تاریخ چاپ زمستان ۱۳۹۲

# اثر نیکل و مس بر بیومس، محتوای رنگیزه‌ای و آنزیم‌های آنتی‌اکسیداتیو در ریشه‌ها و اندام هوایی گیاه ذرت

لطیفه پوراکبر*، نفیسه ابراهیم‌زاده؛ دانشگاه ارومیه

## چکیده

مس و نیکل از عناصر ریزمغذی در گیاهان هستند که در حفظ متابولیسم طبیعی و رشد گیاه نقش اساسی دارند، ولی مازاد آن‌ها نیز بر بسیاری از عمل‌کردهای فیزیولوژیکی اثر بازدارندگی دارد. در این پژوهش، گیاه ذرت تحت تیمارهای سولفات مس (۰ و ۱۰۰ میکرو مولار)، سولفات نیکل (۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میکرو مولار) و برهم‌کنش مس (۱۰۰ میکرومولار) و نیکل (۱۰۰ و ۲۰۰ میکرومولار) در محیط هیدروپونیک کشت شدند. بعد از یک ماه تیمار، پارامترهای رشد و برخی تغییرات بیوشیمیایی در ریشه‌ها و اندام هوایی گیاهان کشت شده بررسی شد. نتایج نشان داد که با افزایش غلظت مس و نیکل، محتوای رنگیزه‌ای (کلروفیل a، b و کاروتنوئید کل)، طول و وزن خشک ریشه‌ها و اندام هوایی کاهش یافت، در صورتی‌که نشت یون $K^+$ و میزان مالون دی‌آلدئید به‌عنوان شاخص پراکسیداسیون چربی و فعالیت برخی آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی افزایش یافت، همچنین برهم‌کنش مس و نیکل اثر هم‌یاری با یک‌دیگر داشته و اثر هم را تشدید کردند.

## مقدمه

آلودگی آب با فلزات سنگین مشکلی عمده در جهان است. نیکل و مس از فلزات سنگین موجود در زباله‌های صنعتی، صنایع مانند آب فلزکاری، ذوب فلزات، استخراج معادن، رنگ‌سازی و چینی‌سازی هستند [۶]. علی‌رغم این‌که مس و نیکل از عناصر ریزمغذی در گیاهان هستند و در بسیاری از فرایندهای فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی دارای نقش اساسی‌اند، ولی مازاد آن‌ها نیز بر بسیاری از فرایندهای فیزیولوژیکی مانند فتوسنتز، تنفس، تغذیه معدنی و انتقال آسیملات‌ها اثر منفی می‌گذارد [۱۰]، [۲۷]. نیکل مازاد شدیداً تغذیه معدنی، فتوسنتز و عمل‌کرد غشاء را در گیاه تحت تأثیر قرار می‌دهد و به‌طور آشکار جوانه‌زنی بذر، رشد و توسعهٔ گیاه را مهار کرده و موجب کاهش عمل‌کرد سالانه گیاهان می‌شود [۹]. مس نیز در غلظت‌های زیاد به‌عنوان یک سم قوی وارد عمل می‌گردد که از طرق پراکسیداسیون اسیدهای چرب غیراشباع در غشاء سلولی منجر به آسیب سلول گیاهی می‌شود. [۳۲].

تولید گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) در گیاهان تحت تنش اتفاق می‌افتد که شامل رادیکال سوپراکسید ($O_2^{\cdot-}$)،

**واژه‌های کلیدی:** سمیت مس و نیکل، مالون دی‌آلدئید، محتوای رنگیزه‌ای، فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان.

دریافت ۹۱/۶/۱۸ پذیرش ۹۲/۸/٤

***نویسنده مسئول** l.pourakbar@urmia.ac.ir



[ Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2026-11-03 ]

رادیکال هیدروکسیل ($OH^{\cdot}$)، اکسیژن منفرد ($^1O_2$) و پراکسید هیدروژن ($H_2O_2$) است [۳۱]. کلروپلاست‌ها، میتوکندری‌ها و پراکسیزوم‌ها از مهم‌ترین اندامک‌های تولید کنندهٔ ROS در سلول‌های گیاهی، محسوب می‌شوند. در حال حاضر ROSها مسئول برخی آسیب‌های جدی القا شده به‌وسیلهٔ تنش‌ها به غشاء سلولی و ماکرو مولکول‌های اساسی شامل رنگیزه‌های فتوسنتزی، پروتئین‌ها، اسیدهای هسته‌ای و لیپیدها هستند [۱۹]. بنا بر این میزان ROSها در گیاهان باید به دقت کنترل شود.

گیاهان از طریق سیستم دفاعی آنتی‌اکسیدانی که شامل ترکیبات آنزیمی و غیرآنزیمی هستند، میزان ROSها را در داخل سلول‌ها، در حال تعادل نگه می‌دارند [۲۶]، [۲۸]. گیاهان برای حفظ رشد معمولی خود نیازمند جاروکننده‌های ROS هستند. آسکوربات پراکسیداز (APX)، کاتالاز (CAT)، گایاکول پراکسیداز (GPX) و پراکسیداز (POD) به‌همراه جاروکننده‌های غیرآنزیمی مثل آسکوربات، گلوتاتیون و پرولین به‌عنوان سیستم دفاعی عمده در مقابل ROSهای تولید شده در قسمت‌های مختلف سلول‌های گیاهی عمل می‌کنند [۳].

کاتالاز و پراکسیدازها از آنزیم‌های مهم در قبال تنش اکسیداتیو هستند. این آنزیم‌ها می‌توانند $H_2O_2$ را که محصول عمدهٔ تولید شده به‌وسیلهٔ سوپراکسید دیسموتاز است، به آب و مولکول‌های اکسیژن تجزیه کنند [۱۹]. بسیاری از تحقیقات نشان داده است که تحمل و مقاومت به فلزات سنگین معمولاً در ارتباط با سیستم آنتی‌اکسیدانی کارآمد است.

آلودگی فلزات سنگین مشکلی بزرگ با خطرات محیطی جدی است. با توجه به افزایش روزافزون آلودگی فلزات سنگین فهم چگونگی اثر مس و نیکل به‌عنوان فلزات سنگین، بر رشد، فرایندهای فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی در گیاهان ممکن است در حل مشکلات ناشی از آلودگی آن‌ها مؤثر باشد. هدف این تحقیق بررسی تأثیر تیمار توأم فلزات نیکل و مس بر میزان رشد، رنگیزه‌های فتوسنتزی، پراکسیداسیون غشاء و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی در گیاه ذرت است که از عمده محصولات کشاورزی کشت شده در سطح دنیا است.

## مواد و روش‌ها

بذرهای ذرت[۱] بعد از تهیه از مرکز تحقیقات کشـاورزی، قبل از کشت ۱۰ دقیقه با محلول ۰/۱ % $HgCl_2$ ضدعفونی و سپس با آب مقطر کاملاً شستشو داده شدند. برای آب‌گیری، بذرها ۲۴ ساعت درآب مقطر خیسانده شدند و سپس برای جوانه‌زنی به پتری دیش‌های به قطر۱۵ سانتی‌متر که حاوی دو لایهٔ کاغذ صافی مرطوب بودند انتقال یافتند. پتری دیش‌های حاوی بذر به آون با دمای ۲۷ درجهٔ سانتی‌گراد منتقل شدند و بعد از گذشت ۳ روز، دانه‌رست‌های همسان ذرت ۱۵ روز در اتاق کشت با دورهٔ نوری ۱۶ ساعت روشنایی روشنایی و ۸ ساعت تاریکی، شدت نوری ۱۵۰$\mu molm^{-2}s^{-1}$ (۱۰۰۰۰ لوکس)، دمای شبانه‌روزی۲۲/۲۷ درجهٔ سانتی‌گراد و رطوبت۸۵% در داخل گلدان‌های حاوی ماسه قرار گرفتند. طی این دوره گیاهان صرفاً با محلول هوگلند بدون اعمال نیکل و مس تغذیه شدند. بعد از گذشت ۱۵ روزگیاهان با غلظت‌های مختلف قلزات نیکل و مس تیمار شدند.

۱. *Zea mays* L.



[ Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2026-11-03 ]

آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام شد. گیاهان به هنگام اعمال تیمار به‌صورت یک روز در میان با آب مقطر و محلول هوگلند حاوی غلظت‌های مختلف نیکل (۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میکرومولار)، مس (۱۰۰ میکرو مولار) و غلظت‌های مختلف نیکل به‌همراه مس (۲۰۰ میکرو مولار Ni و ۱۰۰ میکرومولار Cu) و (۱۰۰ میکرومولار Ni و ۱۰۰ میکرومولار Cu) تغذیه شدند و از هر کدام ٦ تکرار تیمار شدند. برای تهیهٔ محلول مس، از سولفات مس ($CuSO_4.5H_2O$) و برای تهیهٔ غلظت‌های مختلف نیکل از سولفات نیکل ($NiSO_4 .6H_2O$) استفاده شد. پس از گذشت ۱۵ روز طول ریشه‌ها و ساقه‌ها، وزن خشک ریشه و اندام هوایی گیاهان ذرت به‌طور جداگانه اندازه‌گیری شد. گیاه ۳۳ روزهٔ ذرت برای انجام آزمایش‌ها برداشت شد. ۳ تکرار از هر تیمار بعد از برداشت و اندازه‌گیری طول ریشه و ساقه با یک خط کش تمیز، برای تعیین وزن خشک و برخی آزمایش‌هایی که نیاز به وزن خشک نمونه‌ها داشت، ریشه‌ها و ساقه‌ها در پاکت‌های مجزا قرار داده شدند و ٤٨ ساعت در آون ۸۰ درجهٔ سانتی‌گراد قرار گرفتند. وزن خشک با ترازویی با حساسیت ۰/۰۰۱ گرم اندازه گرفته شد. ۳ تکرار دیگر از هر تیمار بعد از بر داشت و جدا کردن اندام هوایی از ریشه‌ها برای انجام آزمایش‌هایی که نیاز به بافت تازه داشتند در فریزر ۸۰- درجهٔ سانتی‌گراد قرار گرفتند.

**اندازه‌گیری میزان پراکسید هیدروژن**

مقدار پراکسید هیدروژن با استفاده از روش جان[۱] و چاودهاری[۲] [۱۴] اندازه‌گیری شد. ۰/۵ گرم بافت تر توزین و با ml ۳ بافر فسفات با pH برابر ۶/۸ له گردید. عصارهٔ حاصل ۲۵ دقیقه در داخل سانتریفوژ با نیروی g ۶۰۰۰ گذاشته شد. برای تعیین میزان آب اکسیژنه ml ۳ از عصاره حاصل برداشته و روی آن ml ۱ تیتانیوم کلراید ۰/۱% در سولفوریک اسید ۲۰%(v/v) اضافه شد و محلول فوق ۱۵ دقیقه در داخل سانتریفوژ با نیروی g ۶۰۰۰ گذاشته شد و جذب محلول زرد رنگ حاصل با دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج nm ۴۱۰ اندازه‌گیری شد ($mM^{-1}\ cm^{-1}$ ۰/۲۸= ضریب خاموشی).

**اندازه‌گیری میزان رنگیزه‌ها**

برای اندازه‌گیری مقدار رنگیزه‌ها از روش دره[۳] و همکاران [۴] استفاده شد. یک گرم از بافت تر برگ‌ها وزن شد و با ml ۵۰ استون۱۰۰% له گردیده و با تنزیب صاف شد و عصاره حاصل ۱۰ دقیقه در داخل سانتریفوژ با دور rpm ۲۵۰۰ گذاشته شد و سپس برای تعیین مقدار کلروفیل (Chl) a و b جذب آن با دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج nm ۶۶۲ و nm ۶۴۵، برای تعیین کاروتنوئید کل ($C_{X+C}$) جذب آن در طول موج nm۴۷۰ اندازه‌گیری شد. برای محاسبهٔ مقادیر کلروفیل a وb و همچنین کاروتنوئید کل از فرمول ولبرن[۴] [۱۸] استفاده شد.

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

۱. Jana ۲. Choudhuri ۳. Dere ۴. Lichtenaler and Wellburn



[ Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2026-11-03 ]

**اندازه‌گیری مالون دی‌آلدهید**

برای اندازه‌گیری مقدار پراکسیداسیون چربی‌ها از روش هیت و پاکر[۱] [۱۳] استفاده گردید. ۱ گرم بافت تر توزین و با ml ۲/۵ محلول تری کلرواستیک اسید ۱۰% خوب له گردید. سپس محلول حاصل ۲۰ دقیقه در داخل سانتریفوژ با نیروی g۱۵۰۰۰ گذاشته شد بعد از عمل سانتریفوژ، حجم مساوی از عصاره رویی و تیوباربیوتیک اسید ۰/۵% در تری‌کلرو استیک اسید ۲۰% به لوله آزمایش منتقل شد و ۳۰ دقیقه در داخل انکوباتور $^{\circ}C$ ۹۶ قرار داده شد. در نهایت لوله‌ها را ۵ دقیقه وارد آب یخ کرده و بعد ۵ دقیقه در داخل سانتریفوژ با نیروی g۱۰۰۰۰ گذاشته شد. جذب محلول حاصل با دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج‌های nm ۵۳۲ و nm ۶۰۰ اندازه گیری شد ($mM^{-1}\ cm^{-1}$ ۱۵۵ = ضریب خاموشی).

**اندازه‌گیری میزان $K^+$ نشت یافته به محیط کشت**

برای انجام این آزمایش دانه‌رست‌های ۳ روزه ذرت ۲٤ ساعت تحت تیمار ml ۱۰ mM KCl ۲۰، قرار گرفتند و سپس دانه رست‌ها با آب مقطر شسته شده و با غلظت‌های مختلف مس تیمار شدند. پس از ۴۸ ساعت نمونه‌ها برداشت شده و میزان برون تراوش پتاسیم در محلول باقی‌مانده همهٔ گیاهان با دستگاه فلم فتومتر[۲] ساخت شرکت فاتر الکترونیک ایران اندازه‌گیری شد و با استفاده از منحنی استاندارد پتاسیم، میزان پتاسیم نشت یافته به محیط کشت بر حسب ppm محاسبه شد [۱].

**سنجش فعالیت آنزیم‌های آسکوربات پراکسیداز، گایاکول پراکسیداز، کاتالاز و گلوتاتیون ردوکتاز**

برای استخراج عصارهٔ گیاهی از روش کانگ[۳] [۱۵] با اندکی تغییرات استفاده شد. ۰/۵ گرم از بافت تر ریشه، واندام هوایی به‌همراه ۳ میلی‌لیتر بافراستخراج تریس- اسیدکلریدریک ۵۰ میلی‌مولار (pH= ۷) محتوی ۳ میلی‌مولار $MgCl_2$ و ۱ میلی‌مولار EDTA درهاون سرد ساییده شد. بافر استخراجی برای آنزیم آسکوربات پراکسیداز محتوی ۰/۲ میلی‌مولار آسکوربات نیز است. هموژنات حاصل ۲۰ دقیقه در دمای ٤ درجهٔ سانتی‌گراد با سرعت ۵۰۰۰ دور سانتریفوژ شد. محلول رویی برای سنجش فعالیت آنزیم‌های آسکوربات پراکسیداز، گایاکول پراکسیداز و کاتالاز استفاده شد.

**سنجش فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز (APX)**

سنجش فعالیت APX با استفاده از روش ناکانو[۴] و آساد[۵] [۲٤] انجام شد. مخلوط واکنش شامل ۲/۵ میلی‌لیتر بافر فسفات ۵۰ میلی‌مولار (pH = ۷ ) محتوی EDTA ۰/۱ میلی مولار، آسکوربات سدیم ۱ میلی مولار، ۰/۲ میلی‌لیتر $H_2O_2$ ۱درصد و ۰/۱ میلی‌لیتر عصاره استخراجی است. فعالیت APX به‌صورت کاهش در جذب طی۱ دقیقه در طول موج ۲٤۰ نانومتر محاسبه شد ($mM^{-1}\ cm^{-1}$ ۲/۸ = ضریب خاموشی).

**سنجش فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز (GPX)**

فعالیت آنزیم GPX بااستفاده از روش یوپادهیایا[۶] و همکاران [۲۹] سنجیده شد. مخلوط واکنش شامل ۲/۵

۱. Packer ۲. Flam photometer ۳. Kang ۴. Nakano ۵. Asad ۶. Upadhyaya



[ Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2026-11-03 ]

میلی‌لیتر بافر فسفات ۵۰ میلی‌مولار (pH=۷) محتوی ۱ میلی‌لیتر گایاکول ۱ درصد، ۱ میلی‌لیتر $H_2O_2$ ۱ درصد و ۰/۱ میلی‌لیتر عصارهٔ استخراجی بود. فعالیت GPX به‌صورت افزایش در جذب طی ۱ دقیقه در طول موج ۴۲۰ نانو متر محاسبه شد ($m\ M^{-1}\ cm^{-1}$ ۲۶/۶ = ضریب خاموشی) .

**سنجش فعالیت آنزیم کاتالاز (CAT)**

فعالیت آنزیم CAT با استفاده از روش ایبی[۱] [۲] سنجیده شد. مخلوط واکنش شامل ۲/۵ میلی‌لیتر بافر فسفات ۵۰ میلی‌مولار (pH=۷) محتوی ۰/۲ میلی‌لیتر $H_2O_2$ ۱ درصد و ۰/۳ میلی‌لیتر عصاره استخراجی بود. فعالیت آنزیم کاتالاز به‌صورت کاهشی در جذب طی ۱ دقیقه در طول موج ۲۴۰ نانو متر محاسبه شد ($m\ M^{-1}\ cm^{-1}$ ۰/۰۴۳۶= ضریب خاموشی).

**سنجش فعالیت آنزیم گلوتاتیون ردوکتاز (GR)**

فعالیت GR با استفاده از روش فویر[۲] و هالیور[۳] [۸] با اندکی تغییرات سنجیده شد. اساس سنجش کاهش جذب نمونه‌ها طی ۱ دقیقه در طول موج ۳۴۰ نانو متر به‌علت اکسیداسیون NADPH بود. مخلوط واکنش شامل بافر فسفات ۵۰ میلی مولار، کلرید منیزیم ۲/۵ میلی‌مولار، NADPH ۰/۲ میلی‌مولار، GSSG ۰/۵ میلی‌مولار و ۰/۳ میلی‌لیتر عصارهٔ استخراجی بود ($m\ M^{-1}\ cm^{-1}$ ۶/۲= ضریب خاموشی).

## محاسبات آماری

برای آنالیز داده‌ها و رسم نمودارها از برنامه‌های رایانه‌ای SPSS و Excel استفاده گردید. در همهٔ نمودارها بارهای عمودی نشان دهنده انحراف معیار (SE ±) برای سه تکرار است. مقایسهٔ میانگین‌ها با استفاده از آزمون آنوا[۴] در سطح ۵ درصد، در صورت معنی دار بودن اثر عوامل آزمایشی انجام شد.

## نتایج

بررسی علائم ظاهری در گیاهان ذرت شاهد و تحت تیمار غلظت‌های مختلف مس ونیکل، نشان داد که افزایش غلظت‌های این دو عنصر در گیاهان ذرت باعث بروز کلروز (زردی) برگی شد که این کلروز به‌صورت رنگ سبز متمایل به زرد در برگ‌ها ظاهر گردید. با افزایش غلظت این عناصر نوک برگ‌ها وحاشیهٔ برگ‌ها به‌صورت نکروزه شده درآمدند (نشان داده نشده است).

نتایج بررسی طول اندام هوایی و ریشه‌ها در نمودار ۱ الف آورده شده است. طبق این نمودار طول ریشه‌ها و اندام هوایی با افزودن فلزات سنگین مس، نیکل و نیکل به‌همراه مس کاهش معنی‌داری نسبت به گیاهان شاهد یافت. طبق نتایج حاصل مقدار کاهش طول اندام هوایی در گیاهان تیمار دیده نسبت به شاهد ۱۵ الی ۶۰ درصد و در ریشه‌ها ۱۰ الی ۵۰ درصد به‌ترتیب در تیمار مس ۱۰۰ میکرومولار و تیمار Ni 200 µM + ۱۰۰ µM Cu مشاهده شد.

۱. Aebi ۲. Foyer ۳. Halliwell ۴. ANOVA



[ Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2026-11-03 ]

بررسی وزن خشک گیاهان تحت تیمار نشان داد که با اعمال تیمار فلزات سنگین مس و نیکل، وزن خشک نسبت به گیاهان شاهد کاهش معنی‌داری یافت (نمودار ۱ ب). طبق این نمودار میزان کاهش وزن خشک در اندام هوایی گیاهان تیمار دیده نسبت به شـــاهد ۲۲ الی ۷۲ درصد و در ریشـــه‌ها ۳۹ الی ۶۹ درصد به‌ترتیب در تیمارهای نیکل ۱۰۰ میلی‌مولار و تیمـــار Ni 200 µM + Cu۱۰۰ µM بود.

بررسی میزان رنگیزه‌های فتوسنتزی نشان داد که با افزودن فلزات مس، نیکل و نیکل به همراه مس به محیط کشت گیاه ذرت، رنگیزه‌های کلروفیل a، b (نمودار ۲ الف) و کاروتنوئید کل ( نمودار ۲ ب) به‌طور معنی‌داری نسبت به گیاهان شاهد کاهش می‌یابد. حداکثر کاهش در میزان کلروفیل a، b و کاروتنوئیدها در تیمار Ni 200 µM + Cu۱۰۰ µM مشاهده شد. مقدار کاهش کلروفیل a در این تیمار ۶۹%، کلروفیل b، ۶۷% و میزان کاروتنوئید کل، ۷۵% نسبت به گیاهان شاهد بود.

بررسی میزان MDA به‌عنوان شاخص پراکسیداسیون لیپیدها نشان داد که با افزودن فلزات سنگین مس و نیکل به تنهـــایی و توأم با هم به محـــیط کشت میزان مـــالون دی‌آلـــدئید به‌طور معنی‌داری در هر دو انـــدام، هوایی و ریشـــه‌ها افزایش می‌یـــابد (نمودار ۳ الف). حداکـــثر افزایش در مـــیزان MDA در هر دو انـــدام در تیمـــار Ni 200 µM + Cu۱۰۰ µM مشاهده شد. میزان MDA در این تیمار در اندام هوایی ۲/۳ و در ریشه‌ها ۲/۱ برابر گیاهان شاهد بود.

میزان $K^+$ نشت یافته به محیط کشت به‌عنوان یک فاکتور نشان دهندهٔ آسیب فلزات سنگین مس، نیکل و نیکل توأم با مس بر غشاء سلول‌های ریشه در نمودار ۳ ب آورده شده است. طبق این نمودار نشت این یون در گیاهان تیمار دیده افزایش معنی‌داری نسبت به گیاهان شاهد داشت. میزان نشت یون پتاسیم حداقل ۳/۶ برابر در تیمار مس ۱۰۰ میکرومولار و حداکثر ۱۱/۶ برابر در تیمار Ni 200 µM + Cu۱۰۰ µM بود.

نتایج حاصل از بررسی فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی در نمودار ۴ آورده شده است. طبق این نمودار:

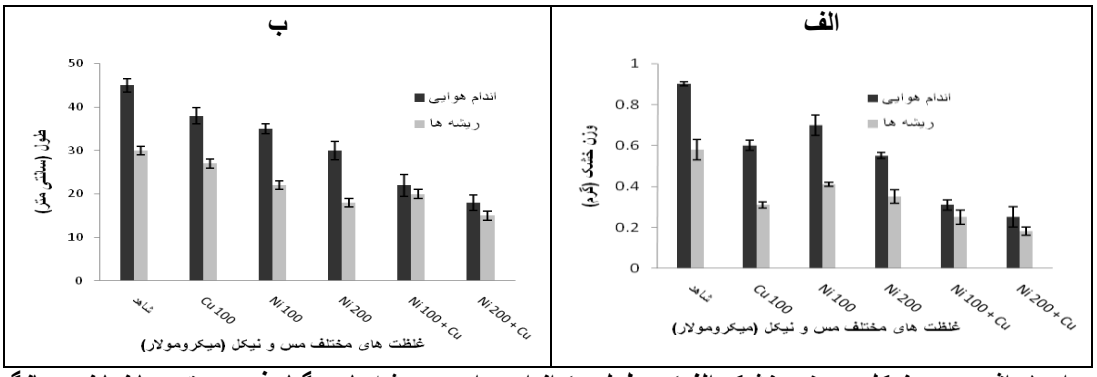
فعالیت آنزیم کاتالاز در اندام هوایی و ریشه‌ها با اعمال تیمارها افزایش معنی‌داری یافت (نمودار ۴ الف).

میزان افزایش در گیاهان تیمار دیده نسبت به شاهد، در اندام هوایی از ۲۴ تا ۷۷ درصد و در ریشه‌ها از ۵۰ تا ۱۱۳ درصد به‌ترتیب در تیمار نیکل ۱۰۰ میکرومولار و Ni 200 µM + Cu۱۰۰ µM مشاهده گردید. فعالیت این آنزیم در ریشه گیاهان تحت تیمار که به‌طور مستقیم در تماس با فلزات سنگین بود، نسبت به اندام هوایی بیشتر بود.

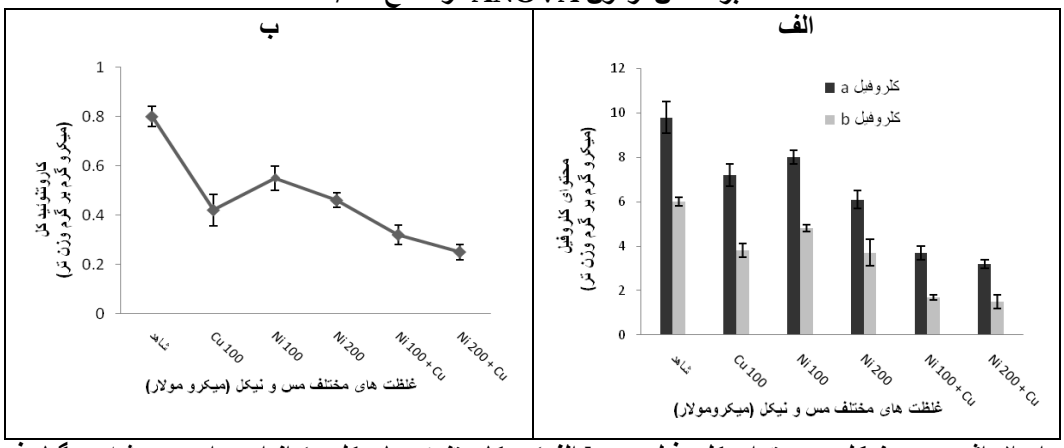
فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز نشان داد که فعالیت این آنزیم در اندام هوایی گیاهان تحت تیمار نسبت به شاهد ۱۳ الی ۳۸ درصد به‌ترتیب در تیمار نیکل ۱۰۰ میکرومولار و Ni 200 µM + Cu۱۰۰ µM بود (نمودار ۴ ب ). میزان فعالیت این آنزیم در ریشه‌ها نسبت به اندام هوایی در گیاهان تحت تیمار قابل توجه‌تر بود، به‌طوری که دامنه این افزایش ۸۳ تا ۱۰۷ درصد به‌ترتیب در تیمار نیکل ۱۰۰ میکرومولار و Ni ۱۰۰ µM + Cu 200 مشاهده شد.



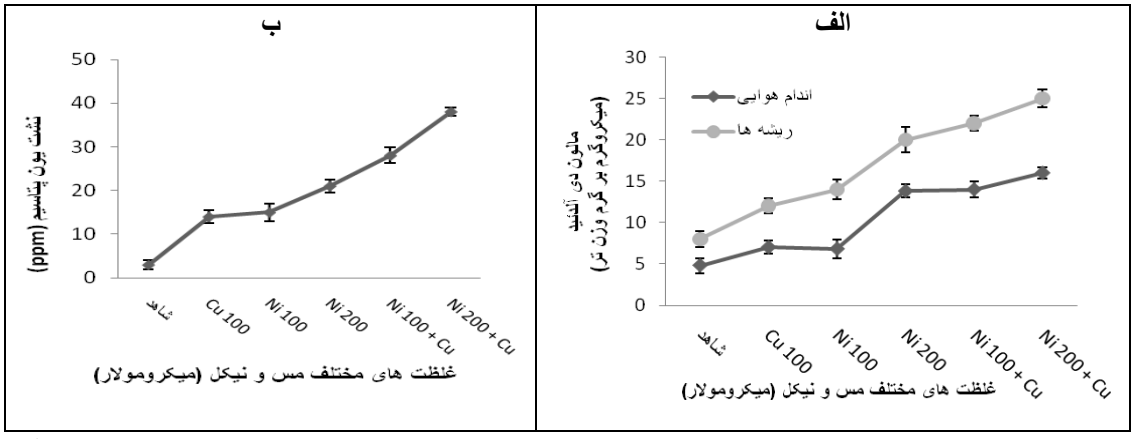
[ Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2026-11-03 ]




**نمودار ۱. اثر مس و نیکل بر وزن خشک الف) و طول ب) اندام هوایی و ریشه‌ها در گیاه ذرت. ستون‌ها نماینده میانگین سه تکرار و بارهای عمودی نشان‌گر انحراف استاندارد است و میزان معنی‌دار تغییرات در گروه تجربی در مقایسه با شاهد بر اساس آزمون ANOVA در سطح ۰/۰۵ است**




**نمودار ۲. اثر مس و نیکل بر محتوای کلروفیل a و b الف) و کاروتنوئیدهای کل ب) اندام هوایی و ریشه در گیاه ذرت. ستون‌ها نماینده میانگین سه تکرار و بارهای عمودی نشان گر انحراف استاندارد است و میزان معنی‌دار تغییرات در گروه تجربی در مقایسه با شاهد بر اساس آزمون ANOVA در سطح ۰/۰۵ است**



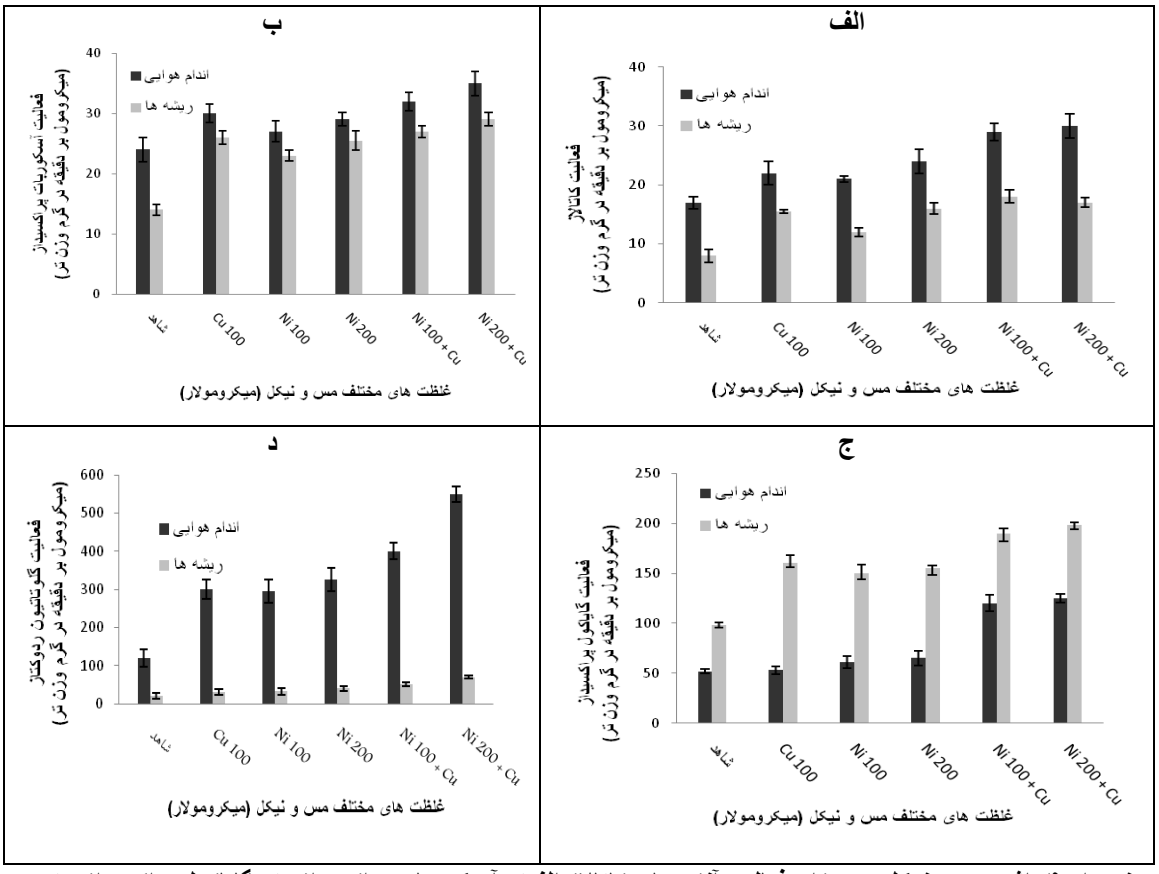

**نمودار ۳:. اثر مس و نیکل بر میزان مالون دی آلدئید الف) در اندام هوایی و ریشه و نشت یون پتاسیم ب) در ریشه گیاه ذرت. ستون‌ها نماینده میانگین سه تکرار و بارهای عمودی نشان‌گر انحراف استاندارد است و میزان معنی‌دار تغییرات در گروه تجربی در مقایسه با شاهد بر اساس آزمون ANOVA در سطح ۰/۰۵ است**

فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز در اندام هوایی و ریشهٔ گیاهان تحت تیمار افزایش معنی‌داری نسبت به گیاهان شاهد نشان داد (نمودار ۴ ج). میزان افزایش فعالیت این آنزیم در اندام هوایی ۲ تا ۱۴۰ درصد به‌ترتیب در تیمار مس ۱۰۰ میکرومولار و Ni 200 µM + Cu۱۰۰ µM مشاهده گردید. فعالیت این آنزیم در ریشه‌ها



[ Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2026-11-03 ]

نسبت به اندام هوایی گیاهان تیمار دیده بیش‌تر بود، به‌طوری که دامنه این افزایش ۵۳ تا ۱۰۲ درصد به‌ترتیب در تیمار نیکل ۱۰۰ میکرومولار و Ni 200 µM + Cu۱۰۰ µM مشاهده شد. بررسی فعالیت آنزیم گلوتاتیون ردوکتاز نشان داد که فعالیت این آنزیم نسبت به آنزیم‌های بررسی شده دیگر، چشم‌گیرتر است به‌طوری‌که در اندام هوایی گیاهان تیمار دیده ۱/۵ تا ۳/۵ برابر و در ریشه ۰/۵ تا ۲/۵ برابر نسبت به گیاهان شاهد افزایش نشان داد. فعایت این آنزیم در اندام هوایی نسبت به ریشه‌ها بیش‌تر بود.




**نمودار ۴. اثر مس و نیکل بر میزان فعالیت آنزیم‌های کاتالاز الف)، آسکوربات پراکسیدازب)، گایاکول پراکسیداز ج) و گلوتاتیون ردوکتاز د) در اندام هوایی و ریشه گیاه ذرت. ستون‌ها نماینده میانگین سه تکرار و بارهای عمودی نشان‌گر انحراف استاندارد است و میزان معنی‌دار تغییرات در گروه تجربی در مقایسه با شاهد بر اساس آزمون ANOVA در سطح ۰/۰۵ است**

## بحث

مس و نیکل در غلظت‌های پایین برای متابولیسم جانوران و گیاهان ضروری است و در ساختار تعدادی از پروتئین‌ها، آنزیم‌ها و کوفاکتورها حضور دارند. ولی وقتی مقادیر آن‌ها بیش از مقدار مورد نیاز موجود زنده باشد، می‌توانند موجب آسیب رسانی به موجود زنده گردند.

مهار رشد گیاه ذرت با افزودن مس و نیکل مازاد در محیط کشت به اثر سمیت این فلزات در گیاه دلالت می‌کند. طبق نتایج حاصل کاهش معنی‌دار وزن خشک ریشه‌ها، مشاهده شده در گیاه ذرت نیز می‌تواند ناشی از سمیت این اندام باشد. قسمت اعظم فلزات سنگین مثل مس و نیکل معمولاً به‌وسیله ریشه‌ها به دیواره سلول اتصال



[ Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2026-11-03 ]

می‌یابد [۲۲]. بررسی‌ها نشان داده است که فلزات سنگین بر تطویل ریشه‌ها اثر گذاشته و فعالیت میتوزی را کاهش می‌دهد، بنا بر این با مهار رشد ریشه که اندام اصلی جذب مواد است، رشد اندام هوایی نیز تحت تأثیر قرار می گیرد [۲۷]. کاهش رشد و بیومس ریشه در اثر اعمال مس و نیکل مازاد در گیاهان، *نیمفوئیدس پلتاتوم*[۱]، *لوفا سیلیندریکال*[۲] و *لمنا جیبا*[۳] نیز مشاهده شده است. [۱۶]، [۳۰]، [۳۲]. همچنین بررسی نشان داد که فلزات سنگین مس و نیکل موجب کاهش محتوای رنگیزه‌های فتوسنتزی شد. این کاهش ممکن است به‌علت القاء کمبود آهن و منیزیم در اثر اعمال مس و نیکل مازاد به گیاه و تحریک فعالیت کلروفیلاز به‌وسیلهٔ این فلزات باشد [۵]، [۲۵]. از طرف دیگر فلزات سنگین در کلروپلاست‌ها تجمع یافته و آسیب‌هایی مثل پراکسیداسیون آن‌ها را موجب می‌گردند [۱۷]. در نتیجه زردی مشاهده شده در برگ‌های گیاه ذرت در این بررسی می‌تواند به کاهش محتوای کلروفیل دلالت نماید. پژوهش‌های دیگر نیز نشان داده است که فلزات سنگین مثل نیکل [۷] و مس [۵] موجب کاهش محتوای رنگیزه‌ای می‌گردند .

پراکسیداسیون چربی‌ها که به‌عنوان شاخصی حساس به سمیت فلزات سنگین شناخته شده است، به‌عنوان زیست‌سنجی سمیت برای گیاهان در معرض فلزاتی مثل مس و نیکل پیشنهاد گردیده است [۷]، [۱۱]. افزایش MDA در اندام هوایی و ریشه‌های گیاه ذرت تحت تیمار غلظت‌های مختلف مس، نیکل و اثر توأم این دو فلز، نشان‌گر القا تنش اکسیداتیو در این گیاه بود. MDA محصولی با وزن مولکولی کم است که از تجزیهٔ پراکسیداسیونی چربی‌های اولیه و ثانویه تولید می‌گردد [۷]. پراکسیداسیون چربی‌ها با تنش اکسیداتیو همراه است و موجب ناپایداری و تراوایی غشاء پلاسمایی، نشت یون پتاسیم و دیگر محلول‌ها و همچنین اکسیداسیون اسیدهای آمینه شده، و نهایتاً مرگ سلولی را در پی دارد [۱۲]. سرعت برون تراوش یون پتاسیم از ریشه‌ها می‌تواند نشانه سمیت اکسیداتیو مس و نیکل در غشاء پلاسمایی باشد.

گیاهان دارای مکانیسم‌های آنزیمی و غیرآنزیمی برای پاک‌سازی گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) و کاهش اثرات مضر آن‌هاست. مسیر آنزیمی شامل آنزیم‌های کاتالاز، پراکسیدازها، سوپراکسید دیسموتاز و گلوتاتیون ردوکتاز است که در این کار تحقیقی بررسی شدند. پاسخ آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی به فلزات سنگین بحث برانگیز باقی‌مانده است و این پاسخ بسته به‌گونهٔ گیاهی و نوع تنش، همچنین بین بافت‌های مختلف یک گیاه متفاوت است [۶]. نتایج این پژوهش، پاسخ‌های متمایز آنزیم‌های آنتی‌اکسیداتیو به مس، نیکل و اعمال توأم این فلزات در قسمت‌های مختلف گیاه را نشان داد. نتایج حاصل نشان‌گر افزایش معنی‌دار و چشم‌گیر فعالیت این آنزیم‌ها در گیاهان تحت تیمار در هر دو اندام به‌ویژه ریشه‌ها بود. کاتالاز و پراکسیدازها در تجزیه آنزیمی $H_2O_2$ حاصل از فعالیت SOD، تولید شده در سلول‌ها دخیل هستند [۲۱]. گایاکول پراکسیداز نیز احیا پراکسید هیدروژن به آب و همچنین احیا چربی و یا هیدرواکسیدها به الکل‌ها را کاتالیز می‌کند. بنا بر این با اکسیداسیون GSH به GSSG جفت شده است [۲۰]. از فعالیت GPX می‌توان به‌عنوان بیومارکر در تنش‌های شدید سیستمیک استفاده کرد [۲۳].

۱. *Nymphoides peltatum* ۲. *Luffa cylindrica* ۳. *Lemna gibba* L.



[ Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2026-11-03 ]

گلوتاتیون ردوکتاز عمل کلیدی در چرخه گلوتاتیون و هم‌چنین در حفظ نسبت GSH/GSSG دارد که به‌وسیله احیا گلوتاتیون سولفید (GSSD) به گلوتاتیون احیا شده (GSH)، نقش حیاتی برای سیستم آنتی‌اکسیدانی و به‌همان اندازه برای مسیر سمیت‌زدایی بازی می‌کند [۲۳].

در نتیجه‌گیری کلی می‌توان بیان کرد که مس و نیکل، تأثیر منفی بر رشد گیاه ذرت داشته و با کاهش محتوای رنگیزه‌های فتوسنتزی، که نقش بسیار مهمی در فتوسنتز دارند، منجر به کاهش سرعت فتوسنتز و نهایتاً کاهش رشد گیاه ذرت گردیدند. نتایج حاصل از این کار تحقیقی نشان داد که افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانتی القاء شده توسط فلزات سنگین مس و نیکل به‌ویژه افزایش فعالیت چشمگیر گلوتاتیون ردوکتاز می‌تواند به‌عنوان مکانیسم دفاعی ثانویه در قبال تنش اکسیداتیو باشد. به همین سبب، فعالیت این آنزیم‌ها و بیان آن‌ها می‌تواند در پاسخ به سمیت مس و نیکل، تحریک شود. فعالیت این آنزیم‌ها برای رفع صدمات ناشی از تنش این فلزات افزایش می‌یابد بنا بر این گیاهانی که توانایی افزایش بیان و فعالیت این آنزیم‌ها را دارند، متحمل به فلزات سنگین هستند. در این راستا می‌توان بیان کرد که گیاه ذرت نیز در زمره این گیاهان است. ضمناً نتایج حاصل نشان‌گر اثر همیاری فلزات سنگین نیکل و مس در گیاه ذرت است و اعمال توأم آن‌ها موجب تشدید اثرات سمیت این فلزات نسبت به اعمال به تنهایی آن‌ها گردید که در نتیجه موجب تشدید پاسخ‌های آنتی‌اکسیداتیو در این تیمارها شد.

## منابع


۱. لطیفه پوراکبر، *بررسی اثرات فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی سمیت مس بر دانه رست‌های ذرت*، رسالهٔ دوره دکتری، دانشگاه ارومیه گروه زیست شناسی (۱۳۸٦).

2. H. Aebi,"Catalase in vitro. Methods in Enzymology", 105 (1984) 121-126.

3. K. Apel, H. Hirt, "Reactive oxygen species: Metabolism, oxidative stress and signal transduction", Annual Review Plant Biology, 55 (2004) 373-399.

4. S. Dere, T. Guns, R. Sivaci, "Spectrophotometric determination of chlorophyll a, b and total carotenoid contents of some algae species using different solvents", Turkish Journal of Botany, 22 (1998) 13-17.

5. M. Drazkiewicz , T. Baszynsk, "Interference of nickel with the photosynthetic apparatus of *Zea mays*", Ecotoxicology and Enviromental Safety, 73 (2010) 982-986.

6. F. Dumanand, F. Ozturk, "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 (2010) 526-532.

7. G. E. Eriyamremu, O. Lolodi, "Alteration in lipid peroxidation and some antioxidant enzymes in germinating beans (*Vigna unguiculata*) and maize (*Zea mays*) exposed to nickel", International Journal of Botany, 6 (2010) 170-175.




[ Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2026-11-03 ]

8. C. H. Foyer, R. Halliwell, "The fresence of glutathione and glutathione reductase in chloroplasts: a proposed role in ascorbic acid metabolism", Planta, 13 (1976) 321-325.
9. H. Fushun, W. Xuechen, J. Chen, "Involvement of plasma-membrane NADPH oxidase in nickel-induced oxidative stress in roots of wheat seedlings", Plant Science, 170 (2006) 151-158.
10. E. Gajewska, M. Skłodowska, "Nickel-induced changes in nitrogen metabolism in wheat shoots", Journal of Plant Physiology, 166 (2009) 1034-1044.
11. C. Gonnelli, F. Galardi, R. Gabbrielli, "Nickel and copper tolerance and toxicity in three Tuscan population of *Silene eparadoxa*", Journal of Plant Physiolog, 113 (2001) 507-514.
12. P. L. Gratao, A. Polle, P. J. Lea, R. A. Azevedo, "Making the life of heavy metal-stressed plants a little easier", Functional, Plant Biology, 32 (2005) 48-494.
13. R. L. Heath, L. Paker, "Photoperoxidation in isolated chloroplasts, I, Kinetics and stoichiometery of fatty acid peroxidation", Archives of Biochemistry and Biophysics, 125 (1968) 189-198.
14. S. Jana, M. A. Choudhuri, "Glycolate metabolism of three submerged aquatic anagiosperms during aging", Aquatic Botany,12 (1981) 345-354.
15. H. M. Kang, M. F. Saltiveit, "Chilling tolerance of maize, cucumber and rice seedling (leaves and roots) and differentially affected by salicylic acid", Physiologia Plantarum, 115 (2002) 577-576.
16. N. Khellaf, M. Zerdaoui, "Growth response of duckweed *Lemna gibba* L. to copper and nickel phytoaccumulation", Ecotoxicology, 19 (2010) 1363-1368.
17. F. Kirbag Zengin, S. Kirbag, "Effects of copper on chlorophyll, proline, protein and abscisic acid level of sunflower (*Helianthus annuus* L.) seedlings", Journal of Environmental Biology, 28 (2007) 561-566.
18. H. K. Lichtenthaler, A. R. Wellburn, "Determination of total carotenoids and chlorophylls a and b in different solvents, Biochemical Society Transactions, 11 (1985) 591-592.
19. C. C. Lin, CH. Kao, "Effect of NaCl stress on $H_2O_2$ metabolism in rice leaves", Plant Growth Regulation, 30 (2000) 151-155.
20. V. Magdalena, J. Monferran, A. Sanchez, L. Marıa, D. Pignata and A. Wunderlin, "Copper-induced response of physiological parameters and antioxidant enzymes in the aquatic macrophyte *Potamogeton pusillus*", Environmental Pollution, 157 (2009) 2570-2576.
21. R. Maheshwari, R. S. Dubey, "Nickel-induced oxidative stress and the role of antioxidant defence in rice seedlings", Plant Growth Regulation, 59 (2009) 37-49.



[ Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2026-11-03 ]

22. A. M. Michaud, M. N. Bravin, M. Galleguillos, "Copper uptake and phytotoxicity as assessed in situ for durum wheat (*Triticum turgidum durum* L.) cultivated in Cu-contaminated, former vineyard soil", Plant Soil, 298 (2007) 99-111.
23. S. Mishra, S. Srivastava, R. D. Tripathi, R. Kumar, C. S. Seth and D. K. Gupta, "Lead detoxification by Coontail (*Ceratophyllum dermersum* L.) involves induction of phytochelatins and antioxidant system in response to its accumulation", Chemosphere, 65 (2006) 1027-1039.
24. Y. Nakano, K. Asada, "Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts", Plant Cell Physiology, 22 (1981) 867-880.
25. G. Ouzounidou, M. Moustakas, R. J. Strasser, "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 (1997) 81-90.
26. L. Pourakbar, M. Khayami, J. Kharaand T. Farbodnia, "Physiological effects of copper on some biochemical parameters in *Zea mays* L. seedlings", Pakistan Journal of Biological Sciences, 10 (2007) 4092-4096.
27. Z. Shulan, L. Qing, Q. Yanting, D. Lian, "Responses or root growth and protective enzymes to copper stress in turfgrass", Acta Biologica Cracoviencia Series Botanica, 2 (2010) 7-11.
28. V. Tavallali, M. Rahemi, B. Kholdebarin, "Ameliorative effects of zinc on pistachio (*Pistacia vera* L.) growth under salt-affected soil conditions", Research Journal of Environmental Sciences, 6 (2009) 656-666.
29. A. Updhyaya, D. Sankhla, T. D. Davis, N. Sankhla, B. N. Smidth, "Effect of paclobutrazol on the activies of some enzymes of activated oxygen metabolism and lipid peroxidation in senescing soybean leaves", Plant Physiology, 121 (1985) 453-461.
30. S. T. Wang, X. J. He, R. D. An, "Responses of growth and antioxidant metabolism to nickel toxicity in *Luffa cylindrica* seedlings", Journal of Animal and Plant Sciences, 7 (2010) 810-821.
31. W. Weisany, Y. Sohrabi, G. Heydari, A. Siosemardeh, G. Ghassemi, "Physiological responses of soyabean (*Glycine max* L.) to zinc application under salinity stress", Australian Journal of Crop Science, 5 (2011) 1441-1447.
32. W. Xue, S. H. Guoxin, X. U. Qinsong, H. U. Jinzhao, "Exogenous polyamines enhance copper tolerance of *Nymphoide speltatum*", Journal of Plant Physiology, 164 (2007) 1062-1070.



[ Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2026-11-03 ]