت آنزیم CAT و APX تحت تاثیر فلزات سنگین مس و نیکل افزایش یافته است. نتایج حاصل نشان می دهد که افزایش فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدان CAT و APX در مقایسه با نمونه های شاهد معنی دار است. APX به عنوان اولین خط دفاعی در مقابل H_2O_2 می باشد. APX باعث تبدیل H_2O_2 به آب می‌گردد، این آنزیم از آسکوربیک اسید به عنوان دهنده ی الکترون در اولین مرحله ی چرخه ی گلوکوتایون-آسکوربات استفاده می‌کند، در این چرخه APX دو مولکول آسکوربیک اسید را به عنوان دهنده مصرف می‌کند تا H_2O_2 را به آب تبدیل کند. APX برای پاکسازی H_2O_2 در اندامک های داخل سلول مورد نیاز است و با این عمل به حفظ حالت ردوکس در سلول ها کمک می‌کند (Asada, 1992). در گیاه آراییدوپسیس مشاهده شد که افزایش H_2O_2 تحت شرایط تنش، تغییراتی را در انتقال الکترون پلاستوکینون ایجاد می کند و احتمالاً این تغییر سبب القا APX_2 و دیگر دیگر خانواده ژنی $CAPX$ می‌گردد (Shigeru *et al.*, 2002). آنزیم‌های CAT هموترامریک هستند و باعث تجزیه H_2O_2 به آب و اکسیژن می‌شوند. CAT و SOD آنزیم‌های مهم پاداکسایشی هستند

تشکر و قدردانی می‌گردد.

دکتر نیر محمدخانی، فاضله محمدی، سمیرا شوکت یاری و
سمانه کارگر به خاطر همکاری و مساعدت در این تحقیق

منابع:

- (*Capsicum longum* A.DC). Turkish Journal of Biology 35: 69-77.
- Hu, K. D., Hu, L. Y., Liyh, Z. F. Q. and Zhang, H. (2007) Protective roles of nitric oxide on germination and antioxidant metabolism in wheat seeds under copper stress. Plant Growth Regulation 53: 173-183.
- Jana, S. and Choudhuri, M. A. (1981) Glycolate Metabolism of Three Submerged Aquatic Anagiosperms During Aging. Journal of Aquatic Botany 12: 345-354.
- Javed, H., Aziz, M. A. and Leghari R. A. K. (2009) Resistance in different Okra cultivars (*Abelamoschus Escullentus* L.) against american bollworm *Helicoverpa armigera* Hub. Journal of Agriculture 47: 433- 438.
- Jithesh, M. N., Prashanteh, S. R., Sivaprakash, K. R., and Ajayk, P. (2006) Antioxidative response mechanisms in halophytes heir role in stress defence: Journal of Genetics 85:237-254.
- Kabata, P. A. and Pendias, H. (1992) Trace elements in soil and plants. CRC Press, Boca Raton.
- Kang, H. M. and Saltiveit, M. E. (2002) Chilling tolerance of Maize, Cucumber and Rice seedling (leaves and roots) and differentially affected by salicylic acid. Journal of Physiologia Plantarum 115: 577-576.
- Katerova, Z. (2009) Prolonged influence of short pulses ultraviolet-C radiation on young pea Plant does not alter important antioxidant defense enzyme activities in young leaves. Journal of Plant Physiology 35:134-139.
- Keshi, S. (2007) Effects of copper on the photosynthesis and oxidative metabolism of *Amaranthus tricolor* seedlings. Agricultural Sciences in China 6: 1182-1192.
- Ku'pper, H., Kroneck, P. M. H., (2007) Nickel in the environment and its role in the metabolism of plants and cyanobacteria. In: Metal Ions in Life Sciences (Eds. Sigel, A., Sigel, H. and Sigel, R. K. O.), pp. 31-62. Wiley, New York.
- Lichtenthaler, H. K. and Wellburn, A. R. (1985) Determination of total carotenoids and chlorophylls a and b of leaf in different solvents. Biochemical Society Transactions 11: 591-592.
- Manivasagaperumal, R., Vijayarengan, P., Balamurugan, S. and Thiagarajan, G. (2011) Effect of coupper on growth, dry matter yield and nutrient content of *Viggna Radiata* L. Journal of Phytology 3: 53-62.
- Marschner, H. (1995) Mineral nutrition of higher plants. Academic, London.
- Aebi, H. (1984) Catalase *In Vitro*. Journal of Meth Enzymol 105: 121-126.
- Asada, K. (1992) Ascorbate peroxidase and hydrogen peroxide scavenging enzyme in plants. Journal of Plant Physiology 85: 235-241.
- Briat, J. F. and Lebrun, M. (1999) Plant responses to metal toxicity, C. R. Academic Science Paris 322: 43-54.
- Coombes, A. J., Lepp, Nu. W. and Phipps, D. A. (1976) The effect of copper on IAA-oxidase activity in root tissue of barley (*Hordeum vulgare* cv.Zephyr), Zeitschrift fur Pflanzenphysiologie 80: 236-242.
- Dat, J., Vandenabeele, S., Vranovaa, E., Van Montagu, M., Inzé, D. and Van Breusegem, F. (2000) Dual action of the active oxygen species during plant stress responses, Cellular and Molecular Life Science 57: 779-795.
- Drazkiewicz, M Baszynsk, T. (2010) Interference of nickel with the photosynthetic apparatus of *Zea mays*. Ecotoxicology and Enviromental Safety 73: 982-986.
- Elisabetta, M., Gioacchino, S. (2004) Copper-induced changes of non-protein thiols and antioxidant enzymes in the marine microalga *Phaeodactylum tricornutum* Plant Science 167: 289-296
- Fatih, D., Fatma, O. (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.
- Giordani, C., Cecchi, S. and Zanchi, C. (2005) Phytoremediation of soil polluted by nickel using agricultural crops. Environmental Management 36: 675-681.
- Halliwell, B. and Gutteridge, J. M. C. (1984) Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. Biochemical Journal 219: 1-14.
- Helmy L. H. (2010) The influence of nickel sulphate on some physiological aspects of two cultivars of *Raphanus Sativus* L. Archives Biology Science Belgrade 62: 683-691.
- Heath, R. L. and Packer, L. (1968) Photoperoxidation in Isolated Chloroplasts. Archives Biochemistry Biophysics 125: 850-857.
- Hong, B. S., Li, Y. C., Zhao, H. L., Cong, M. K. (2008) Primary antioxidant free radical scavenging and redox signaling pathways in higher plant cells. Plant Biology Science 4: 8-14.
- Hosseini Sarghein, S., Carapetian, J. and Khara, J. (2011) The Effects of UV radiation on some structural and ultrastructural parameters in Pepper

- that affect sugar refining , In: Proceedings of the 6th Technical Session on Bone Char (ed. V.R. Deitz). pp: 67-99. Bone Char Research Project. Inc
- Ruchi M. R. and Dubey, R. S. (2009) Nickel-induced oxidative stress and the role of antioxidant defence in rice seedlings. *Plant Growth Regulation* 59 : 37-49.
- Seregin, I. V. and Kozhevnikova, A. D. (2006) Physiological role of nickel and its toxic effects on higher plants. *Russian Journal of Plant Physiology* 53: 257-277.
- Serida, K., Mohammad, B. A., Eun, J. H. and Kee, Y. P. (2008) Copper toxicity in *Withania somnifera*: Growth and antioxidant enzymes responses of in vitro grown plants. *Environmental and Experimental Botany* 64: 279-285.
- Sheoran, I. S., Singal, H. R. and Singh, R. (1990) Effect of cadmium and nickel on photosynthesis and the enzymes of the photosynthetic carbon reduction cycle in Pigeonpea (*Cajanus cajan* L.). *Photosynthesis Research* 23: 345-351.
- Shigeru, S., Takahiro, I., Masahiro, T., Yoshiko, M., Toru, T. and Yukinori, Y. (2002) Regulation and function of ascorbate peroxidase isoenzymes. *Journal of Experimental Botany* 53: 1305-1319.
- Shulan, Z., Qing L., Yanting, Q. and Lian, D. (2010) Responses of root growth and protective enzymes to copper stress in turf grass. *Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica* 52: 7-11.
- Smirnoff, N. (1995) Antioxidant Systems and Plant Response to the Environment. In: *Environment and Plant Metabolism: Flexibility and Acclimation*. (Ed. Smirnoff, N). pp 217-243. Bio Scientific Publishers, Oxford.
- Stobart, A. K., Griffiths, W. T., Ameen-Bukhari, I. and Sherwood, R. P. (1985) The effect of Cd²⁺ on the biosynthesis of chlorophyll in leaves of barley. *Physiological Plantarum* 63: 293-298.
- Verma, S. and Dubey, R. S. (2001) Effect of cadmium on soluble sugars and enzymes of hair metabolism in rice. *Biologia Plantarum* 1:117-123 .
- Xu, J., Yang, L., Wang, Z., Dong, G., Huang, J. and Wang, Y. (2006) Toxicity of copper on rice growth and accumulation of copper in rice grain in copper contaminated soil. *Hemosphere* 62: 602-607.
- Zhu, B. and Alva, A. K. (1993) Effect of pH on growth and uptake of copper by *Swingle citrumelo* seedlings. *Journal of Plant Nutrition* 16: 1837-1845.
- Mishra, S., Srivastava, S., Tripathi, R. D., Govindarajan, R., Kuriakose, S. V. and Prasad, M. N. V. (2006) Phytochelatin synthesis and response of antioxidants during cadmium stress in *Bacopa monnieri* L. *Plant Physiology and Biochemistry* 44: 25-37.
- Mishra, D. and Kar, M. (1974) Nickel in plant growth and metabolism. *Botanical Review* 40: 395-452.
- Mocquot, B., Vangronsvel, J., Clijsters, H. and Mench, M. (1996) Copper toxicity in young maize (*Zea mays* L.) plants: Effects on growth, mineral and chlorophyll contents and enzyme activities. *Plant and Soil* 182:287-300.
- Molas, J. (1997) Changes in morphological and anatomical structure of cabbage (*Brassica oleracea* L.) outer leaves and in ultrastructure of their chloroplasts caused by an *in vitro* excess of nickel. *Photosynthetica* 34: 513-522.
- Monni, S., Salemaa, M. and Millar, N. (2000) The tolerance of *Empetrum nigrum* to copper and nickel. *Environmental Pollution* 109: 221-229
- Mondal, R. and Choudhuri, M. A. (1982) Regulation of excised leaves of some C₃ and C₄ species by endogenous H₂O₂. *Biochemistry and Physiology Pflanzen* 177: 403-417.
- Nakano, Y. and Asada, K. (1981) Hydrogen Peroxide is Scavenged by Ascorbate Specific Peroxidase in Spinach Chloroplasts. *Journal of Plant Cell Physiol* 22: 867-880.
- Nohamed, S. I. (1986) Growth and yield of tomato and squash in soil treated with Mn. *Hort Science* 29: 723-730.
- Ouzounidou, G., Moustakas, M. and Strasser, R. J. (1997) Sites of action of copper in the photosynthetic apparatus of maize leaves: Kinetic analysis of chlorophyll fluorescence, oxygen evolution, absorption changes and thermal dissipation by photoacoustic signal. *Australian Journal of Plant Physiology* 24: 81-90.
- Pourakbar, L. Khayami, M. Khara, J. and Farbodnia, T. (2007) Physiological effects of copper on some biochemical parameters in *Zea mays* L. seedlings. *Pakistan Journal of Biological Sciences* 10: 4092-4096.
- Prasad, M. N. V. (2004) Heavy metal stress in plants: from biomolecules to ecosystems. 2nd Narosa Publishing House, 22 Daryaganj, New Delhi.
- Raven, P. H., Evert, R. F. and Eichhorn, S. E. (1999) *Biology of plants*, Freeman, Worth Busl 673-701.
- Roberts, E. J. and Martin, L. F. (1959) Progress in determining organic non-sugars of sugarcane juice