

پاسخ های رشدی و فیزیولوژیکی گیاه ذرت (*Zea mays* L.) به مس و نیکل

- لطیفه پورا کبر، عضو هیات علمی دانشگاه ارومیه (نویسنده مسئول)
- نفیسه ابراهیم زاده، دانشجوی کارشناسی ارشد فیزیولوژی گیاهی عضو هیات علمی دانشگاه ارومیه

تاریخ دریافت: آذر ماه ۱۳۹۰ تاریخ پذیرش: مهر ماه ۱۳۹۱

تلفن تماس نویسنده مسئول: ۰۹۱۴۴۴۰۰۹۸۷

پست الکترونیک نویسنده مسئول: lpourakbar@yahoo.com

چکیده:

مس و نیکل از عناصر ریز مغذی در گیاهان هستند که در حفظ متابولیسم طبیعی و رشد گیاه دارای نقش اساسی می باشند، ولی مازاد آنها نیز بر بسیاری از عملکردهای فیزیولوژیکی اثر بازدارندگی دارد. در این مطالعه، گیاهان ذرت کشت شده در شرایط هیدروپونیک با سولفات مس (۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میکرومولار) و سولفات نیکل (۱۰۰، ۲۰۰ میکرومولار) تیمار شدند. تغییرات پارامترهای رشدی و بیوشیمیایی در ریشه ها و اندام هوایی گیاهان مورد مطالعه قرار گرفت. نتایج حاصل از مطالعات نشان داد که با افزایش غلظت مس و نیکل وزن خشک ریشه (۲۷ تا ۵۲ درصد) و اندام هوایی (۲۴ تا ۶۲ درصد)، طول اندام هوایی (۹ تا ۴۶ درصد) و ریشه ها (۱۴ تا ۳۷ درصد)، محتوای رنگیزه ای (کلروفیل a، ۱۴ تا ۶۷ درصد، کلروفیل b، ۳۲ تا ۷۹ درصد و کاروتنوئیدها، ۲۵ تا ۷۴ درصد)، احیاء دی کلروفنل ایندوفنل (۴۸ تا ۶۷ درصد) نسبت به شاهد کاهش یافت در صورتیکه درصد نشت یون پتاسیم (۵ تا ۳۰ برابر) و نشت قندهای محلول (۵ تا ۲ برابر)، مالون دی آلدئید (MDA) به عنوان شاخص پراکسیداسیون چربی (۵۴ تا ۱۹۰ درصد در اندام هوایی و ۴۸ تا ۱۵۲ درصد در ریشه ها)، مرگ سلولی (۵ برابر) و محتوای پرولین (۹ تا ۱۰۷ درصد در اندام هوایی و ۱۲ تا ۲۹ درصد در ریشه ها) نسبت به شاهد افزایش یافت. بیشترین تاثیر در فاکتورهای فوق در تیمار ۲۰۰ میکرو مولار نیکل + ۱۰۰ میکرو مولار مس مشاهده گردید. نتایج نشان داد که بر هم کنش توام مس و نیکل تاثیرات همبازی بر روی هم داشته و اثر همدیگر را تشدید کردند.

کلمات کلیدی: ذرت، سمیت مس و نیکل، واکنش هیل، نشت یون پتاسیم، مرگ سلولی، مالون دی آلدئید و محتوای پرولین.

Agronomy Journal (Pajouhesh & Sazandegi) No:103 pp: 147-159

Growth and physiological responses of *Zea mays* L. to Cu and Ni stress

- By: L. Poorakbar, (Corresponding Author; Tel: 09144400987), Scientific Staff of Urmia University
- N. Ebrahimzade, M.Sc. student of Urmia University

Received: December 2011

Accepted: October 2012

Copper and Nickel are an essential micronutrient for plants, playing an important role in maintaining plants' natural metabolism and growth, but in excess both heavy metal are also a proven inhibitor of various physiological functions. In this study maize (*Zea mays* L.) plants grown in hydroponic culture were treated with 0, 50 and 100 $\mu\text{m CuSO}_4$ and 0, 100 and 200 $\mu\text{m NiSO}_4$. Growth parameters and some biochemical changes were studied in roots and shoots of plants. The results showed that with increasing Cu and Ni concentration, root and shoot weight (27 to 52% in root and 24 to 62% in shoot), root and shoot length (14 to 59% in root and 9 to 46% in shoot), pigment contents (chlorophyll a 14 to 67%, chlorophyll b 32 to 79% and total carotenoids 25 to 74%), reduction of dichlorophenol indophenol (48 to 67%) were decreased in contrast to controls, while soluble sugars leakage (0/5 to 2 fold), K^+ leakage (0/25 to 30 fold) and malonaldehyde as indicator lipid of peroxidation (48 to 152% in root and 54 to 190% in shoot), cell death (5 fold) and prolin content (12 to 29% in root and 9 to 107% in shoot) were increased in contrast to controls. The result showed that the maximum effects in growth parameters and some biochemical changes were observed in 200 $\mu\text{m Ni} + 100 \mu\text{m Cu}$. However, interaction of Cu and Ni were cooperation effects on together and was more effective compared to the others treatments.

Key words: *Zea mays*, Cu and Ni toxicity, hill reaction, K^+ leakage, cell death, MDA, prolin content

مقدمه

محدوده وسیعی از ترکیبات آلی و غیرآلی که سبب آلودگی می شوند شامل فلزات سنگین، مواد قابل اشتعال و فساد پذیر، ضایعات خطرناک، تولید مواد منفجره و نفتی می باشند. جزء عمده ای از آلوده کننده های غیر آلی، فلزات سنگین هستند که مشکلات مختلفی را نسبت به آلوده کننده های آلی بوجود می آورند. میکروارگانیزم های خاک می توانند آلوده کننده های آلی را کاهش دهند در صورتی که فلزات سنگین به دلیل عدم تحرکشان نیاز به جابجایی فیزیکی دارند. گیاهان به روشهای مختلف فیزیکی و شیمیایی تحت تاثیر فلزات سنگین قرار می گیرند (۴).

عده ای از فلزات سنگین مانند روی (Zn)، کادمیوم (Cd) و مس (Cu) که در غلظت های بهینه برای رشد گیاه لازم هستند در غلظت های بالا می توانند مانع رشد و متابولیسم گردند (۳۸). مس و نیکل عناصر ضروری برای رشد گیاهان هستند. مس به عنوان جزئی از پروتئین ها و آنزیم های دخیل در انتقال الکترون و واکنش های احیایی بوده و در بسیاری از واکنش های بیولوژیکی مهم به عنوان یک کوفاکتور آنزیمی (سیتوکروم اکسیداز و آمین اکسیداز) و همچنین بعنوان یک ناقل الکترون در فسفریلاسیون اکسیداتیو و فتوسنتز شرکت می نماید (۴۳). غلظت های بالای مس در بافت های گیاهی می تواند به عنوان یک عنصر سمی در نظر گرفته شود که منجر به مهار رشد گیاهان می گردد (۲۵). غلظت های بالای مس می تواند بسیاری از تغییرات را در یاخته القاء نماید و موجب تغییر در نفوذ پذیری غشاء، ساختار کروماتین، فعالیت های آنزیمی فرایندهای تنفس و فتوسنتز و القاء

پیری گردد (۳۸).

مطالعات نشان داده است که کارایی فتوسنتز گیاهان مختلف با فلزات سنگین تحت تاثیر قرار می گیرد. مس مازاد مستقیماً انتقال الکترون فتوسنتزی و همچنین فعالیت های آنزیمی را در طول چرخه کالوین یا آسمیلاسیون خالص CO_2 مهار می کند. از طرف دیگر با کاهش محتوای رنگیزه های فتوسنتزی، آسیب رساندن به دستگاه فتوسنتزی و ساختار کلروپلاست، تغییر ترکیب پروتئین و لیپید غشای تیلاکوئید رشد و نمو گیاه را می تواند تحت تاثیر قرار دهد (۲۲).

نیکل نیز یکی از سمی ترین فلزات سنگین حاضر در فاضلاب ها به علت صنعت هایی از قبیل آب کاری فلز، رنگ سازی، مینا کاری چینی و... می باشد (۳۴). نیکل می تواند مشکلات سلامتی جدی از قبیل حساسیت های آلرژیکی (۴۴)، بیماریهای پوستی (۶) و آسیب های سیستم عصبی و ریوی را به دنبال داشته باشد (۱۷). نیکل به عنوان یک عنصر ضروری برای بسیاری از سیستم های زنده در نظر گرفته می شود و برای فعالیت های متابولیکی گیاه لازم می باشد (۷) اما غلظت های بالای این عنصر برای گیاه سمی بوده و ممکن است با بسیاری از فرایندهای بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی گیاهان مداخله نماید (۷ و ۳۵). مطالعات نشان داده است که نیکل مازاد می تواند جوانه زنی دانه و رشد گیاه را مهار نموده، موجب تخریب کلروفیل گردیده و با فعالیت سیستم نوری مداخله نماید (۲ و ۳). غلظت زیاد نیکل در سلول های آندودرم و پری سیکل، تقسیم سلولی را در پری سیکل مهار می کند و در نتیجه از ایجاد ریشه های فرعی ممانعت

۱۵ روز طول ریشه ها و ساقه ها، وزن خشک ریشه و اندام هوایی گیاهان ذرت بطور جداگانه اندازه گیری شد. برای این کار گیاهان ۳۳ روزه ذرت جهت انجام آزمایش ها برداشت گردیدند. بعد از اندازه گیری طول ریشه و ساقه با یک خط کش تمیز، برای خشک کردن نمونه ها جهت تعیین وزن خشک و برخی آزمایشات که نیاز به وزن خشک نمونه ها داشت، ریشه ها و ساقه ها در پاکت های مجزا قرار داده شدند و در آون ۸۰ درجه سانتیگراد به مدت ۴۸ ساعت قرار گرفتند. وزن خشک با ترازویی با حساسیت ۰/۰۰۱ گرم اندازه گرفته شد.

اندازه گیری میزان پراکسیداسیون چربی ها

برای اندازه گیری میزان پراکسیداسیون چربی ها از روش Heath and Packer (۱۹) استفاده گردید. ۱ گرم بافت تر توزین و توسط ml 5/2 محلول تری کلرواستیک اسید ۱۰٪ خوب له گردید. بعد از ۲۰ دقیقه سانتریفوژ با سرعت rpm 15000، حجم مساوی از عصاره رویی و تیوباربیوتیک اسید ۰/۵٪ در تری کلرو استیک اسید ۲۰٪ به داخل لوله آزمایش منتقل شده و به مدت ۳۰ دقیقه در داخل انکوباتور 96°C قرار داده شد. در نهایت لوله ها را به مدت ۵ دقیقه وارد آب یخ نموده و بعد به مدت ۵ دقیقه در داخل سانتریفوژ با سرعت rpm 10000 گذاشته شد. جذب محلول حاصل توسط دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج های 532 nm و 600 nm اندازه گیری گردید. برای محاسبه غلظت از ضریب خاموشی استفاده شد ($\text{cm}^{-1} \text{mM}^{-1}$ = 155 ضریب خاموشی) (۱۸).

اندازه گیری میزان K⁺ نشت یافته به محیط کشت:

برای انجام این آزمایش دانه رسته های ۳ روزه ذرت به مدت ۲۴ ساعت تحت تیمار 20 mM KCl 10 ml، قرار گرفتند و سپس دانه رسته ها با آب مقطر شسته شده و با غلظت های مختلف مس تیمار شدند. پس از ۴۸ ساعت نمونه ها برداشت شده و میران برون تراوش پتاسیم در محلول باقیمانده کلیه گیاهان توسط دستگاه فلم فتومتر (Flam photometer) اندازه گیری شد و با استفاده از منحنی استاندارد پتاسیم، میزان پتاسیم نشت یافته به محیط کشت بر حسب ppm محاسبه گردید (۱).

اندازه گیری قندهای نشت یافته به محیط کشت

برای انجام این آزمایش دانه رسته های ۳ روزه ذرت به داخل پتری دیش های محتوی غلظت های مختلف مس منتقل گردید و بعد پتری دیش ها در داخل اتکوباتور 25°C به مدت ۱۲۰ ساعت قرار گرفتند سپس کاغذ صافی به همراه دانه رست ها از داخل پتریها خارج نموده و از محلول باقی مانده 2 ml به داخل لوله های آزمایش منتقل شدند بر روی هر یک از لوله ها 1 ml فنل ۵٪ اضافه شده سپس 3 ml اسید سولفوریک ۹۸٪ با فشار بر روی آنها اضافه گردید. لوله ها به مدت یک ساعت به حال خود رها شدند بعد از یک ساعت و ظهور رنگ قرمز فورفورال جذب توسط دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۴۸۵ نانومتر اندازه گیری شد (۱).

اندازه گیری پرولین

برای اندازه گیری پرولین از روش Bates et al. (۵) استفاده شد. مقدار ۵۰ میلی گرم ماده خشک گیاهی در لوله های آزمایش حاوی ۱۰ میلی لیتر اسید سولفوسالسیلیک ۳٪ قرار گرفت. بعد از ۷۲ ساعت نمونه ها توسط کاغذ صافی صاف شدند نمونه های صاف شده برای اندازه گیری پرولین مورد استفاده قرار گرفتند. ۲ میلی لیتر از هر نمونه صاف شده در هر لوله آزمایش ریخته شد و بر روی آن ۲ میلی لیتر اسید استیک گلاسیال و ۲

می نماید (۳۵). در سطح سلولی نیکل و مس تولید گونه های اکسیژن دوباره فعال شده (ROS)) را القاء می کند و ROSها موجب آسیب های اکسیداتیو به لیپیدها، پروتئین ها و اسیدهای نوکلئیک در یاخته ها می گردند (۱۴ و ۳۹). تیمار گیاه ذرت با نیکل ۱۰۰ موجب افزایش قابل توجه غلظت H_2O_2 درونزا و فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدانی در این گیاه می گردد (۱۱). معمول ترین علائم سمیت نیکل و مس مهار جوانه زنی، کلروزیس و نکروزیس، افزایش نشت یونی، کاهش نمو ریشه و کاهش رشد گیاه است (۳۵). آلودگی فلزات سنگین یک مشکل بزرگ با خطرات محیطی جدی می باشد. با توجه به افزایش روزافزون صنعتی شدن، استفاده از کودهای شیمیایی و آفت کش ها به عنوان منابع مهم آلودگی های چند گانه فلزات سنگین، فهم چگونگی اثر یونهای مس و نیکل به عنوان یون های دو ظرفیتی، بر رشد، فرایندهای فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی در گیاهان ممکن است در حل مشکلات ناشی از آلودگی چند گانه فلزات سنگین بالاخص مس و نیکل موثر باشد (۱۵). بنابراین یکی از اهداف این تحقیق بررسی تغییرات فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی، به ویژه محتوای کلروفیل در برگها، میزان مالون دی آلدئید به عنوان شاخص پراکسیداسیون لیپیدهای غشایی، نشت یون های الکتروولت به عنوان شاخص آسیب غشاء در طی تنش، مرگ سلولی و واکنش هیل در پاسخ به تیمار توام مس و نیکل است که احتمال دارد در مسیر متابولیکی موثر باشد و هم چنین شناسایی بعضی از مکانیسم های دخیل در کاهش رشد گیاه و تغییرات توسعه ای در برگ ها و ریشه های گیاه ذرت (*Zea mays* L) به عنوان یک محصول مهم زراعی، از اهداف دیگر این کار تحقیقی بود.

مواد و روش ها

بذرهای ذرت (*Zea mays* L.) بعد از تهیه از مرکز تحقیقات کشاورزی، قبل از کشت به مدت ۱۰ دقیقه با محلول ۰/۱٪ HgCl_2 ضدعفونی و بعد به وسیله آب مقطر کاملاً شستشو داده شدند. ظروف پتری دیش به قطر ۹ سانتی متر قبل از اقدام به کشت به مدت دو ساعت در آون در دمای ۱۰۰ درجه سانتیگراد قرار گرفت. پس از سرد شدن پتری دیش ها، در هر یک از آنها دو ورق کاغذ صافی گذاشته سپس با استفاده از یک پنس استریل ده عدد بذر که ۱۲ ساعت قبل از کشت در داخل آب مقطر قرار گرفته و دوره آماس را طی کرده بودند، در داخل آنها کشت و سپس کلیه پتری دیش ها در داخل اتکوباتور در ۲۵ درجه سانتیگراد به مدت سه روز قرار داده شدند. دانه رست ها به مدت ۱۵ روز در اتاق کشت با دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی، شدت نوری $1 \mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$ (۱۰۰۰ لوکس)، دمای شبانه روزی ۲۲/۲۷ درجه سانتی گراد و رطوبت ۸۵٪ در داخل گلدان های حاوی ماسه قرار گرفتند. در طی این دوره گیاهان صرفاً با محلول هوگلند بدون اعمال نیکل و مس تغذیه شدند. بعد از گذشت ۱۵ روز گیاهان با غلظت های مختلف فلزات نیکل و مس تیمار شدند. گیاهان به هنگام اعمال تیمار بصورت یک روز در میان با آب مقطر و محلول هوگلند حاوی غلظت های مختلف نیکل (۰، ۱۰۰، ۲۰۰ میکرومولار)، مس (۰، ۵۰، ۱۰۰ میکرومولار) و غلظت های مختلف نیکل به همراه مس (۲۰۰ میکرومولار Ni و ۱۰۰ میکرومولار Cu) و (۱۰۰ میکرومولار Ni و ۵۰ میکرومولار Cu) تغذیه شدند. برای تهیه غلظت های مختلف مس، از سولفات مس $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ و برای تهیه غلظت های مختلف نیکل از سولفات نیکل $\text{NiSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ استفاده گردید. پس از گذشت

افتاده گردید. عصاره حاصل به مدت ۱۵ دقیقه در داخل بن ماری $C50^{\circ}$ قرار گرفته و سپس به مدت ۱۵ دقیقه با نیروی 14000 g سانتیفریژ گردید. جذب توسط دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج nm600 اندازه گیری شد و در نهایت میزان مرگ سلولی بر حسب درصد نسبت به شاهد تعیین گردید.

آنالیز آماری

برای آنالیز داده ها و رسم نمودارها از برنامه های رایانه ای SPSS و Excel استفاده گردید. در کلیه نمودارها بارهای عمودی نشان دهنده SE برای سه تکرار می باشد. مقایسه میانگین ها با استفاده از آزمون ANOVA در سطح ۵ درصد، در صورت معنی دار بودن اثر عوامل آزمایشی انجام شد.

نتایج

مطالعه علائم ظاهری در گیاهان ذرت شاهد و تحت تیمار غلظتهای مختلف مس و نیکل، نشان داد که افزایش غلظتهای این دو عنصر در گیاهان ذرت موجب بروز کلروز برگ می شد که این کلروز به صورت رنگ سبز متمایل به زرد در برگها ظاهر گردید. با افزایش غلظت این عناصر نوک برگها وحاشیه برگها بصورت نکروزه شده درآمدند (نشان داده نشده است).

نتایج حاصل از اثر نیکل و مس بر روی وزن خشک اندام هوایی و ریشه در نمودار شماره ۱ (الف) نشان داده شده است. نتایج بیانگر وجود یک رابطه معکوس ما بین افزایش غلظت های نیکل و مس با وزن خشک ریشه ها و اندام هوایی بود. میزان کاهش وزن خشک ریشه ۲۷ تا ۵۲ درصد و میزان کاهش وزن خشک اندام هوایی ۲۴ تا ۶۲ درصد نسبت به شاهد به ترتیب در تیمارهای مس ۱۰۰ میکرو مولار و ۲۰۰ میکرو مولار $Ni + 100$ میکرو مولار Cu مشاهده گردید. کاهش وزن خشک در هر دو اندام طبق جدول شماره ۱ در سطح ۰/۰۵ معنی دار بود. نتایج حاصل از اثر نیکل و مس بر طول ریشه و اندام هوایی در گیاهان در نمودار شماره ۱ (ب) آورده شده است. بررسی این نتایج در گیاهان تیمار شده نشانگر آن است که با افزایش غلظت مس و نیکل طول ریشه و اندام هوایی کاهش معنی دار یافت (جدول شماره ۱) و مقایسه سمیت این دو فلز سنگین نشان داد که اثر سمیت فلز نیکل بر روی طول ریشه گیاه ذرت نسبت به مس بیشتر بوده و بیشترین اثر سمیت در تیمار نیکل ۲۰۰ میکرو مولار مشاهده گردید. بررسی اثر توام این دو فلز بر طول ریشه و اندام هوایی نشان داد که بر همکنش این فلزات نسبت به مس اثر بیشتری بر روی طول ریشه داشته ولی نسبت به بکارگیری نیکل به تنهایی فقط در نیکل ۲۰۰ میکرو مولار به همراه مس ۱۰۰ میکرو مولار اثر تعدیل بر طول ریشه داشت. بررسی طول اندام هوایی نشان داد اعمال توام مس و نیکل اثر همیاری بر کاهش طول اندام هوایی داشته و بیشترین کاهش در تیمار ۲۰۰ میکرو مولار Ni و ۱۰۰ میکرو مولار Cu (۴۶٪ نسبت به شاهد) مشاهده شد. نتایج حاصل از بررسی میزان کلروفیل a و b در برگ گیاهان شاهد و تحت تیمار مس و نیکل در نمودار شماره ۱ (ج) نشان داده شده است. طبق این نتایج با افزایش غلظت های مس و نیکل میزان کلروفیل a و b در کلیه گیاهان تحت تیمار کاهش نشان داد. میزان کاهش کلروفیل a 14 تا ۶۷ درصد و میزان کاهش کلروفیل b 32 تا ۷۹ درصد نسبت به شاهد به ترتیب در تیمار مس ۵۰ میکرو مولار و تیمار ۲۰۰ میکرو مولار Ni + ۱۰۰ میکرو مولار Cu مشاهده گردید. کاهش میزان رنگیزه های کلروفیل طبق جدول شماره ۱ در سطح ۰/۰۵ معنی دار بود. نتایج حاصل از بررسی میزان کاروتنوئید کل در برگ گیاهان شاهد

میلی لیتر معرف نین هیدرین (حاوی 20 ml اسید فسفریک M6، ml30 اسید استیک گلاسیال و ۱/۲۵ گرم نین هیدرین) اضافه شد. محتوای لوله های آزمایش به مدت یک ساعت در بن ماری در حال جوش حرارت داده شد سپس لوله ها در ظرف محتوی یخ سرد شدند و بعد از آن در هر لوله آزمایش ۴ میلی لیتر تولوئن ریخته، بعد از هم زدن دو فاز تشکیل گردید از فاز بالایی که حاوی کمپلکس رنگی (قرمز) بود جهت اندازه گیری پرولین استفاده شد. میزان جذب در طول موج nm 520 بوسیله اسپکتروفتومتر اندازه گیری شد. میزان پرولین با استفاده از منحنی استاندارد پرولین و بر حسب $g/g \text{FDI}$ محاسبه گردید.

اندازه گیری میزان رنگیزه ها

برای اندازه گیری میزان رنگیزه ها از روش Dere et al (۸) استفاده شد. ۱ گرم از بافت تر برگ ها توزین شده و با 50 ml استون ۱۰۰٪ له گردیده و با تنزیب صاف گردید و عصاره حاصل به مدت ۱۰ دقیقه در داخل سانتیفریژ با دور rpm 2500 گذاشته شد و سپس برای تعیین میزان کلروفیل a (Chl) و b جذب آن توسط دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج nm 662 و 645 nm، برای تعیین کاروتنوئید کل (C_{x+c}) جذب آن در طول موج nm 470 اندازه گیری گردید. برای محاسبه مقادیر کلروفیل a و b و همچنین کاروتنوئید کل از فرمول Lichtenaler & Wellburn (۲۷) استفاده گردید.

$$Chl_a = 11.75 A_{662} - 2.350 A_{645}$$

$$Chl_b = 18.61 A_{645} - 3.960 A_{662}$$

$$C_{x+c} = 1000 A_{470} - 2.270 Chl_a - 81.4 Chl_b / 227$$

اندازه گیری واکنش هیل

برای اندازه گیری واکنش هیل از روش Patsikka et al (۳۵) استفاده گردید. ۱ گرم از بافت تر برگ توزین گردید و با 3 ml بافر فسفات که pH آن برابر ۷ بود و در حد انجماد سرد گردیده بود له گردید. عصاره صاف شده را به مدت ۲ دقیقه با سرعت rpm 10000 سانتیفریژ نموده و محلول رویی دور ریخته شد. روی رسوب باقیمانده 3 ml بافر فسفات سرد اضافه نموده و با قلم مو رسوب در محلول به حالت تعلیق در آمد. برای انجام واکنش هیل ۰/۵ میلی لیتر از محلول فوق برداشته و روی آن ۲ میلی لیتر محلول بافر فسفات و ۰/۲ میلی لیتر محلول رنگی دی کلرو فنل ایندو فنل (DCPIP) افزوده شد و بلافاصله جذب آن توسط دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۵۰ نانومتر اندازه گرفته شد و سپس لوله را از دستگاه خارج نموده و به مدت ۲۰ ثانیه در مقابل لامپ ۱۵۰ واتی قرار داده شد و دوباره جذب اندازه گیری شد. این عمل به مدت ۵ دقیقه تکرار گردید. میزان احیاء DCPIP بر حسب درصد شاهد محاسبه گردید.

مرگ سلولی

مرگ سلولی به عنوان معیاری برای نشان دادن آسیب وارد شده به غشاء سلولی در گیاهان تیمار شده با مس، با استفاده از جذب معرف آبی اوانس (Evans blue) اندازه گیری گردید (۴). بعد از تیمار با مس و نیکل، سه قطعه ۱ سانتی متری از نوک ریشه ها در داخل معرف آبی اوانس ۰/۲۵٪ در آب (w/v) به مدت ۳۰ دقیقه قرار داده شدند و بعد به مدت ۱۵ دقیقه با آب شستشو داده شدند و سپس در 1 ml محلول متانول ۵۰٪ (v/v) و (w/v) 1٪ SDS له گردیدند که این عمل موجب آزاد شدن معرف به تله

معنی داری نسبت به گیاهان شاهد یافت (جدول شماره ۲). طبق نتایج حاصله کمترین افزایش نسبت به شاهد در میزان MDA اندام هوایی در تیمار مس ۵۰ میکرو مولار (۵۴٪) و در ریشه ها در تیمار مس ۱۰۰ میکرو مولار (۴۸٪) و بیشترین اثر سمیت در هر دو اندام در تیمار ۲۰۰ میکرو مولار Ni توام با ۱۰۰ میکرو مولار Cu مشاهده گردید، در این تیمار میزان افزایش MDA نسبت به شاهد در اندام هوایی ۱۹۰٪ و در ریشه ها ۱۵۲٪ بود. نتایج حاصل از بررسی واکنش هیل در نمودار شماره ۳ (الف) آورده شده است. طبق این نتایج واکنش هیل با افزایش غلظت مس و نیکل در گیاه ذرت کاهش می یابد که میزان کاهش در گیاهان تحت تیمار نسبت به شاهد طبق جدول شماره ۲ معنی دار بود. بین تیمارهای نیکل ۱۰۰ میکرومولار و مس ۵۰ میکرومولار و همچنین بین تیمارهای (نیکل ۲۰۰ میکرو مولار توام با مس ۱۰۰ میکرو مولار) و (نیکل ۱۰۰ میکرو مولار توام با مس ۵۰ میکرومولار) تفاوت معنی داری مشاهده نگردید. حداکثر میزان کاهش نسبت به شاهد در واکنش هیل در تیمارهای فوق ۶۷٪ و حداقل (۴۸٪) در تیمار نیکل ۱۰۰ میکرو مولار بود.

نتایج حاصل از بررسی محتوای پرولین در گیاهان تحت تیمار با مس و نیکل در نمودار ۳ (ب) آورده شده است. نتایج نشانگر آن است که با تیمار مس و نیکل محتوای پرولین در اندام هوایی ذرت به غیر از تیمار ۵۰ میکرو مولار مس و ریشه افزایش معنی دار یافت. در اندام هوایی بیشترین افزایش نسبت به شاهد در تیمار نیکل ۲۰۰ میکرومولار (۱۰۷٪) مشاهده گردید. بیشترین محتوای پرولین در ریشه ها در تیمار نیکل ۲۰۰ میکرو مولار توام با مس ۱۰۰ میکرو مولار مشاهده شد که در این تیمار میزان پرولین نسبت به شاهد ۲۹٪ افزایش یافت. محتوای پرولین در اندام هوایی نسبت به ریشه ها بیشتر افزایش نشان داد. افزایش میزان پرولین در هر دو اندام در گیاهان تحت تیمار نسبت به شاهد طبق جدول شماره ۲ معنی دار بود.

و تحت تیمار مس و نیکل در نمودار شماره ۱ (د) نشان داده شده است. طبق این نتایج با افزایش غلظت های مس و نیکل میزان کاروتنوئید کل در کلیه گیاهان تحت تیمار در سطح ۰/۰۵ نسبت به شاهد کاهش معنی دار یافت (جدول شماره ۱). بین تیمارهای ۲۰۰ میکرو مولار Ni توام با ۱۰۰ میکرو مولار Cu) و (۱۰۰ میکرومولار Ni توام با ۵۰ میکرومولار Cu) تفاوت معنی داری وجود نداشت. کمترین کاهش (۲۵٪) در تیمار مس ۵۰ میکرو مولار و بیشترین کاهش نسبت به شاهد (۷۴٪) در تیمار توام ۲۰۰ میکرو مولار Ni + ۱۰۰ میکرو مولار Cu مشاهده شد. نتایج حاصل از بررسی میزان K⁺ نمودار ۲ (الف)، قندهای محلول نمودار ۲ (ب) نشت یافته به محیط کشت و مرگ سلولی نمودار ۲ (ج) به عنوان فاکتورهای نشان دهنده صدمه فلزات سنگین مس و نیکل بر غشاء سلولی نشان داده شده است. نتایج نشان دهنده آن بود که افزایش غلظت های مس و نیکل باعث افزایش معنی دار نشت K⁺، قند های محلول و مرگ سلولی در گیاهان تحت تیمار نسبت به شاهد شد (جدول شماره ۲). کمترین افزایش نسبت به شاهد در نشت یون پتاسیم (۰/۵ برابر) و مرگ سلولی (۰/۲۵ برابر) در تیمار نیکل ۱۰۰ میکرو مولار و در نشت قندهای محلول (۰/۵ برابر) در تیمار مس ۵۰ میکرو مولار و بیشترین افزایش نسبت به شاهد در تیمار ۲۰۰ میکرو مولار + ۱۰۰ میکرو مولار Cu مشاهده گردید، که در این تیمار میزان قندهای محلول نشت یافته به محیط کشت دو برابر، میزان نشت K⁺ ۳۰ برابر و میزان مرگ سلولی ۵ برابر نسبت به شاهد افزایش نشان داد که نشانه همپاری Cu و Ni بر روی فاکتورهای فوق می باشد میزان MDA به عنوان شاخص پراکسیداسیون چربی ها مورد بررسی قرار گرفت و نتایج حاصل از آن در نمودار شماره ۲ (د) نشان داده شده است. نتایج حاصل از آزمایشات نشانگر آن است که میزان MDA با افزایش میزان غلظت مس و نیکل در گیاهان تحت تیمار هم در اندام هوایی و هم در ریشه افزایش

جدول ۱- آنالیز واریانس وزن خشک ساقه و ریشه، طول ساقه و ریشه، کلروفیل a، کلروفیل b و کاروتنوئیدها.

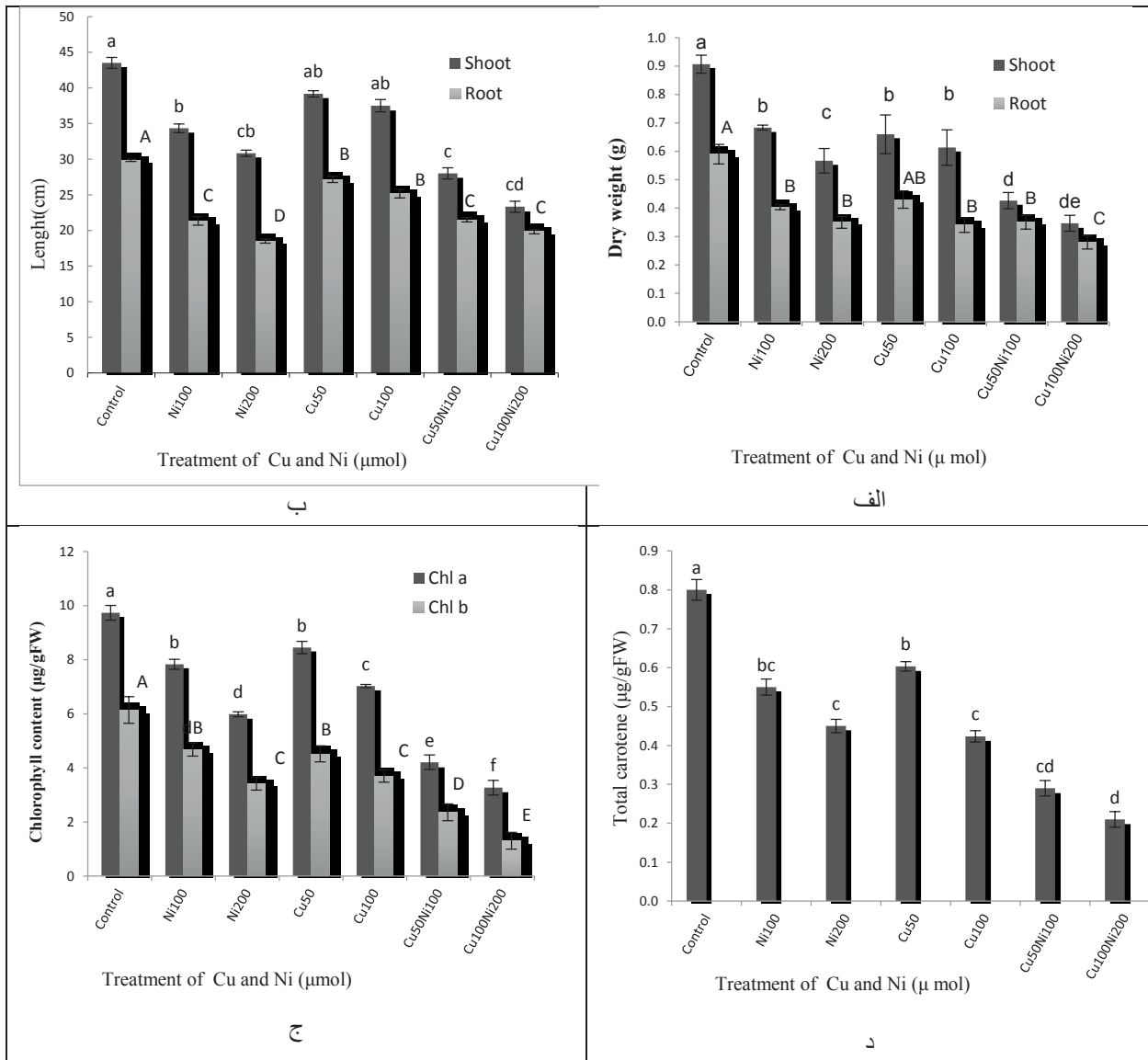
میانگین مربعات								
منابع تغییرات	درجه آزادی	وزن خشک ساقه	وزن خشک ریشه	طول ساقه	طول ریشه	کلروفیل a	کلروفیل b	کاروتنوئید کل
مس	2	122/0*	039/0*	4/113*	06/2**	97/31*	66/11*	203/0*
نیکل	2	16/0*	041/0*	59/422*	4/128*	8/28*	40/12*	23/0*
مس x نیکل	2	003/0**	011/0*	27/4**	55/5*	37/2*	28/0*	015/0*
اشتباه آزمایش	14	007/0	04/9	09/1	845/0	162/0	02/0	0003/0

* و ** به ترتیب معنی دار در سطح احتمال ۵ درصد و ۱ درصد.

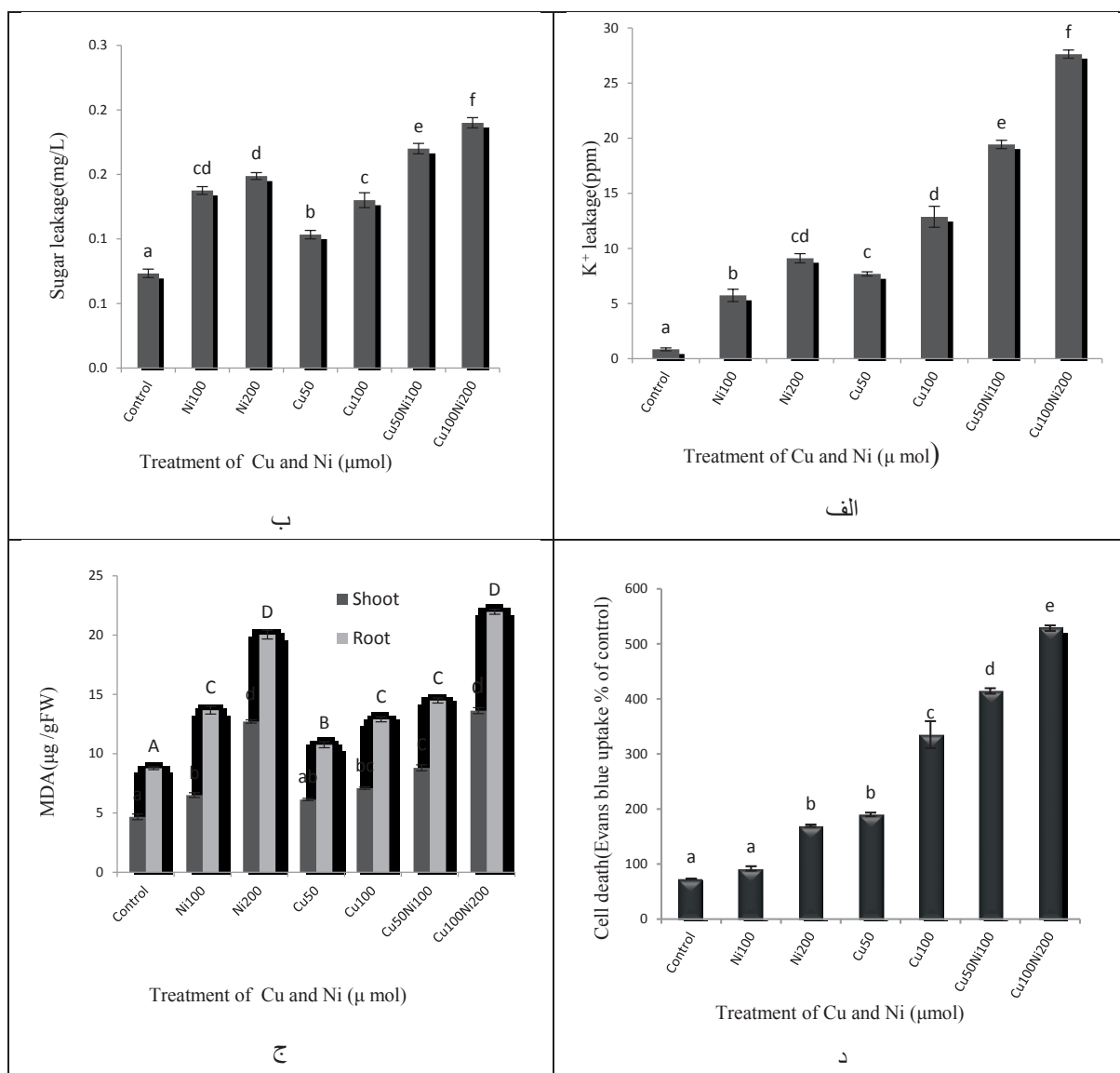
جدول ۲- آنالیز واریانس مرگ سلولی، نشت یون پتاسیم و قندهای محلول، MDA ساقه و ریشه، پرولین ساقه و ریشه و واکنش هیل.

میانگین مربعات									
منابع تغییرات	درجه آزادی	مرگ سلولی	نشت یون پتاسیم	نشت قندهای محلول	MDA ساقه	MDA ریشه	پرولین ساقه	پرولین ریشه	واکنش هیل
مس	2	03/216775*	178/550*	005/0*	10/8*	48/14*	34/34*	19/32*	43/2597*
نیکل	2	79/59157*	601/332*	011/0*	01/88*	78/178*	08/1188*	42/31*	6/1493*
مس x نیکل	2	38/17175*	516/68*	60/1*	46/1*	77/1*	53/31*	06/2**	51/1667*
اشتباه آزمایش	14	33/881	130/1	44/3	189/0	254/0	783/0	825/0	95/1

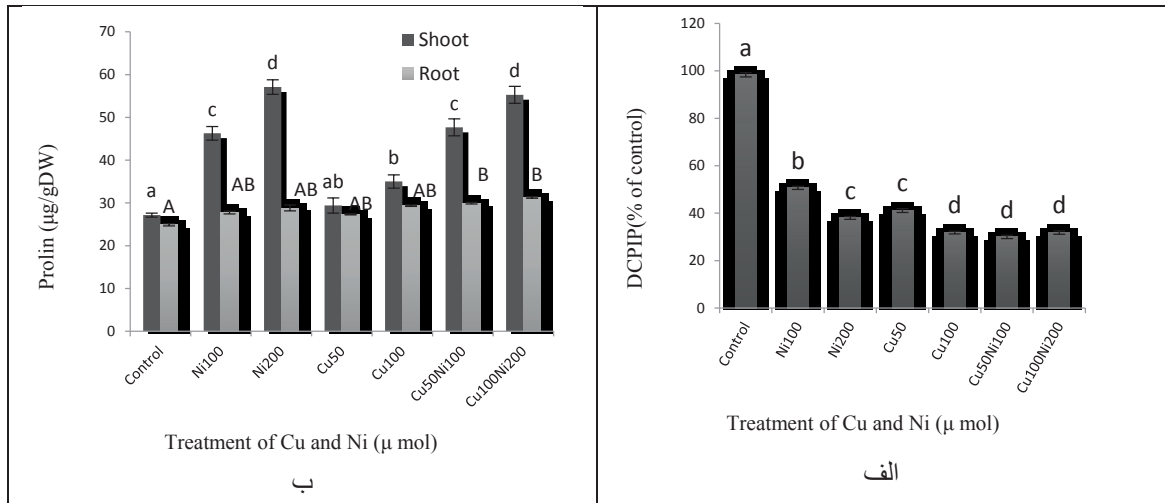
* و ** به ترتیب معنی دار در سطح احتمال ۵ درصد و ۱ درصد.



نمودار شماره ۱: نتایج اثر غلظت های مختلف مس و نیکل و تاثیرات توأم آنها بر وزن خشک (الف)، طول ریشه و اندام هوایی (ب)، محتوای رنگیزه ها کلروفیل a و b (ج) و کاروتنوئید کل (د) در گیاه ذرت. ستون ها نماینده میانگین سه تکرار و بارهای عمودی نشانگر انحراف استاندارد ($\pm SE$) بوده و میزان معنی دار تغییرات در گروه تجربی در مقایسه با شاهد بر اساس آزمون ANOVA در سطح ۰/۰۵ می باشد. در هر ستون میانگین های دارای حروف متفاوت دارای تفاوت معنی دار با هم هستند.



نمودار شماره ۲- نتایج اثر غلظت های مختلف مس و نیکل و تاثیرات توأم آنها بر نشت یون پتاسیم (الف)، نشت قندهای محلول (ب)، میزان مرگ سلولی (ج) و محتوای مالون دی آلدئید در اندام هوایی و ریشه (د) در گیاه ذرت. ستون ها نماینده میانگین سه تکرار و بارهای عمودی نشانگر انحراف استاندارد ($\pm SE$) بوده و میزان معنی دار تغییرات در گروه تجربی در مقایسه با شاهد بر اساس آزمون ANOVA در سطح ۰/۰۵ می باشد. در هر ستون میانگین های دارای حروف متفاوت دارای تفاوت معنی دار با هم هستند.



نمودار شماره ۳- نتایج اثر غلظت های مختلف مس و نیکل و تاثیرات توأم آنها بر میزان واکنش هیل(الف) و محتوای پرولین(ب) در گیاه ذرت. ستون ها نماینده میانگین سه تکرار و بارهای عمودی نشانگر انحراف استاندارد (\pm SE) بوده و میزان معنی دار تغییرات در گروه تجربی در مقایسه با شاهد بر اساس آزمون ANOVA در سطح ۰/۰۵ می باشد. در هر ستون میانگین های دارای حروف متفاوت دارای تفاوت معنی دار با هم هستند.

مستقیم در معرض سمیت مس قرار دارد، اما سمیت مس در سایر قسمت های گیاه به طور غیر مستقیم می باشد. اثر کاهش بیوماس ریشه و رشد آن در اثر مسمومیت مس در گیاهان، در تحقیقات مشابه توسط Xu et al (۴۵) گزارش شده است. تاثیر نسبی مقادیر زیاد نیکل در گندم منجر به کاهش رشد اندام هوایی می گردد این احتمال داده می شود که فلزات سنگین رشد ریشه و ساقه را مستقیماً بوسیله مهار تقسیم سلولی یا تطویل سلولی یا بوسیله ترکیبی از هر دو مهار می نمایند (۴۲).

Ghasemi et al (۱۵)، در مطالعات خود بر روی گیاه *Alyssum inflatum* نشان داده اند که تیمار این گیاه با غلظت های مختلف مس در حضور و غیاب Ni موجب تجمع مس بیشتر در ریشه ها و اندام هوایی در حضور نیکل نسبت به عدم حضور آن در محیط کشت می گردد. این پیشنهاد می کند که نیکل جذب مس را در این گیاه تحریک نموده است. در این تحقیق اعمال توأم مس و نیکل بر روی گیاهان ذرت، موجب تشدید کاهش رشد در ذرت گردید که این نتایج با نتایج بدست آمده توسط Ghasemi et al (۱۵)، بر روی گیاه *Alyssum inflatum* و Monni et al (۳۰)، بر روی *Empetrumnigrum* هم خوانی نشان می دهد. با توجه به اینکه هر دوی این عناصر اثرات منفی بر روی تقسیم و تطویل سلولی دارند بنابراین تاثیرات توأم این دو عنصر باعث تشدید کاهش رشد شد.

در این تحقیق محتوای کلروفیل a، کلروفیل b و کاروتنوئید ها تحت تاثیر غلظت های سمی مس و نیکل کاهش نشان داد. مکانیسم تاثیر فلزات سنگین بر روی پیگمان های فتوسنتزی ممکن است به سه دلیل باشد: ۱- با ورود فلزات سنگین به داخل کلروپلاست ها و تجمع بالای آنها در این اندام ممکن است تنش های اکسیداتیو رخ دهد که موجب آسیب هایی از قبیل پراکسیداسیون کلروپلاست ها می شوند (۳۴). همچنین آنها می توانند بطور مستقیم ساختار و عملکرد کلروپلاست را

بحث

مطالعه علائم ظاهری در گیاه ذرت تحت تیمار غلظت های مختلف مس و نیکل نشان داد که غلظت های افزایش یافته این عناصر رشد گیاه را کاهش می دهند. با افزایش غلظت مس در گیاهان برگ ها علائم سمیت را بصورت زردی (کلروز) برگی و نکروزه شدن حاشیه برگی نشان دادند که با افزایش غلظت های مس بر شدت نکروزیس حاشیه برگ ها افزوده گردید. این نتایج با نتایج حاصل از کار Zhu & Alva (۴۷) هم خوانی نشان می دهد. احتمال داده می شود که ظهور کلروز برگی در اثر سمیت مس به دلیل اثر مس اضافی بر کاهش جذب آهن باشد (۲۶). نیکل یکی از فلزات سنگینی است که در صنعت های مدرن به عنوان فلز سمی و سرطان زا گروه بندی می شود. در این مطالعه غلظت های آزمایش شده نیکل باعث کاهش در وزن خشک، کاهش رشد اندام هوایی و کاهش رشد ریشه گردید. در تحقیقات بر روی گیاهان مختلف، علائم سمیت این عنصر که شامل کاهش جوانه زنی دانه، کاهش رشد ریشه، القاء کلروزیس برگی و کاهش بیومس می باشد، نیز مشاهده گردیده است (۷). همچنین کاهش مشابه در بیومس گندم و کلم نیز گزارش شده است (۴۶). احتمال داده می شود که کاهش در بیومس ناشی از تغییرات فرایندهای متابولیکی القاء شده توسط فلز نیکل (۴۰) و کاهش محتوای آب گیاه باشد (۴۱).

وزن خشک دانه رست های ذرت تحت تیمار با مس شدیداً کاهش یافت. در غلظت های بالای مس کاهش رشد ریشه نسبت به کاهش رشد ساقه بیشتر بود که نشان دهنده آن است که رشد ریشه به استرس مس حساس تر از رشد اندام هوایی می باشد. کاهش معنی دار در وزن خشک ریشه ناشی از اثر سمیت در این اندام است. بدلیل اینکه ریشه اولین اندامی است که در معرض سمیت قرار دارد و بیش از سایر اندام ها در معرض آسیب عوامل بیرونی قرار می گیرد در واقع می توان بیان نمود که ریشه به طور

تحمل استرسی گیاهان را از طریق عملکردهایی از قبیل تنظیم اسمزی، محافظت آنزیمی در مقابل دنا توره شدن و پایداری سنتز پروتئین افزایش می دهد. بعلاوه پرولین می تواند در شلات کردن فلزات در سیتوپلاسم نقش ایفا نماید (۲۵). پرولین آزاد اغلب بعنوان عامل تنظیم کننده ی اسمزی در نظر گرفته می شود و یک آمینو اسید با بیشترین قابلیت حل شدن در آب می باشد که ممکن است آبیگری سلول های گیاهی و بافت ها را بهبود بخشد و مانع از دست دادن آب برگ ها تحت شرایط تنش فلزات سنگین شود (۲۳).

واکنش هیل دربرگهای ذرت تحت تیمار مس و نیکل دراین مطالعه کاهش نشان داد. بارزترین اثر سمیت مس در فتوسیستم II جلوگیری از آزاد سازی اکسیژن است که با خاموش سازی فلوئورسانس متغییر همراه می باشد (۲۰). مشخص گردیده است که PSII نسبت به PSI نسبت به سمیت مس جایگاه حساستری می باشد. توانایی دهنده الکترون آگزوزن درنگهداری فعالیت PSII درحضور مس نشان دهنده آن است که آسیب ازجایگاه دهنده PSII آغاز می گردد (۳۲). درغیاب اهدای الکترون ازکمپلکس آزاد سازی اکسیژن، P680 به مدت طولانی تری به حالت اکسید باقی می ماند. به علاوه Jegerschod *et al* (۲۱) پیشنهاد نموده اند که ماده باند شونده به Cu^{2+} نزدیک Y_2 با سرعت بسیار پایینی دهنده الکترون اولیه اکسید شده P680 را احیا می کند.

سیستم شکافنده آب هدف اصلی سمیت نیکل است و مرکز واکنشهای PSII توسط نیکل مورد حمله قرار می گیرند و هدف های بعدی نیکل محل دهنده و گیرنده PSII و آنتن ها می باشد (۱۰). در دانه رست های ذرت تیمار شده با نیکل $200 \mu\text{g/g}$ بمدت ۱۳ روز فتوسنتز بطور قابل توجهی پایین تر از کنترل است و این با کاهش قابل توجه در فعالیت انتقال الکترون در مسیر DCPPIP (دی کلر فنل ایندوفنل) همراه است. این تغییرات تأثیرات مخرب نیکل را بر روی مرکز واکنشی PSII منعکس می نمایند و می تواند ناشی از تنش های اکسیداتیو لفاء شده توسط نیکل باشد که منجر به تغییر یا قطعه قطعه شدن پروتئین D1 در مرکز واکنشی PSII می گردد (۱۸). نتیجه گیری

در کل می توان بیان نمود که مس و نیکل تأثیرات منفی بر رشد گیاه ذرت داشته و محتوای رنگیزه ها و واکنش هیل در حضور مقادیر سمی این فلزات کاهش چشمگیری نشان می دهد که با کاهش رنگیزه ها و واکنش هیل که هر دو در امر فتوسنتز دارای نقش عمده ای می باشند میزان فتوسنتز کاهش یافته پس در نتیجه اعمال هر یک از فلزات ذکر شده و همچنین اعمال توام آن دو موجب کاهش رشد گیاه ذرت می شود. تشدید کاهش رشد در تیمار توام این دو فلز سنگین خود دلالت بر وجود اثر همبازی این دو عنصر در این گیاه می باشد. همچنین افزایش میزان MDA، نشت الکترولیت ها، افزایش مرگ سلولی و محتوای پرولین نیز در این گیاه در حضور سمیت توام این دو عنصر نسبت به حضور تک تک آنها نشان دهنده وجود تنش اکسیداتیو با اعمال فلزات سنگین مس و نیکل و اثر همبازی این دو فلز سنگین در گیاه ذرت می باشد.

با اتصال به گروههای سولفیدریل آنزیم ها از هم گسیخته و روی هم رفته بیوسنتز کلروفیل را تحت تأثیر قرار دهند (۳۷).

۲- فلزات سنگین جذب و انتقال سایر عناصر ضروری از قبیل Fe^{2+} ، Mn^{2+} و Zn^{2+} را بوسیله تأثیرات ضدیت مهار می نمایند و بنابراین از این طریق ظرفیت سنتز پیگمان ها در برگها تحت تأثیر قرار می گیرد (۱۴).

۳- مشخص شده است که فلزات سنگین در یکی از مراحل آنزیمی تأثیرات مهار کنندگی مستقیم دارند (۳۶). بعلاوه مس مازاد کلروزیس برگی را لفاء می نماید که بعلت شکسته شدن پراکسیداتیو رنگیزه ها و لیپید های غشاء و کاهش در محتوای رنگیزه ها می باشد (۲۸).

کاهش محتوای کلروفیل a و کلروفیل b میتواند در نتیجه کمبود Mg و Fe در گیاهان در زیادی نیکل (۳۳)، افزایش تولیدات ROS ایجاد شده توسط نیکل و یا تحریک فعالیت کلروفیلاز بوسیله این فلز باشد (۱۸). همچنین کاهش محتوای کلروفیل ممکن است ناشی از تخریب کلروفیل و مهار سنتز کلروفیل بعلت مهار لفاء کنندگی مس بر روی ALA دهیدراتاز (Aminolaevulinic acid dehydratase) باشد (۱۳).

در بررسی اثرات فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی مس و نیکل بر دانه رست های ذرت اثرات این دو عنصر بر پایداری غشای سلول های ریشه با اندازه گیری میزان MDA و برون تراوش K^+ بررسی گردید. پتاسیم یک کاتیون تک ظرفیتی بوده و یک عنصر پر مصرف ضروری و مهم است که در داخل سیتوپلاسم و واکوئل تجمع می یابد (۱۶). در این مطالعه غلظت های بالای نیکل منجر به افزایش پراکسیداسیون لیپیدی در دانه رست های ذرت گردید. MDA یکی از محصولات پراکسیداسیون لیپیدی است که به عنوان شاخص آسیب های اکسیداتیو در نظر گرفته می شود (۲۹). پراکسیداسیون لیپیدها تأثیرات مخرب بر روی غشاء یاخته و فراساختار غشاء دارد (۴۳). گونه های اکسیژن فعال می توانند با اسید های چرب غیر اشباع واکنش دهند که باعث پراکسیداسیون لیپیدهای ضروری در غشاء یاخته و اندامک ها می گردند. پراکسیداسیون لیپیدی با استرس های اکسیداتیو مرتبط بوده و شامل شکسته شدن تمامیت غشاهای بیولوژیکی، عملکردی و ساختاری می باشد که باعث افزایش در نفوذپذیری غشای پلاسمایی می شود که نشت یون K^+ و سایر محلول ها مثل قندهای محلول را در پی داشته و نهایتاً منجر به مرگ سلولی می گردد. در مطالعه حاضر محتوای مالون دی آلدئید در دانه رست های ذرت بطور قابل توجهی در تیمار با مس و نیکل افزایش نشان داد. نتایج مشابهی توسط Eriyamremu *et al* (۱۲) در گیاه ذرت در تیمار با نیکل گزارش شده است. افزایش در محتوای MDA نشانگر آن است که این فلزات موجب تنش های اکسیداتیو شدید با تحریک تولید ROS می شوند (۹). از آنجاییکه مس و نیکل هر دو باعث افزایش نشت K^+ و کاهش محتوای آن در داخل سلول می شوند و از طرف دیگر، نیکل فعالیت شلات ردوکتاز II Cu سطح ریشه را نیز تحریک کرده و باعث افزایش جذب مس می شود بنابراین این عمل منجر به افزایش مس داخل سلولی و افزایش اثرات سمیت این دو عنصر بر روی میزان نشت K^+ و محتوای MDA در این مطالعه گردیده است.

محتوای پرولین در اندام هوایی و ریشه گیاهان ذرت با افزایش غلظت های مس و نیکل افزایش می یابد این نتایج با نتایج سایر پژوهشگران بر روی گیاهان دیگر هم سویی نشان می دهد (۲۴). پرولین در تیمار فلزات سنگین در گیاه تجمع می یابد و در تحمل به تنش ها نقش دارد. پرولین

physiological, and structural effects of excess copper in plants. Botany. Rev. 57: 246–273.

14. Gardea-Torresdey, J. L., Peralta-Videa, J. R., Montes, M., Rose, G. D. and Corral-Diaz, B. 2004. Bioaccumulation of cadmium, chromium and copper by (*Convolvulus arvensis* L.): Impact on plant growth and uptake of nutritional elements. Bioresource Technology. 92: 229-235.
 15. Ghasemi, R., Ghaderian, M. and Kramer, U. 2009. Interference of nickel with copper and iron homeostasis contributes to metal toxicity symptoms in the nickel hyper accumulator plant *Alyssum inflatum*. New Physiologist. 184: 566-580.
 16. Gierth, M., Stelzer, R. and Lehmann, H. 1998. An analytical micro scopical study on the role of the exodermis in apoplastic Rb^+/K^+ transport in barley root. Plant Soil. 207: 209-218.
 17. Haber, L. T., Diamond, G. L., Zhao, Q., Erdreich, L. and Dourson, M.L. 2000. Hazard identification and dose response of ingested nickel-soluble salts. Regulatory Toxicology and Pharmacology. 31: 231–241.
 18. Hao, F., Wang, X. and Chen, J. 2006. Involvement of plasma-membrane NADPH oxidase in nickel-induced oxidative stress in roots of wheat seedlings. Plant Science. 170: 151–158.
 19. Heath, R. L. and Packer, L. 1968. Photoperoxidation in isolated chloroplasts. I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. Archives of Biochemistry and Biophysics. 125: 189–198.
 20. Hsu, B. D. and Lee, J. Y. 1988. Toxic effects of copper on photosystem II of spinach chloroplasts. Plant Physiology. 87: 116-119.
 21. Jegerschod, C., Arellano, J. B., Schroder, W. P., Vankan, P. J. M., Barton, M. and Styring, S. 1995. Copper (II) inhibition of electron transfer through photosystem II studied by EPR spectroscopy. Biochemistry. 34:12747-12754.
 22. Ke Shi-Sheng, W. S., Xiong, Z. T., Chen, S. J. and Chen, J. J. 2007. Effects of copper and mineral nutrition on growth, copper accumulation and mineral element uptake in two *Rumex japonicus* populations from a copper mine and an uncontaminated field sites. Environmental and Experimental Botany. 59: 59-67.
 23. Kirbag Zengin, F. and Kirbag, S. 2007. Effects of copper on chlorophyll, proline, protein and abscisic acid level of sunflower (*Helianthus annuus* L.) seedlings. Environmental Biology. 28: 561-566.
 24. Kuznetsov, V. V. and Shevyakova, N. I. 1997. Stress responses of tobacco cells to high temperature and salinity. Proline accumulation and phosphorylation of polypeptides. Physiologia Plantarum. 100: 320-326.
- منابع مورد استفاده**
1. پوراکیبر، لطیفه (۱۳۸۶). بررسی اثرات فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی سمیت مس بر دانه رست های ذرت. پایان نامه دوره دکترا. دانشگاه ارومیه گروه زیست شناسی.
 2. Ahmad, M.S.A., Hussain, M., Ashraf, M., Ahmad, R. and Ashraf, M.Y. 2009. Effect of nickel on seed germinability of some elite sunflower (*Helianthus annuus* L.). Pakistan Botany. 41:1871–1882.
 3. Ali, M.A., Ashraf, M. and Athar, H.R. 2009. Influence of nickel stress on growth and some important physiological/ biochemical attributes in some diverse canola (*Brassica napus* L.) cultivars. Hazardous Materials. 172: 964–969.
 4. Baker, C. J. and Monck, N. M. 1994. An improved method for monitoring cell death in a cell suspension and leaf disk assays using Evans blue. Plant cell. 39: 7-12.
 5. Bates, L. S., Waldren, R. D. and Teare, I. D. 1973. Rapid determination of free prolin for water-stress studies. Plant and Soil. 39: 205-207.
 6. Bocca, B., Forte, G., Petrucci, F. and Cristaudo, A. 2007. Levels of nickel and other potentially allergenic metals in Ni-tested commercial body creams. Pharmaceutical and Biomedical Analysis. 44: 1197–1202.
 7. Chen, C., Huang, D. and Liu, J. 2009. Functions and toxicity of nickel in plants: recent advances and future prospects. Clean- Soil, Air, Water. 37: 304–313.
 8. Dere, S., Guns, T. and Sivaci, R. 1998. Spectrophotometric determination of chlorophyll A, B and total carotenoid contents of some algae species using different solvents. Turkish Botany. 22: 13-17.
 9. Dietz, K.J., Bair, M. and Kramer, U. 1999. Free radicals and reactive oxygen species as mediators of heavy metals toxicity in plants. In: Prasad MNV and Hagemeyer J [ed.], Heavy Metal Stress in Plants from Molecules to Ecosystems. 73–97.
 10. Drazkiewicz, M. and Baszynski, T. 2010. Interference of nickel with the photosynthetic apparatus of *Zea mays*. Ecotoxicology and Environmental Safety 73: 982–986.
 11. Duman, F. and Ozturk, F. 2010. Nickel accumulation and its effect on biomass, protein content and antioxidative enzymes in roots and leaves of watercress (*Nasturtium officinale* R. Br.). Environmental Sciences. 2010, 22(4) 526–532.
 12. Eriyamremu, G. E. and Lolodi, O. 2010. Alteration in lipid peroxidation and some antioxidant enzymes in germinating beans (*Vigna unguiculata*) and maize (*Zea mays*) Exposed to Nickel. Botany. 6(2): 170-175.
 13. Fernandes, J. C. and Henriques, F. S. 1991. Biochemical,

25. Lexmond, T. M. and Vandervorm, P. D. J. 1981. The effect of pH on copper toxicity to hydroponically grown maize. Netherlands Agricultural Science. 29: 209-230.
26. 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. 11591-592.
27. Liu, J., Xiong, Z., Li, T. and Huang, H. 2004. Bioaccumulation and ecophysiological responses to copper stress in two populations of *Rumex dentatus* L. from Cu contaminated and non-contaminated sites. Environmental and Experimental Botany. 52: 43-51.
28. Meloni, D. A., Martinez, C. A. and Cambraia, J. 2003. Photosynthesis and activity of superoxide dismutase, peroxidase and glutathione reductase in cotton under salt stress. Environmental and Experimental Botany. 49: 69-76.
29. Monni, S., Salemaa, M. and Millar, N. 2000. The tolerance of *Empetrum nigrum* to copper and nickel. Environmental Pollution. 109: 221-229.
30. Padmavathy, V. 2008. Biosorption of nickel (II) ions by baker's yeast: Kinetic, thermodynamic and desorption studies. Bioresource Technology. 99: 3100-3109.
31. Patsikka, E., Aro, E. M. and Tyystjarvi, E. 2001. Mechanism of copper-enhanced photoinhibition in thylakoid membranes. Physiologia Plantarum. 113: 142-150.
32. Quzounidou, G., Moustakas, M., Symeonidis, L. and Karataglis, S. 2006. Response of wheat seedlings to Ni stress: effects of supplemental calcium. Arch. Environmental Contamination Toxicology. 50, 346-352.
33. Romero-Puertas, M. C., Rodriguez-Serrano, M., Corpas, F. J., Gomez, M. L., Riao, A. D. and Sandalio, L. M. 2004. Cadmium-induced subcellular accumulation of O₂⁻ and H₂O₂ in pea leaves. Plant Cell Environment. 27: 1122-1134.
34. Seregin, I. V. and Kozhevnikova, A. D. 2006. Physiological role of nickel and its toxic effects on higher plants. Russian Plant Physiology. 53: 257-277.
35. Sharma, R. K. and Madhulika, A. 2005. Biological effects of heavy metals: An overview. Environmental Biology. 26: 301-313.
36. Singh, V. P. 1995. Toxic metal cadmium: In: Phytotoxicity and tolerance in plants (Ed.: R. K. Trivedy). Advances in Environmental Science Tehnology, Ashish Publication House, New Delhi. pp: 225-256.
37. Srivastava, S., Mishra, S., Tripathi, R. D., Dwivedi, S. and Gupta, D. K. 2006. Copper induced oxidative stress and responses of antioxidants and phytochelatins in *Hydrilla verticillata* (L.f.). Royle Aquatic Toxicology. 80 (4): 405-415.
38. Tewari, R. K., Kumar, P. and Sharma, P. N. 2006. Antioxidant responses to enhanced generation of superoxide anion radical and hydrogen peroxide in the copper-stressed mulberry plants. Planta. 223: 1145-1153.
39. Tripathi, A.K. and Tripathi, S. 2000. Changes in some physiological and biological characters in (*Albizia lebbek*) as bio-indicators of heavy metals. Botany. 40: 421-430.
40. Tripathi, T. C. 1973. Plant responses to water stress. Annual. Review. Plant Physiology. 24: 519-570.
41. Vijayarengan, P. and Dhanavel, D. 2005. Effects of nickel on chlorophyll content of black gram cultivars. Plant Sciences. 18: 253.
42. Wang, S. T., He, X. J. An, R. D. 2010. Responses of growth and antioxidant metabolism to nickel toxicity in *Luffa cylindrica* seedlings. Animal and Plant Sciences, 7, 2: 810- 821.
43. Wilhelm, M., Eberwein, G., H'olzer, J., Gladtk, D., Angerer, J. and Marczynski, B. 2007. Influence of industrial sources on children's health – Hot spot studies in North Rhine Westphalia, Germany. International Journal of Hygiene and Environmental Health. 210: 591-599.
44. Xu, J., Yang, L., Wang, Z., Dong, G., Huang, J., Wang. Y. (2006) Toxicity of copper on rice growth and accumulation of copper in rice grain in copper contaminated soil. Hemsphere. 62: 602-607.
45. Yan, R., Gao, S., Yang, W., Cao, M., Wang, S. and Chen, F. 2008. Nickel toxicity induced antioxidant enzyme and phenylalanine ammonia-lyase activities in (*Jatropha curcas* L.). Plant Soil Environment. 54, 7: 294-306.
46. Zhu, B. and Alva, A.K. 1993. Effect of pH on growth and uptake of copper by *swingle citrumelo* seedlings. Plant Nutrition. 16: 1837-1845.