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

سروش کارگر خرّمی و رشید جامعی *

گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه ارومیه

(تاریخ دریافت: ١٣٩٢/١٠/٠٨ ، تاریخ پذیرش نهایی: ١٣٩٣/٠٦/٢٩)

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 رست های ٤ روزه به گلدان های ١ لیتری محتوی محلول هوگلند انتقال داده شدند. پس از ١٠ روز به منظور تیمار، فلزات مس و نیکل به صورت سولفات مس ($CuSO_4$) و سولفات نیکل ($NiSO_4$) و در غلظت‌های (٠، ٢٥، ٥٠، ١٠٠و ٢٠٠ 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 فتوسنتزی، سطح برگ، میزان رشد طولی، وزن تر و وزن خشک تحت تاثیر تیمارهای ٥٠، ١٠٠و٢٠٠ میکرو مولار مس و تیمارهای١٠٠و٢٠٠میکرو مولار نیکل در مقایسه با نمونه-های شاهد کاهش یافته‌اند. محتوای قند محلول اندام هوایی و ریشه گیاهان تحت تیمار تمام غلظت‌های نیکل و غلظت‌های٥٠، ١٠٠و٢٠٠ 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 غلظت های ٥٠، ١٠٠و میکرو مولار٢٠٠ مس و نیکل افزایش چشم‌گیری را نسبت به نمونه‌های شاهد داشتند. نتایج نشان داد که غلظت های 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 فتوسنتزی، قند محلول، گیاه بامیه، مالون دی آلدئید.

مقدمه:

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 جلبک ها می باشد این عنصر در ساختار برخی پروتئین ها که فعالیت آنزیمی دارند شرکت می‌کند (Elisabetta, 2004). وجود ٥ تا ٣٠ میلی گرم مس در هر کیلوگرم وزن خشک برای رشد نرمال گیاهان ضروری می‌باشد (Kabata and Pendias, 1992). غلظت بالای مس سبب کاهش رشد طبیعی گیاه از طریق تداخل در فرایندهایی مانند تنفس و فتوسنتز 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 بافت های گیاه توزیع می شود (Giordani *et al.,* 2005). غلظت نیکل در گیاهان در محدوده‌ی ٠/١-٥ $\mu g/g\ dw^{-1}$ می‌باشد (Mishra and Kar, 1974) و برای

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

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-03-29]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1394.4.11.11.9]

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 آنیون‌های سوپر اکسید و یا پراکسید هیدروژن از طریق واکنش هابر- وایز (Haber–Weiss) دارند (Halliwell and Gutteridge, 1984). رادیکال‌های هیدروکسیل توانایی اکسیداسیون ماکرومولکول‌ها مانند DNA، پروتئین‌ها 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) . بررسی‌ها نشان داده است که با افزایش غلظت مس میزان کلروز برگی و نکروزه شدن حاشیه برگی افزایش می‌یابد (Zhu and Alva, 1993). از پیامدهای تنش مس می‌توان کاهش رشد و میزان زیست توده را اشاره کرد (Xu *et al.,* 2006) . فلز سنگین نیکل در غلظت های بالا می‌تواند با مهار چرخه ی تقسیم سلول‌های آندودرم و دایره محیطی از تولید ریشه‌های 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 سلول‌های گیاهی با دارا بودن سیستم‌های حفاظتی آنتی اکسیدانی آنزیمی و غیر آنزیمی، می‌توانند اثرات مخرب ROSهای تولید شده را برطرف کنند. این سیستم آنزیمی شامل آنزیم‌های سوپر اکسید دیسموتاز (SOD)، کاتالاز (CAT)، گلوتاتیون‌ردوکتاز (GR)، آسکوربات پراکسیداز (APX) و پراکسیدازها (POD) و سیستم غیر آنزیمی شامل ترکیبات (آسکوربات، گلوتاتیون، آلفاتوکوفرول و کاروتنوئیدها) می‌باشند (Mishra *et al.,* 2006). گیاه بامیه با نام علمی (*Hibiscus esculentus* L.) متعلق به تیره‌ی پنیرکیان یا Malvaceae می‌باشد. بامیه یکی از مهمترین سبزیجات است که در مناطق گرم و گرمسیری کاشته می‌شود، و یک جایگاه خاص در برنامه‌ی غذایی روزانه ی این مناطق دارد. این گیاه به عنوان یک منبع ارزان قیمت از پروتئین‌ها، آمینو اسیدها، کربوهیدراتها، ویتامینها (A, B, C) و مواد معدنی در این مناطق به شمار می‌رود. ریشه ها و ساقه‌های گیاه بامیه به عنوان پاک کننده‌ی جوهر و همچنین قهوه‌ای کردن شکر مورد استفاده قرار می‌گیرد. در صنعت از میوه های رسیده و ساقه‌ها که محتوی فیبر زیادی می‌باشند برای تهیه‌ی کاغذ استفاده می‌کنند (Javed *et al.,* 2009). گیاه بامیه در مناطق گرمسیری ایران به ویژه در استان خوزستان کشت می‌شود. 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 غلظت‌های مختلف مس و نیکل (۰، ۲۵، ۵۰، ۱۰۰و ۲۰۰ میکرو مول بر لیتر) و بررسی شدت آسیب‌های وارده بر شاخص‌های رشدی و فیزیولوژیکی و همچنین مطالعه میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی آکسیدان 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 دیش‌های حاوی دو لایه کاغذ صافی مرطوب به مدت ٤ روز انجام شد. به گلدان های ۱ لیتری حاوی دانه رست‌ها محلول هوگلند یک چهارم قدرت در هفته اول (۱٦ میلی مولار KNO_3 ، ٦ میلی مولار $Ca(NO_3)_2 H_2O$ ، ٤ میلی مولار $NH_4 H_2 PO_4$ ، ۲ میلی مولار $MgSO_4$ ، ۵۰ میکرو مولار KCl ، ۲۵ میکرو مولار H_3BO_3، ۲ میکرو مولار $MnSO_4 .2H_2O$، ۲ میکرو مولار $ZnSO_4 7H_2O$، ۰/۵ میکرو مولار $CuSO_4 .5H_2O$، ۰/۵ میکرو مولار H_2MoO_4، ٤۰ میکرو مولار Fe–EDTA) و یک دوم قدرت در هفته‌های بعد داده شدند. گلدان‌ها در اتاقک‌های کشت در دمای ۲± ۲۵ درجه‌ی سانتی‌گراد، با شرایط نوری ۱٦ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی، شدت نور $\mu mol.m^{-2}.s$ ۱۵۰ و

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-03-29]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1394.4.11.11.9]

رطوبت ٦٥ درصد قرار داده شدند. پس از ۱۰ روز کشت در شرایط یکنواخت، به اعمال تیمارها غلظت‌های ۲۵، ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میکرومولار سولفات مس ($CuSO_4.5H_2O$) و سولفات نیکل ($NiSO_4\ 6H_2O$) 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 نمونه ها 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 اندازه گیری 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 آون 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 (Flachenberechung-einer-sw-Grafik) بر حسب سانتی‌متر مربع اندازه‌گیری شد.

اندازه‌گیری رنگیزه‌های کلروفیل و کاروتنوئید: به منظور اندازه گیری رنگیزه‌های کلروفیل و کاروتنوئید ۰/۱ گرم از وزن تر برگ به همراه ۵ میلی لیتر استون ۱۰۰ درصد در هاون چینی ساییده 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 ٦٦٢ نانومتر، ٦٤٥ نانومتر و ٤٧٠ نانومتر خوانده شد (Lichtenthaler and Wellburn, 1985). برای محاسبه ی مقادیرکلروفیل a، کلروفیل b و کاروتنوئیدها از فرمول‌های زیر استفاده گردید (A میزان جذب خوانده شده در هر طول موج توسط اسپکتروفتومتر می‌باشد.

$$Chla = 11.75\ A_{662} - 2.350\ A_{645}$$
$$Chlb = 18.61\ A_{645} - 3.960\ A_{662}$$
$$C_{X+C} = 1000\ A_{470} - 2.270\ Chla - 81.4\ Chlb / 227$$

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 لیترآب مقطر خوب سائیده شد و سپس با تنظیف ٤ لایه صاف گردید. روی ۱ میلی لیتر از عصاره‌ی حاصله ۱ میلی لیتر فنل ۵ درصد و ۳ میلی‌لیتر اسید سولفوریک ۹۸ درصد اضافه شد. سپس نمونه‌ها به مدت ۱ ساعت در دمای آزمایشگاه انکوبه شدند. بعد از ظهور رنگ میزان جذب در ٤٨٥ 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 اندازه گیری میزان MDA ۰/۲ گرم از بافت‌تر گیاهی در ۵ میلی لیترتری کلرواستیک اسید (TCA) ۱ درصد ساییده شد. هموژنات‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در ۸۰۰۰g سانتریفوژ شدند. روی یک میلی لیتر از محلول رویی ٤ میلی لیتر از محلول محتویTCAی۲۰ 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 در۸۰۰۰g جذب نمونه‌ها در دو طول موج ۵۳۲ نانومتر و٦٠٠ نانومترخوانده شد. میزان MDA از ضریب خاموشی ($۱۵۵\ mM^{-1}\ cm^{-1}$) محاسبه شد (Heath and Packer, 1968).

اندازه گیری میزان پراکسید هیدروژن (H_2O_2): ۰/۵ گرم بافت تر ریشه و اندام هوایی به همراه ۳ میلی لیتر بافر فسفات (pH=٦/٨) ساییده شد. هموژنات حاصل به مدت ۲۵ دقیقه در ٦٠٠٠g سانتریفوژ گردید. برای تعیین میزان پراکسید هیدروژن، روی ۳ میلی لیتراز عصاره ی 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 ٦٠٠٠g سانتریفوژ گردید. جذب محلول زرد رنگ حاصل به وسیله ی اسپکتروفتومتر در طول موج ٤١٠ نانومتر خوانده شد

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-03-29]
[DOR: 20.1001.1.23222727.1394.4.11.11.9]

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

سنجش فعالیت آنزیم های آسکوربات‌پراکسیداز (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 بافراستخراج 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 ٤ درجه سانتی گراد در ۵۰۰۰g سانتریفوژ شد. محلول رویی برای سنجش فعالیت آنزیم های 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 لیتربافر 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 ۲٤۰ نانومتر خوانده شد. برای محاسبه میزان فعالیت CAT از ضریب خاموشی($m\ M^{-1}\ cm^{-1}$ ۰/۰٤۳٦) استفاده گردید.

برای سنجش فعالیت آنزیم APX از روش (Nakano and Asada, 1981) استفاده گردید. مخلوط واکنش شامل ۲/۵ میلی لیتربافر 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 ۲٤۰ نانومتر خوانده شد. برای محاسبه میزان فعالیت APX از ضریب خاموشی ($mM^{-1}\ cm^{-1}$ ۲/۸) استفاده گردید.

آنالیز آماری: آنالیز داده‌ها با استفاده از برنامه رایانه‌ای SPSS سری ۱۹، طی مسیرتجزیه‌ی واریانس یک‌طرفه (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 شکل ها بارهای عمودی نشان دهنده 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، ۱۰۰و۲۰۰ میکرومولار مس و همچنین در تیمارهای ۱۰۰و۲۰۰ میکرومولار نیکل در مقایسه با نمونه های 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 غلظت های مختلف مس و نیکل و مقایسه آن با نمونه های شاهد نشان داد که اعمال تیمارهای ۵۰، ۱۰۰و۲۰۰ 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 نمونه های شاهد کاهش یافته است. این کاهش در تمام تیمارهای۲۵، ۵۰ ، ۱۰۰و۲۰۰ میکرو مولار مس و نیکل در سطح احتمال آماری ۵ درصد در مقایسه با نمونه های شاهد معنی داری بود. میزان کاهش سطح برگ در تیمارهای مس در مقایسه با تیمارهای نیکل بیشتر است.

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

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-03-29]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1394.4.11.11.9]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1394.4.11.11.9] [Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-03-29]

جدول۱- تغییرات القا شده توسط غلظت‌های مختلف مس و نیکل در گیاه بامیه

	میانگین مربعات						
شاخص تیمار	وزن تر ریشه (gr/plant)	وزن تر اندام هوایی (gr/plant)	وزن خشک ریشه (mg/plant)	وزن خشک اندام هوایی (mg/plant)	طول اندام هوایی (cm)	طول ریشه (cm)	سطح برگ (cm^{-2})
شاهد	۰/۹۹۵±۰/۰۷a	۲/۲٤±۰/۱۸ a	۱۰۷±۸a	۲٤۱ ±۱۱ a	۱۳/۵±۰/۷a	۱۹/٦٦±۱/۲ a	٦۲/۹۵±۰/۱۳a
Cu-25	۰/۸۹±۰/۰۳ b	۲/۰۱±۰/۱٤ b	۹٦±۲ b	۲۱٦ ±۹b	۱۱/۹±۰/۹ b	۱۳/۵٦±۰/٤۷ b	٤۷/۱٦±۰/۱۳b
Cu-50	۰/٦٤±۰/۰۳c	۱/۷۳±۰/۰٦ c	٦۸±۲ c	۸۳±۳c	۹±۰/٤٦bc	۱۲/۱٦±۰/٦ e	٤۰/۵۵±۰/۱۳c
Cu-100	۰/٤۲۹±۰/۰٤ d	۱/۰۱±۰/۰۷ d	٤٦±۳ d	۱۰۹±۳d	۸/۱۳±۰/٤٦c	۸/٤۳±۰/۳٤ c	۳٦/۱٤±۰/۱۳c
Cu-200	۰/۲۰٦±۰/۰۲ e	۰/۷۷±۰/۰٦۷ e	۲۲±٤ e	۸۳±٤e	۷/۷٦±۰/۳۷c	۷/٤۳±۰/۲۹ c	۲۷/۱۲±۰/۱۳d
Ni-25	۰/۹۲۲±۰/۰٤ b	۲/۰۳۵±۰/۰۸ b	۹۹±۲ b	۲۱۸±٤b	۱۱/۲±۰/۳۸b	۱۳/۸۳±۰/۹۷ b	۵۷/۷±۰/۱۳a
Ni-50	۰/۸٦۱±۰/۰٤ b	۱/۷۸±۰/۰۳۳ c	۹۲±۵ b	۱۹۱±۲c	۱۰/۱±۰/۳۸c	۱۱/۳٦±۰/۲۹ be	٤۹/۲٤±۰/۱۳b
Ni-100	۰/۵۰۲±۰/۰۳ c	۱/۱±۰/۰٦ d	۵٤±۳ f	۱۱۹±٤d	۸/۹±۰/۳c	۹/۳۳±۰/۲۳ c	٤۹/۲٤±۰/۱۳c
Ni-200	۰/۳۰۹±۰/۰۱ c	۰/۹۷۸±۰/۰۳ d	۳۳±۲ g	۱۰۵±۱d	۸/٤۸±۰/۲۹c	۷/٦٦±۰/۷۲ c	۳۵/٤۹±۰/۱۳ c

مقایسه‌ی میانگین داده‌ها با آزمون دانکن انجام گرفت حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار است.

است. کاهش میزان کلروفیل a در تمام تیمارهای مس و تیمارهای ۵۰، ۱۰۰و۲۰۰ میکرومولار نیکل در مقایسه با نمونه های شاهد به صورت معنی‌دار بود. همان‌طور که در شکل ۱ مشاهده می‌شود شدت کاهش در تیمار ۲۵ میکرومولار مس در مقایسه با نیکل بسیار بیشتر بود و در غلظت‌های دیگر میزان کاهش تقریبا برابر مشاهده شد. علاوه بر این مشاهده گردید که کاهش در میزان کلروفیل b (شکل ۱) با افزایش غلظت تیمارها به ویژه درتیمارهای مس به صورت خطی می باشد. کاهش در تمام تیمارهای ۲۵، ۵۰، ۱۰۰و ۲۰۰ میکرومولار مس و نیکل در مقایسه با نمونه‌های 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 درتیمارهای مس به صورت خطی می‌باشد. کاهش در تمام تیمارهای ۲۵، ۵۰، ۱۰۰و ۲۰۰ میکرومولار مس و نیکل در مقایسه با نمونه‌های شاهد به صورت معنی دار مشاهده شد. کاهش میزان کاروتنوئید در تمام تیمارهای مس و نیکل در مقایسه با نمونه های شاهد به صورت معنی‌دار بود. همان‌طور که در شکل ۱ نشان می‌دهد شدت کاهش در تیمار ۲۵ میکرومولار مس در مقایسه با نیکل بسیار بیشتراست، اما در غلظت‌های ۵۰ و ۱۰۰ میکرومولار میزان کاهش کاروتنوئید در نیکل بیشتر و در تیمار ۲۰۰ میکرومولار هر دو فلز سنگین تقریباً برابر می‌باشد.

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

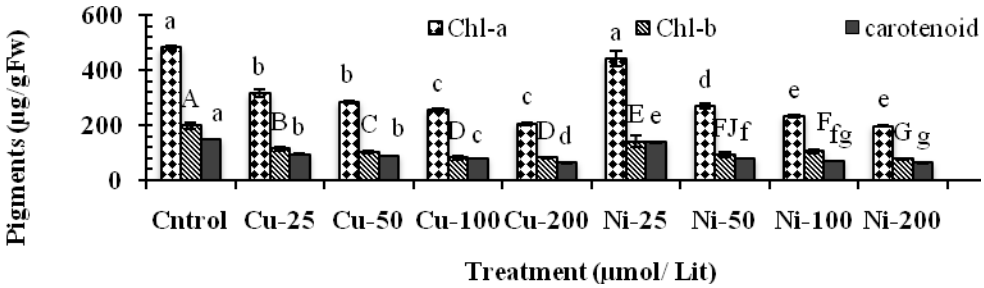
علاوه بر این بررسی نتایج حاصل از اندازه‌گیری میزان قند های محلول در ریشه گیاهان تیمار شده با مس و نیکل نشان داد که در تیمار های ۲۵، ۵۰، ۱۰۰و ۲۰۰ میکرومولار نیکل و تیمارهای ۵۰، ۱۰۰و ۲۰۰ مس در ریشه در سطح احتمال آماری ۵ درصد در مقایسه با نمونه‌های شاهد معنی داری بود. همانطور که شکل -۲ نشان می دهد در تیمارهای نیکل یک روند صعودی در میزان قندهای محلول ریشه تا غلظت۵۰ میکرومولار و در تیمارهای مس این روند صعودی تا غلظت ۱۰۰ میکرومولار وجود دارد. همانطور که از شکل ۲ پیداست میزان افزایش قند های محلول در ریشه گیاهان تیمار شده با مس بیش از اندام هوایی آنها می‌باشد 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 غلظت‌های مختلف مس و نیکل و مقایسه آن با میزان MDA ریشه و اندام هوایی نمونه‌های شاهد نشان داد که اعمال تیمارهای ۵۰، ۱۰۰و 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 شده‌اند (شکل ۳). بیشترین میزان افزایشMDA در اندام هوایی و ریشه گیاهان تیمار شده در غلظت ۲۰۰ میکرو مولار هر دو عنصر مشاهده شد. همانطور که از شکل ۳ پیداست میزان افزایش MDA در اندام هوایی گیاهان تیمار شده با نیکل بیش از ریشه آنها می‌باشد اما در گیاهان تیمار شده با مس افزایش افزایش MDA در اندام هوایی تنها در غلظت ۲۰۰ میکرو مولار بیش از ریشه آنها است و در غلظت های ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میکرو مولار کمتر از ریشه آنها است.

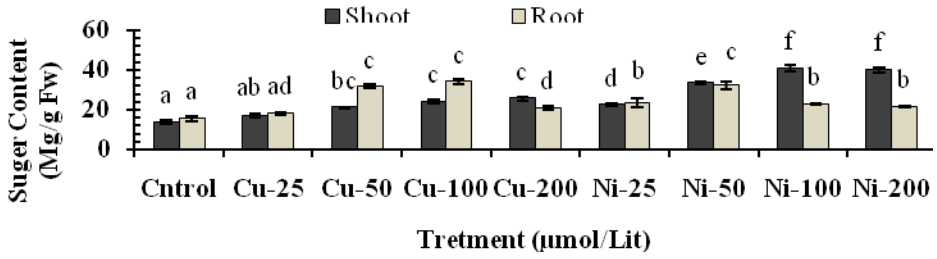
پراکسید هیدروژن (H_2O_2): بر اساس نتایج حاصله، میزان تولید H_2O_2 در گیاهان تحت تیمار مس و نیکل نسبت به گیاهان شاهد افزایش یافت (شکل ٤). این افزایش به ویژه در اندام هوایی گیاهان تیمار شده با غلظت های ۵۰ ، ۱۰۰ و ۲۰۰ میکرومولار مس و نیکل و همچنین در ریشه گیاهان تیمار شده با غلظت های ۱۰۰ و ۲۰۰ میکرومولار مس و نیکل در سطح احتمال آماری ۵ درصد نسبت به گیاهان شاهد معنی‌دار 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 ٤ نشان می‌دهد که

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-03-29]

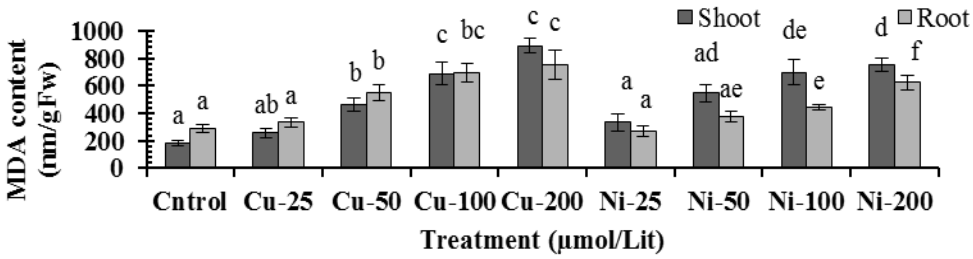
[DOR: 20.1001.1.23222727.1394.4.11.11.9]



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



شکل ۲- مقایسه‌ی میانگین ۳ تکرار± 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.



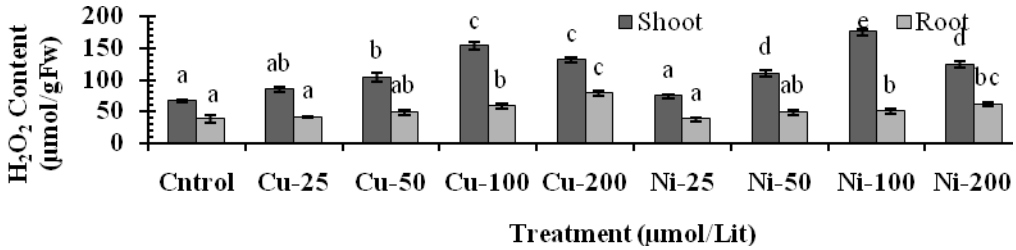
شکل ۳- مقایسه‌ی میانگین ۳ تکرار± SE میزان MDA در اندام هوایی و ریشه نمونه‌های شاهد و تیمارهای مختلف مس و نیکل. مقایسه ی میانگین داده‌ها با آزمون دانکن انجام گرفت. حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار است.

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

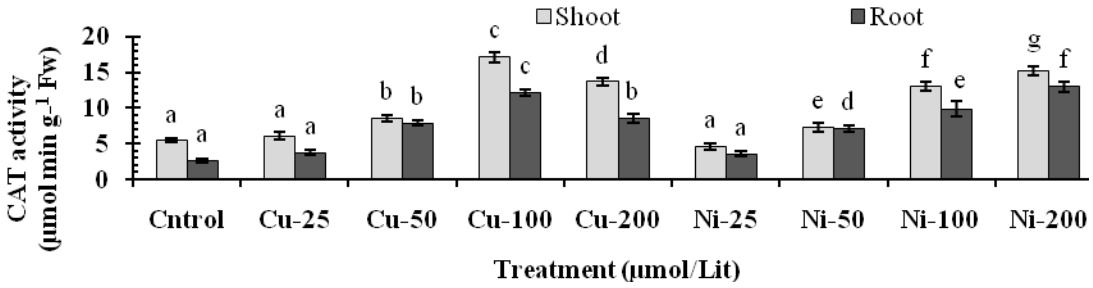
فعالیت آنزیم کاتالاز (CAT): نتایج حاصل از اندازه گیری فعالیت آنزیم CAT در اندام هوایی و ریشه گیاهان تیمار شده با غلظت‌های مختلف مس و نیکل و مقایسه آن با نمونه‌های شاهد در شکل ۵ نشان دهنده‌ی افزایش فعالیت این آنزیم تحت شرایط تنش می‌باشد. افزایش فعالیت CAT در اندام هوایی و ریشه گیاهان تیمار شده با غلظت‌های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

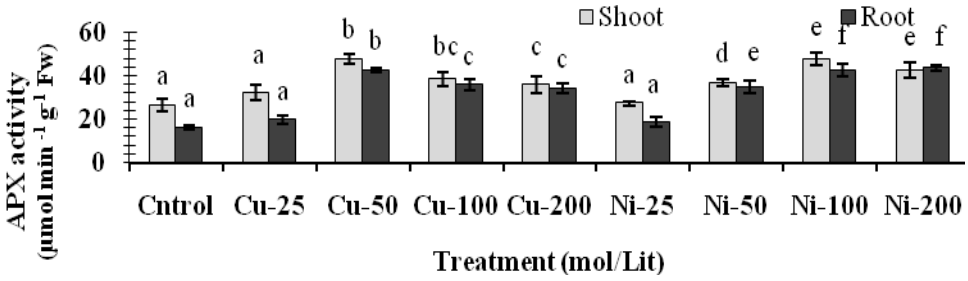
[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-03-29]
[DOR: 20.1001.1.23222727.1394.4.11.11.9]



شکل ٤- مقایسه‌ی میانگین ٣ تکرار± 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. حرف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار است.



شکل ٥- مقایسه‌ی میانگین ٣ تکرار± 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 ٦- مقایسه‌ی میانگین ٣ تکرار± 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.

اندازه گیری فعالیت آنزیم APX در اندام هوایی و ریشه گیاهان تیمار شده با غلظت های مختلف مس و نیکل و مقایسه آن با نمونه های شاهد نشان دهنده‌ی افزایش فعالیت این آنزیم تحت شرایط تنش می‌باشد (شکل ٦). افزایش میزان فعالیت APX در تیمارهای ١٠٠ و ٢٠٠ میکرومولار نیکل در اندام هوایی و غلظت های ٥٠ ، ١٠٠ و ٢٠٠ میکرومولار نیکل در ریشه در مقایسه با نمونه‌های شاهد و در سطح احتمال آماری ٥ درصد معنی‌داری بود. همچنین نتایج نشان می‌دهد که میزان فعالیت آنزیم APX در اندام هوایی و ریشه گیاهان تیمار شده با غلظت‌های ٥٠، ١٠٠ و٢٠٠ میکرومولار مس در مقایسه با نمونه‌های شاهد معنی‌دار است. همانطور که شکل ٥ نشان می دهد 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 اندازه گیری میزان رشد طولی ریشه و ساقه نشان داد که تنش فلزات سنگین مس و نیکل باعث کاهش معنی دار رشد طولی این اندام ها می شوند. مطالعات

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-03-29]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1394.4.11.11.9]

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 طویل 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 غلظت های بالا فلزات سنگین با مهار ساخت RNA های ریبوزمی در سلول‌های مریستمی 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 مقابسه آن با نمونه های 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 عناثر 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 کلرفیلa، 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 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 غیراحیا 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 گروهای 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).

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-03-29]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1394.4.11.11.9]

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 آندوژنی 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 ازآسکوربیک اسید به عنوان دهنده ی الکترون در اولین مرحله ی چرخه ی گلوتاتیون-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 آرابیدوپسیس مشاهده شد که افزایش H_2O_2 تحت شرایط تنش، تغییراتی را در انتقال الکترون پلاستوکینون ایجاد می کند واحتمالا این تغییر سبب القا APX_2 و دیگر دیگر خانواده ژنی *CAPX* می‌گردد (Shigeru *et al.,* 2002). آنزیم‌های CAT هموتترامریک هستند و باعث تجزیه H_2O_2 به آب و اکسیژن می‌شوند. CAT و SOD آنزیم‌های مهم پاداکسادیشی هستند 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 می توان 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 ROS های ناشی از تنش دانست. در این راستا می توان 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 آنزیم های 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 می-تواند 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

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-03-29]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1394.4.11.11.9]

دکتر نیر محمدخانی، فضه محمدی، سمیرا شوکت یاری و سمانه کارگر به خاطر همکاری و مساعدت در این تحقیق تشکر و قدردانی می‌گردد.

منابع:

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. Biochemcal Journal 219: 1-14.

Helmy L. H. (2010) The influence of nickel sulphate on some physiological aspects of two cultivars of *Raphanus Sativ*us 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 (*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 arnigera* 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 Thiyagarajan, 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.

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-03-29]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1394.4.11.11.9]

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 Cd^{2+} on the biosynthesis of chlorophyll in leaves of barley. Physiolgical 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., Vangronsveld, 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 C_3 and C_4 species by endogenous H_2O_2. 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 Dyryaganj, 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

[Downloaded from jispp.iut.ac.ir on 2024-03-29]

[DOR: 20.1001.1.23222727.1394.4.11.11.9]