

## **Effect of seed priming with sodium hydrosulfide (NaHS) on some physiological and anatomical parameters in maize plants under lead stress**

**Roya Zanganeh, Rashid Jamei<sup>\*</sup>, Siavash Hosseini Sarghein, Soroush Kargar Khorrani**  
Department of Biology, Faculty of Sciences, Urmia University, Urmia, Iran

### **Abstract**

Lead as an enormous pollutant in the environment affects the metabolic and physiological activities of living organisms, therefore, has attracted more attention in recent years. In this research, the effect of seed priming with sodium hydrosulfide (hydrogen sulfide donor) on growth parameters, total chlorophyll content, soluble sugars and total protein and anatomical index in maize plant under lead stress was investigated. For this purpose, maize seeds were soaked in sodium hydrosulfide (0.5 mM) for 12 hours. Seedlings were treated with Pb 2.5 mM after planting. The results showed that lead stress reduced growth parameters, total chlorophyll, soluble sugars and total protein contents, and in case of structural studies, increased thickness of root and vascular cylinders and size of root parenchymal and epidermal cells, and decreased the thickness of leaf and middle vein. Seed pretreatment with sodium hydrosulfide resulted in an improvement in growth parameters and increased total chlorophyll, soluble sugars, and total protein contents. Regarding the anatomical parameters, sodium hydrosulfide pretreatment, depending on the parameter type, could compensate anatomical factors that were affected by the Pb stress. According to the results, it seems that Pb stress has harmful effects on maize plant, and hydrogen sulfide as a signaling molecule in different ways could increase plant adaptation to stress conditions.

**Keywords:** Anatomy, Hydrogen sulfide, Lead stress, Maize plant, Physiological parameters, Seed pretreatment

---

\* Corresponding Author: r.jamei@urmia.ac.ir

زیست‌شناسی گیاهی ایران، سال دهم، شماره سی و ششم، تابستان ۱۳۹۷، صفحه ۳۴-۱۹

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۶/۰۹/۲۷

تاریخ بازنگری: ۱۳۹۷/۰۲/۲۴ و ۱۳۹۷/۰۴/۱۲

تاریخ پذیرش نهایی: ۱۳۹۷/۰۴/۲۳

## تأثیر پیش تیمار بذر با سدیم هیدروسولفید (NaHS) بر برخی شاخص‌های فیزیولوژیک و آناتومیک گیاه ذرت در تنش سرب

رویا زنگنه، رشید جامعی\*، سیاوش حسینی سرقین، سروش کارگر خرمی

گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

### چکیده

سرب، فلزی سنگین و آلاینده محیط‌زیست است که بر فعالیت‌های متابولیک و فیزیولوژیک موجودات زنده تأثیر می‌گذارد؛ بنابراین در سال‌های گذشته کانون توجه بیشتر پژوهشگران بوده است. در پژوهش حاضر اثر پیش تیمار بذر با سدیم هیدروسولفید (دهنده هیدروژن سولفید) بر شاخص‌های رشد، محتوای کلروفیل کل، قندهای محلول، پروتئین کل و شاخص آناتومیک در گیاه ذرت قرار گرفته در تنش سرب بررسی شد. بدین منظور، بذرهاى ذرت به مدت ۱۲ ساعت در سدیم هیدروسولفید ۰/۵ میلی‌مولار خیسانده شدند. دانه‌رست‌ها پس از کاشت در گلدان با محلول ۲/۵ میلی‌مولار سرب تیمار شدند. نتایج نشان دادند تنش سرب کاهش شاخص‌های رشد، محتوای کلروفیل کل، قندهای محلول و پروتئین کل را باعث شد و از لحاظ ساختاری افزایش ضخامت ریشه، استوانه آوندی و اندازه سلول‌های پارانشیمی پوست و اپیدرم ریشه و کاهش ضخامت برگ و رگبرگ میانی را باعث شد. پیش تیمار بذر با سدیم هیدروسولفید به بهبود شاخص‌های رشد و افزایش میزان کلروفیل کل، قندهای محلول و پروتئین کل منجر شد. همچنین پیش تیمار سدیم هیدروسولفید، شاخص‌های آناتومیک را که بر اثر تنش سرب تغییر یافته بودند بسته به نوع شاخص جبران کرد. با توجه به نتایج به نظر می‌رسد تنش سرب آثار زیان‌باری بر گیاه ذرت دارد و هیدروژن سولفید مولکول علامتی است که از راه‌های مختلف، سازگاری گیاه را به شرایط تنش افزایش می‌دهد.

**واژه‌های کلیدی:** آناتومی، پیش تیمار بذر، تنش سرب، شاخص فیزیولوژیک، گیاه ذرت، هیدروژن

سولفید

\* نگارنده مسئول: نشانی پست الکترونیک: r.jamei@urmia.ac.ir، شماره تماس: ۰۴۴۱۲۷۵۵۲۹۵

## مقدمه

که مدت‌های طولانی فیتوتوکسین مضر برای رشد و نمو گیاهان در نظر گرفته می‌شد؛ اما در حال حاضر مولکولی کوچک با عملکردهای چندگانه و عمل‌کننده در غلظت کم شناخته می‌شود. هیدروژن سولفید آثار مثبتی بر رشد و نمو گیاهان دارد؛ حرکت روزنه‌ای، القای ریشه‌های نابه‌جا و جوانه‌زنی دانه در تنش اسمزی را با حفاظت گیاه از خسارت اکسیداتیو سرعت می‌دهد و در مقاومت گیاهان به تنش نیز نقش دارد (Lisjak *et al.*, 2010). تأثیر کاربرد سدیم هیدروسولفید (دهنده هیدروژن سولفید) به صورت خارجی در کاهش تنش شوری در گیاه یونجه (Wang *et al.*, 2012)، تنش خشکی در گیاه گندم (Shan *et al.*, 2011)، گرما در گیاه توت‌فرنگی (Christou *et al.*, 2014)، سرما در گیاه انگور (Fu *et al.*, 2013) و تنش فلزهای سنگین مختلف مانند آلومینیوم در گیاه جو (Chen *et al.*, 2013)، سرب در گیاه کلزا (Ali *et al.*, 2014)، کادمیوم در گیاه یونجه (Li *et al.*, 2012) و غیره گزارش شده است.

کاهش فیزیولوژیک و بیوشیمیایی تنش سرب با تیمار سدیم هیدروسولفید در پژوهش‌های قبلی Bharwana و همکاران (۲۰۱۴) در گیاه پنبه و Ali و همکاران (۲۰۱۴) در گیاه کلزا بررسی شده است؛ اما تا به حال درباره اثر پیش‌تیمار بذریه با سدیم هیدروسولفید در بهبود پاسخ‌های آناتومیک گیاهان قرار گرفته در تنش سرب پژوهشی انجام نشده است. در حال حاضر از ترکیبات متعددی به صورت خارجی با اسپری کردن، اضافه کردن به محلول هو گلند و پیش‌تیمار بذریه برای افزایش تحمل گیاهان به تنش‌های محیطی استفاده می‌شود. از

سرب (Pb) از جمله فلزهای سمی برای انسان و همچنین جزء عناصر غیر ضروری برای گیاهان است که عملکرد زیستی شناخته شده‌ای ندارد؛ ولی به علت حل‌پذیری این عنصر در آب، به راحتی از ریشه جذب گیاه می‌شود (Kim *et al.*, 2002) و با این روش، افزایش این فلز در محیط بر رشد و متابولیسم گیاهان اثر می‌گذارد (Sharma and Dubey, 2005). سمی بودن سرب در گیاهان جلوگیری از رشد گیاه و فتوسنتز، اختلال در وضعیت آب گیاه، کاهش جذب برخی عناصر ضروری، تغییر در تعادل هورمونی گیاه، مهار یا فعال کردن فعالیت‌های آنزیمی، اختلال در ساختار پروتئین، ایجاد تنش اکسیداتیو و افزایش پراکسیداسیون لیپیدها را موجب می‌شود (Pourrut *et al.*, 2011; Ali *et al.*, 2014). غلظت‌های زیاد سرب در خاک القای ریختی غیرعادی را در بسیاری از گونه‌های گیاهی باعث می‌شود؛ مثلاً سرب ضخیم‌شدگی نامنظم ریشه‌چه در گیاه نخود سبز و دیواره سلولی آندودرم و لیگنینی‌شدن پارانشیم کوتیکولی را باعث می‌شود (Sengar *et al.*, 2008). مطابق با گزارش‌ها، سرب قطر ساقه و ریشه را افزایش می‌دهد که این افزایش از افزایش حجم غلاف آوندی ناشی می‌شود (Ghelich and Zarinkamar, 2013). بررسی‌ها نشان داده‌اند در گیاه سویا سمی بودن سرب تغییرات بافت‌شناسی در برگ‌ها را باعث می‌شود، پهنک برگ را باریک می‌کند، آوند چوبی و آبکش در غلاف آوندی را کوچک می‌کند و قطر آوند چوبی را کاهش می‌دهد (Elzbieta and Chwil, 2005).

هیدروژن سولفید (H<sub>2</sub>S) مولکول گازی است

سانتی گراد و شدت نور ۱۵۰ میکرومول فوتون بر متر مربع بر ثانیه انجام شد. گیاهان به مدت دو روز به صورت یک‌روز در میان با ۸۰ میلی لیتر آب یا محلول غذایی هوگلند آبیاری شدند؛ سپس گروهی از گیاهان برای اعمال تنش با محلول ۲/۵ میلی مولار سرب نترات آبیاری شدند و به صورت یک‌روز در میان با آب مقطر و محلول هوگلند حاوی سرب نترات تغذیه شدند. پس از گذشت ۹ روز از اعمال تنش سرب، گیاهان برداشت شدند. برای جلوگیری از انباشتگی سرب در مدت ۹ روز، دو بار با آب مقطر شستشو شدند. هنگام برداشت، اندام هوایی و ریشه گیاهان جدا و برای انجام آزمایش‌های بعدی در دمای ۸۰- درجه سانتی گراد نگهداری شدند.

**اندازه‌گیری طول ریشه و اندام هوایی و حجم ریشه:** پس از برداشت نمونه‌های شاهد و تیمار، طول بلندترین ریشه از ناحیه یقه تا نوک ریشه و طول بلندترین اندام هوایی از یقه تا نوک برگ با خط کش اندازه‌گیری شد. حجم ریشه با استوانه مدرج ۱۰۰ میلی متری پر شده با ۹۰ میلی لیتر آب اندازه‌گیری شد. بدین منظور، ریشه‌های جدا شده از اندام هوایی در آب درون استوانه فرو برده شدند؛ سپس با پیپت ۱۰ میلی متری حاوی ۱۰ میلی لیتر آب درون استوانه حاوی ریشه آب می‌ریزیم. میزان آب باقیمانده در پیپت حجم ریشه را مشخص می‌کند که بر حسب سانتی متر مکعب است.

**اندازه‌گیری مقدار کلروفیل کل:** برای سنجش میزان کلروفیل و کاروتنوئید از روش (Lichtenthaler, 1987) استفاده شد. ۰/۱ گرم از برگ‌های تازه گیاه در هاون چینی حاوی ۱۵ میلی لیتر استون ۸۰ درصد ساییده شد و پس از سانتریفیوژ (مدل 5702، شرکت Eppendorf،

روش‌های به کاررفته برای افزایش تحمل به تنش‌های محیطی، پیش تیمار بذر یکی از روش‌های آسان، مقرون به صرفه و با احتمال آسیب کمتر است. این روش یکی از راهکارهایی است که بیشتر برای افزایش قدرت گیاهچه‌ها در شرایط محیطی نامطلوب استفاده می‌شود. با توجه به اهمیت اقتصادی گیاه ذرت، پژوهش حاضر با هدف بررسی اثر پیش تیمار سدیم هیدروسولفید در بهبود شاخص‌های فیزیولوژیک و رشد و تغییر ویژگی‌های آناتومیک این گیاه در تنش سرب انجام شد.

## مواد و روش‌ها

در پژوهش حاضر گیاه ذرت رقم ۷۰۴ (*Zea mays cv. 704*) استفاده شد. بذرهای این گیاه از جهاد کشاورزی کرمان تهیه شدند. ابتدا بذرها با هیپوکلریت سدیم ۱ درصد به مدت ۵ دقیقه ضد عفونی شدند. پس از ۳ بار آبکشی با آب مقطر، در غلظت ۰/۵ میلی مولار سدیم هیدروسولفید و شاهد آب مقطر به مدت ۱۲ ساعت خیسانده شدند. آزمایشی مقدماتی برای تعیین مناسب‌ترین غلظت سدیم هیدروسولفید برای اعمال تیمار از بین ۴ غلظت مختلف ۰/۲۵، ۰/۵، ۱ و ۲ میلی مولار انجام شد. پس از این مدت بذرها در پتری‌دیش‌های حاوی کاغذ صافی مرطوب در شرایط تاریکی قرار گرفتند و جوانه‌زنی به مدت ۳ روز انجام شد. پس از جوانه‌زنی، دانه‌رست‌های هم‌اندازه انتخاب و در گلدان‌های حاوی ماسه و پرلیت به نسبت ۲ به ۱ کشت شدند. رشد گیاهان در اتاق کشت با شرایط نوری ۱۶ ساعت روشنایی، ۸ ساعت تاریکی، دمای بیشینه ۲۷ درجه سانتی گراد، دمای کمینه ۲۰ درجه

**اندازه‌گیری ضخامت برگ و رگبرگ میانی:**  
برای بررسی ضخامت برگ و رگبرگ، مقطع‌گیری از ناحیه میانی برگ نمونه‌های شاهد و تیمار انجام شد.

**سنجش مقدار قندهای محلول:** بدین منظور، از روش فنل سولفوریک اسید استفاده شد که براساس هیدرولیز اسیدی قندهای محلول است و ضمن ایجاد ترکیب فورفورال با فنل، کمپلکس رنگی تولید می‌کند (Dubios *et al.*, 1956). ۰/۵ گرم وزن تر گیاه از هر تیمار توزین شد و با ۵ میلی‌لیتر آب مقطر در هاون، خوب ساییده و سپس با کاغذ صافی صاف شد. یک میلی‌لیتر از عصاره به‌دست آمده درون لوله آزمایش منتقل شد؛ سپس به آن ۱/۵ میلی‌لیتر آب مقطر، یک میلی‌لیتر فنل ۵۵ درصد (V/W) و ۳ میلی‌لیتر سولفوریک اسید ۹۸ درصد اضافه شد. لوله‌ها به‌مدت یک ساعت در دمای آزمایشگاه گذاشته شدند تا رنگ نهایی به دست آید. شدت رنگ حاصله در طول موج ۴۸۵ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر خوانده شد. برای تعیین غلظت قندهای محلول، نمودار استاندارد با غلظت‌های معلوم گلوکز تهیه شد.

**سنجش میزان پروتئین‌های محلول:** اندازه‌گیری محتوای پروتئین محلول با روش Lowry و همکاران (۱۹۵۱) انجام شد. بدین منظور، به ۰/۲ گرم بافت تازه، ۴ میلی‌لیتر بافر تریس - هیدروکلریک اسید ۰/۲ مولار با pH=۸ اضافه شد که حاوی تریس ۰/۲ نرمال، ساکارز ۵۰ میلی‌مولار و آسکوربیک اسید ۰/۰۵ میلی‌مولار بود و حجم نهایی بافر با آب مقطر به ۱۰۰ میلی‌لیتر رسانده شده بود. مخلوط بافر و بافت گیاهی به‌مدت ۲۴ ساعت در یخچال قرار داده شد؛ سپس به‌مدت ۲۰ دقیقه در

آلمان) به‌مدت ۱۰ دقیقه و در ۳۰۰۰ g، محلول رویی جدا و جذب آن با دستگاه اسپکتروفتومتر UV-Visible (مدل S2100، شرکت WPA، انگلستان) در طول موج‌های ۶۴۵ و ۶۶۵ نانومتر خوانده شد. غلظت کلروفیل‌های a و b با رابطه‌های ۱ و ۲ محاسبه شد. کلروفیل کل از مجموع کلروفیل a و b به دست آمد.

$$\text{رابطه ۱} \quad \text{Chl.a} = (12.25A_{665} - 2.79A_{645})$$

$$\text{رابطه ۲} \quad \text{Chl.b} = (21.21A_{645} - 5.1A_{665})$$

**بررسی‌های ساختاری:** برای مطالعه نمونه‌ها با میکروسکوپ نوری، مقاطع عرضی به‌صورت دستی از قسمت‌های لازم تهیه شد؛ سپس مقاطع با کارمن زاجی - سبز متیل رنگ‌آمیزی شدند (Hosseini Sarghein *et al.*, 2011). قسمت‌های مختلف مد نظر برگ و ریشه با میکروسکوپ نوری (مدل 475200-9901، شرکت Zeiss، آلمان) مجهز به عدسی مدرج، مطالعه شدند. عکس‌برداری از نمونه‌ها با دوربین دیجیتالی (مدل DSC-W35، شرکت SONY، ژاپن) نصب‌شده روی میکروسکوپ انجام شد.

**اندازه‌گیری قطر ریشه و دستجات آوندی ریشه:** مقطع‌گیری دستی برای مطالعه ضخامت ریشه و دستجات آوندی ریشه از ۱/۵ تا ۲ سانتی‌متر پایین‌تر از نوک مریستم رأسی انجام و سپس ضخامت آنها با عدسی مدرج تعیین شد.

**اندازه‌گیری شاخص‌های سلول‌ها:** برای اندازه‌گیری سلول‌های اپیدرمی و پارانشیمی ریشه، بزرگ‌ترین سلول‌ها انتخاب شدند و اندازه آنها با عدسی مدرج تعیین شد (Hosseini Sarghein *et al.*, 2011).

اطمینان ۹۵ درصد تأثیر معنی‌داری بر محتوای کلروفیل کل شاهد نداشت.

**شاخص‌های آناتومیک:** قطر ریشه، قطر دستجات آوندی ریشه، اندازه سلول‌های پارانشیم پوست ریشه و اندازه سلول‌های اپیدرم ریشه در گیاهان تیمار شده با سرب نسبت به نمونه‌های شاهد افزایش یافتند. افزایش اندازه سلول‌های پارانشیم پوست ریشه مطابق با داده‌های تجزیه واریانس (جدول ۱) با اطمینان ۹۵ درصد معنی‌دار نبود. پیش تیمار بذر با سدیم هیدروسولفید کاهش این شاخص‌ها را در گیاهان تیمار شده با سرب باعث شد؛ اما کاهش اندازه سلول‌های پارانشیم پوست ریشه با اطمینان ۹۵ درصد معنی‌دار نبود. پیش تیمار بذر با سدیم هیدروسولفید در شرایط بدون تنش سرب اندازه سلول‌های اپیدرم ریشه را افزایش داد (شکل ۱ و جدول ۳).

بررسی اثر تنش سرب بر ضخامت پهنک برگ و رگبرگ میانی، کاهش معنی‌دار این شاخص‌ها را نشان داد. پیش تیمار بذر با سدیم هیدروسولفید افزایش معنی‌دار ضخامت برگ و رگبرگ میانی را در شرایط تنش موجب شد؛ اما تأثیر معنی‌داری بر ضخامت پهنک برگ و رگبرگ میانی در حالت شاهد نداشت (شکل ۱ و جدول ۳).

**شاخص‌های فیزیولوژیک:** داده‌های حاصل از اندازه‌گیری محتوای قندهای محلول و پروتئین کل در تنش سرب، کاهش معنی‌دار این شاخص‌ها را با اطمینان ۹۵ درصد مطابق با داده‌های تجزیه واریانس (جدول ۱) نشان دادند. آزمایش حاضر نشان داد

۴۰۰۰ g سانتی‌فیوژ شد. ۱ میلی‌لیتر از فاز بالای محتوای پروتئین‌های محلول برداشته و ۴ میلی‌لیتر معرف مس سولفات قلیایی به آن اضافه شد. پس از ۱۰ دقیقه ۱/۵ میلی‌لیتر از محلول رقیق شده فولین - سیو کالتیو که قبلاً به نسبت ۹:۱ با آب مقطر رقیق شده بود به آن افزوده و ۳۰ دقیقه در تاریکی قرار داده شد. در نهایت، جذب نمونه‌ها در طول موج ۶۶۰ نانومتر خوانده و میزان پروتئین محلول با توجه به نمودار استاندارد پروتئین تهیه شده با غلظت‌های آلبومین سرم گاوی محاسبه شد.

**تحلیل آماری:** پژوهش حاضر در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام شد. برای هر تیمار سه تکرار در نظر گرفته شد. تحلیل واریانس یک‌سویه داده‌های حاصل از اندازه‌گیری شاخص‌ها با نرم‌افزار SPSS، نسخه ۱۹ انجام و میانگین داده‌ها با آزمون دانکن مقایسه شد.  $p < 0/05$ ، اختلاف معنی‌دار در نظر گرفته شد.

**شاخص‌های رشد و محتوای کلروفیل کل:** نتایج آزمون F نشان دادند همه شاخص‌های رشد شامل طول ریشه و اندام هوایی و حجم ریشه در گیاه ذرت قرار گرفته در تنش سرب نسبت به شاهد مطابق با داده‌های تجزیه واریانس (جدول ۱) به‌طور معنی‌دار ( $p < 0/05$ ) کاهش یافتند. پیش تیمار بذر با سدیم هیدروسولفید افزایش طول ریشه و اندام هوایی و حجم ریشه را در حالت شاهد و تنش باعث شد (جدول ۲). همچنین تنش سرب کاهش معنی‌دار کلروفیل کل را در گیاه ذرت موجب شد؛ اما پیش تیمار بذر با سدیم هیدروسولفید محتوای کلروفیل کل را در شرایط تنش به‌طور معنی‌دار افزایش داد. پیش تیمار بذر با سدیم هیدروسولفید با

جدول ۱- تجزیه واریانس: RL (طول ریشه)، SL (طول اندام هوایی)، RV (حجم ریشه)، TCh (کلروفیل کل)، RD (قطر ریشه)، CCD (قطر استوانه مرکزی)، PCT (ضخامت سلول پارانشیم)، ECT (ضخامت سلول اپیدرم)، LT (ضخامت پهنک برگ)، MT (ضخامت رگبرگ میانی)، RSu (قندهای محلول ریشه)، SSu (قندهای محلول اندام هوایی)، RPro (پروتئین کل ریشه) و SPro (پروتئین کل اندام هوایی)

میانگین مجموع مربعات				درجه آزادی	منابع تغییر
TCh	RV	SL	RL		
۱۹/۰۲*	۰/۶۵**	۱۵۳/۲۲**	۱۳۹/۵۷**	۳	تیمار
۲/۸۷	۰/۰۴	۱/۵۰	۳/۱۰	۸	خطا

میانگین مجموع مربعات						درجه آزادی	منابع تغییر
MT	LT	ECT	PCT	CCD	RD		
۰/۰۰۸**	۰/۰۰۲**	۶۵/۰۶**	۴۳/۱۴ <sup>ns</sup>	۰/۰۰۱*	۰/۰۷*	۳	تیمار
۰/۰۰۰	۰/۰۰۰	۴/۶۸	۲۲/۴۳	۰/۰۰۰	۰/۰۱	۸	خطا

میانگین مجموع مربعات				درجه آزادی	منابع تغییر
SPro	RPro	SSu	RSu		
۶/۴۹*	۵/۴۴*	۸/۶۸**	۱۰/۹۹**	۳	تیمار
۰/۶۶	۰/۴۲	۰/۵۰	۰/۲۶	۸	خطا

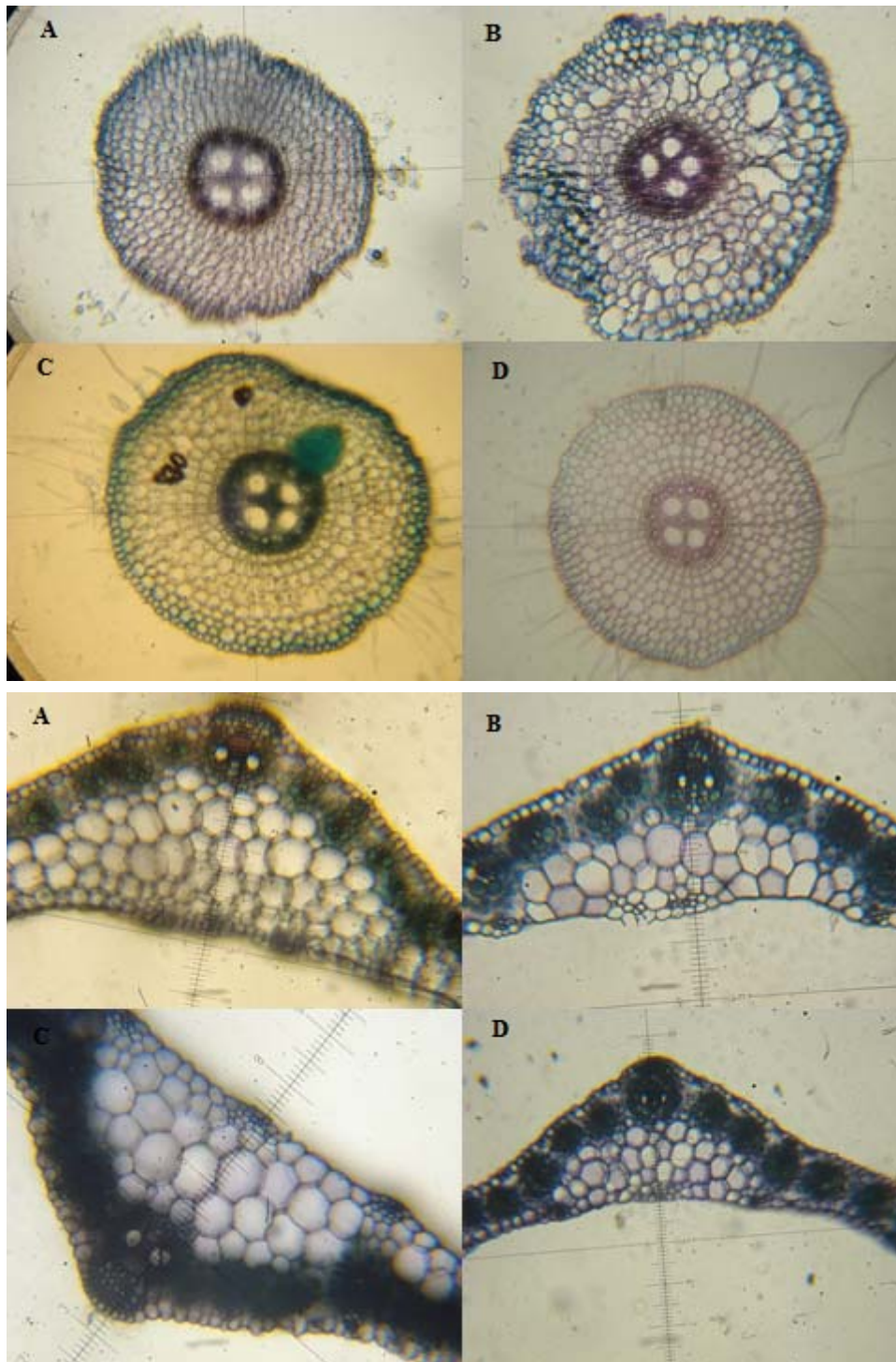
\*، معنی داری در سطح ۰/۰۵، \*\*، معنی داری در سطح ۰/۰۱ و <sup>ns</sup>، معنی دار نبودن را نشان می‌دهد.

جدول ۲- اثر پیش تیمار بذر با سدیم هیدروسولفید بر شاخص‌های رشد و محتوای کلروفیل کل گیاه ذرت در شرایط شاهد و تنش سرب- مقادیر، میانگین سه تکرار  $\pm$  SE هستند. حروف متفاوت بیان کننده تفاوت معنی دار در سطح  $p < 0.05$  هستند.

تیمار	طول ریشه (سانتی متر)	طول اندام هوایی (سانتی متر)	حجم ریشه (سانتی متر مکعب)	کلروفیل کل (میلی گرم بر گرم وزن تر)
شاهد	۳۲/۳۳ $\pm$ ۰/۸۸ <sup>ab</sup>	۳۳ $\pm$ ۰/۹۹ <sup>b</sup>	۱/۰۶ $\pm$ ۰/۱۲ <sup>b</sup>	۱۴/۳۹ $\pm$ ۰/۴۵ <sup>a</sup>
(۲/۵ mM) Pb	۱۹/۵۰ $\pm$ ۰/۷۶ <sup>c</sup>	۲۰/۳۳ $\pm$ ۰/۶۶ <sup>c</sup>	۰/۴۰ $\pm$ ۰/۰۵ <sup>c</sup>	۹/۱۵ $\pm$ ۰/۲۸ <sup>b</sup>
(۰/۵ mM) NaHS	۳۵ $\pm$ ۱/۲۰ <sup>a</sup>	۳۶/۳۳ $\pm$ ۰/۴۴ <sup>a</sup>	۱/۵۳ $\pm$ ۰/۱۳ <sup>a</sup>	۱۴/۵۸ $\pm$ ۱/۵۵ <sup>a</sup>
NaHS+Pb	۳۰/۶۶ $\pm$ ۱/۱۵ <sup>b</sup>	۳۳/۶۶ $\pm$ ۰/۶۰ <sup>b</sup>	۱/۰۵ $\pm$ ۰/۱۴ <sup>b</sup>	۱۲/۴۹ $\pm$ ۱/۰۶ <sup>a</sup>

شد. پیش تیمار بذر با سدیم هیدروسولفید میزان پروتئین کل اندام هوایی را در شرایط بدون تنش به طور معنی داری افزایش داد؛ اما تأثیر معنی داری بر

پیش تیمار بذر با سدیم هیدروسولفید افزایش معنی دار مقدار قندهای محلول و پروتئین کل ریشه و اندام هوایی گیاه ذرت را در شرایط تنش باعث



شکل ۱- تصاویر میکروسکوپی تغییرات آناتومیک گیاه ذرت با بزرگنمایی ۱۰۰- شکل بالا مربوط به ریشه و شکل پایین مربوط به برگ گیاه ذرت است: شرایط بدون تنش (A)، تنش سرب (B)، پیش تیمار بذر با سدیم هیدروسولفید (C) و پیش تیمار بذر با سدیم هیدروسولفید همراه با تنش سرب (D)



جدول ۳- اثر پیش تیمار بذر با سدیم هیدروسولفید بر شاخص های آناتومیکی گیاه ذرت در شرایط کنترل و تنش سرب- مقادیر، میانگین سه تکرار  $\pm$  SE هستند. حروف متفاوت بیان کننده تفاوت معنی دار در سطح  $p < 0.05$  هستند.

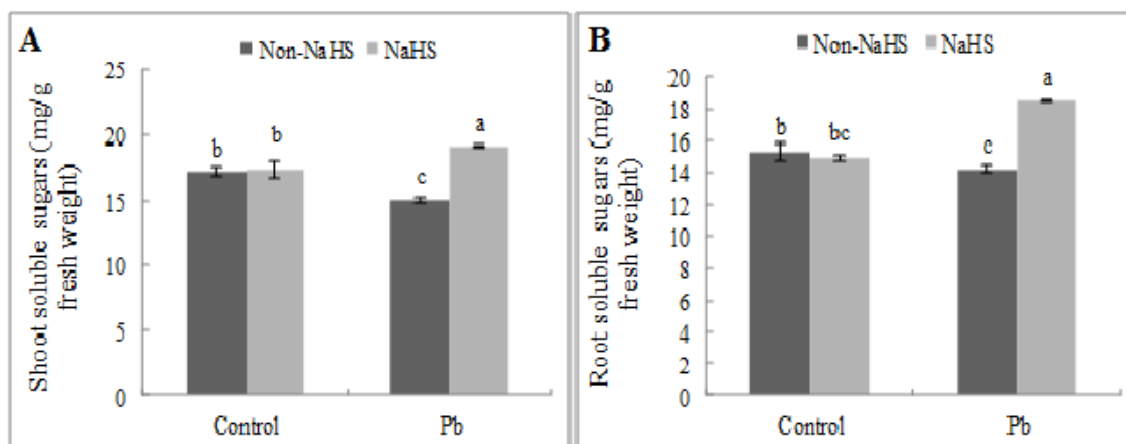
تیمار	قطر ریشه (میلی متر)	قطر استوانه آوندی ریشه (میلی متر)	سلول پارانشیم ریشه (میکرومتر)	ضخامت سلول اپیدرم ریشه (میکرومتر)	ضخامت پهنک برگ (میلی متر)	ضخامت رگبرگ میانی (میلی متر)
شاهد	$0.74 \pm 0.04^b$	$0.24 \pm 0.008^b$	$45/96 \pm 4/60^a$	$20/75 \pm 0/38^c$	$0.176 \pm 0.014^a$	$0.43 \pm 0.026^a$
Pb (mM) (۲/۵)	$1.07 \pm 0.11^a$	$0.29 \pm 0.013^a$	$55/29 \pm 2/63^a$	$31/41 \pm 0/87^a$	$0.11 \pm 0.008^b$	$0.30 \pm 0.008^c$
NaHS (۰/۵ mM)	$0.77 \pm 0.32^b$	$0.27 \pm 0.004^{ab}$	$50/33 \pm 1/20^a$	$28/75 \pm 0/88^{ab}$	$0.173 \pm 0.008^a$	$0.39 \pm 0.005^{ab}$
NaHS+Pb	$0.75 \pm 0.02^b$	$0.26 \pm 0.009^b$	$51/00 \pm 0/57^a$	$24/83 \pm 1/30^b$	$0.15 \pm 0.005^a$	$0.35 \pm 0.005^b$

محتوای قندهای محلول ریشه و اندام هوایی و پروتئین کل ریشه گیاهان ذرت در شرایط بدون تنش نداشت (شکل ۲ و ۳).

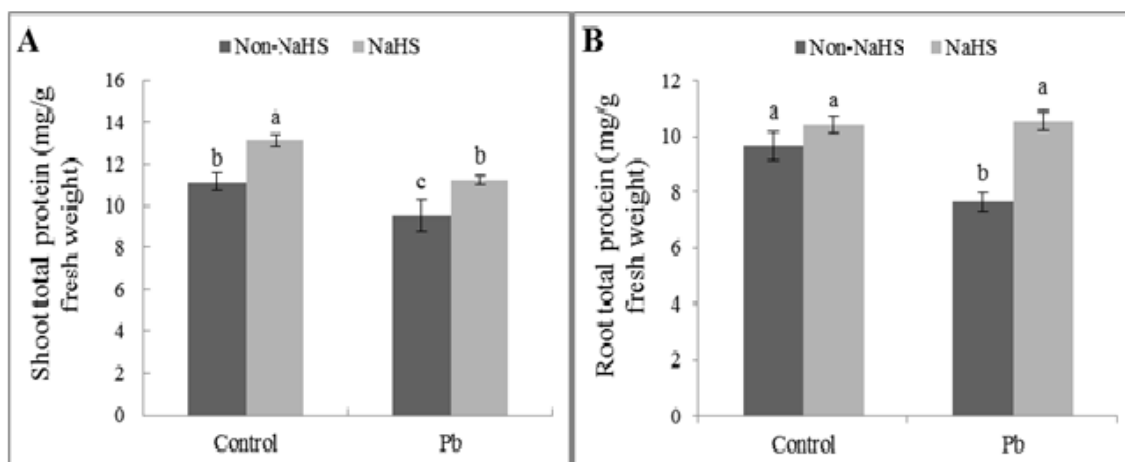
## بحث

تنش فلزهای سنگین از جمله عوامل محدود کننده رشد ریشه است و کاهش توسعه سیستم ریشه‌ای به محدود شدن رشد بخش هوایی هم منتهی می‌شود. نتایج به دست آمده از پژوهش حاضر نشان دادند تنش سرب کاهش شاخص‌های رشد شامل طول ریشه و اندام هوایی و حجم ریشه گیاه ذرت را موجب می‌شود (جدول ۲). این کاهش رشد ممکن است نتیجه اختلال در عملکرد هورمون‌هایی مانند اکسین بر اثر تیمار فلز سنگین باشد (Potters *et al.*, 2007). سرب به نوکلئیک اسیدها متصل می‌شود؛ تراکم و جمع شدگی کروماتین را موجب می‌شود؛ فرایند همانندسازی و رونویسی را ممانعت می‌کند و در نهایت بر تقسیم سلولی و رشد تأثیر می‌گذارد (Johnson, 1998). در موافقت با نتایج پژوهش حاضر کاهش طول

ریشه و اندام هوایی، در گیاه لوبیای قرار گرفته در تنش سرب و کادمیوم نیز مشاهده شده است (Bhardwaj *et al.*, 2009). کاهش حجم ریشه در پژوهش حاضر ممکن است به دلیل جلوگیری از تشکیل ریشه‌های جانبی در گیاهان تیمار شده با سرب باشد (Fahr *et al.*, 2013). اندازه‌گیری محتوای کلروفیل اطلاعاتی درباره کیفیت انجام فتوسنتز می‌دهد و کاهش میزان کلروفیل در تیمار سرب نمایان کننده وسعت آسیب‌های اکسیداتیو است. نتایج به دست آمده از سنجش محتوای کلروفیل (جدول ۲) نشان دادند میزان کلروفیل کل بر اثر تیمار سرب کاهش یافت. قرارگیری گیاهان در معرض غلظت‌های زیاد فلزهای سنگین کاهش بیوسنتز کلروفیل و جلوگیری از عمل فتوسنتز را موجب می‌شود. گزارش شده است افزایش فعالیت کلروفیل‌لاز در شرایط فراوانی سرب تخریب کلروفیل را افزایش می‌دهد (Sharma and Dubey, 2005). آنزیم گاما-آمینولولیک اسید دهیدراتاز یکی از آنزیم‌های مسیر بیوسنتز پورفیرین‌ها از جمله کلروفیل است. فلزهای سنگین با



شکل ۲- اثر پیش تیمار بذر با سدیم هیدروسولفید بر محتوای قندهای محلول اندام هوایی (A) و ریشه گیاه ذرت (B) در شرایط شاهد و تنش سرب- مقادیر، میانگین سه تکرار  $\pm$  SE هستند. حروف متفاوت بیان کننده تفاوت معنی دار در سطح  $p < 0.05$  هستند.



شکل ۳- اثر پیش تیمار بذر با سدیم هیدروسولفید بر محتوای پروتئین کل اندام هوایی و ریشه گیاه ذرت در شرایط شاهد و تنش سرب- مقادیر، میانگین سه تکرار  $\pm$  SE هستند. حروف متفاوت بیان کننده تفاوت معنی دار در سطح  $p < 0.05$  هستند.

کاربرد سدیم هیدروسولفید به صورت خارجی در شرایط تنش سرب در گیاهان کلزا و پنبه نیز مشاهده شده است (Ali et al., 2014; Bharwana et al., 2014). بهبود شاخص‌های رشد و محتوای کلروفیل کل، آثار مثبت هیدروژن سولفید را بر گیاه ذرت قرار گرفته در تنش سرب نشان می‌دهد. در پژوهش حاضر بهبود شاخص‌های رشد با پیش تیمار هیدروژن سولفید ممکن است به دلیل بهبود محتوای کلروفیل و در نتیجه بهبود کارایی فتوسنتز باشد. Mostofa و همکاران (۲۰۱۵) بهبود محتوای

مهار آنزیم‌های گاما-آمینولولنیک اسید دهیدراتاز و پروتوکلروفیلید ردوکتاز مهار بیوسنتز کلروفیل را سبب می‌شوند. سرب با روی موجود در جایگاه فعال آنزیم گاما-آمینولولنیک اسید دهیدراتاز جایگزین می‌شود و بازدارنده این آنزیم است و با این روش کاهش بیوسنتز کلروفیل را موجب می‌شود (Prasad and Freitas, 2003). در پژوهش حاضر، پیش تیمار بذر با سدیم هیدروسولفات بهبود شاخص‌های رشد و محتوای کلروفیل کل را باعث شد. بهبود شاخص‌های رشد و محتوای کلروفیل با

گزیلم را افزایش بلوغ ریشه می‌دانند که به دلیل تغییر تعادل هورمونی ناشی از تنش فلزهای سنگین ایجاد می‌شود. گزارش شده است اتیلن افزایش قطر و کاهش رشد طولی ریشه را باعث می‌شود (Li *et al.*, 2014). افزایش محتوای اتیلن که هورمون تنش شناخته می‌شود در تنش های مختلف گزارش شده است (Wani *et al.*, 2016)؛ بنابراین دلیل دیگر افزایش قطر ریشه و کاهش رشد طولی آن در پژوهش حاضر ممکن است افزایش تولید اتیلن در گیاهان قرار گرفته در تنش سرب باشد. در پژوهش حاضر، اندازه سلول‌های پارانشیمی پوست ریشه ذرت در تنش سرب افزایش یافت؛ اما این افزایش معنی‌دار نبود (جدول ۳). افزایش اندازه سلول‌های پارانشیمی پوست ریشه در گیاه سویا در تنش کادمیوم نیز گزارش شده است (Chaca *et al.*, 2014). این پژوهشگران افزایش قطر ریشه مشاهده شده را در تنش کادمیوم نتیجه افزایش اندازه سلول‌های پارانشیمی پوست ریشه می‌دانند که ممکن است نتیجه کاهش فعالیت میتوزی در منطقه رأسی ریشه و افزایش مقاومت به جریان شعاعی آب و مواد باشد. گزارش شده است افزایش اندازه سلول ممکن است به دلیل فعال شدن فرایندهای متابولیک برای سازش گیاهان با حضور غلظت‌های زیاد سرب در خاک باشد (Kosobrukhov *et al.*, 2004). براساس نتایج ما اندازه سلول‌های اپیدرمی ریشه در تنش سرب افزایش یافت (جدول ۳). مطالعه Ghelich و Zarinkamar (۲۰۱۳) بر یونجه نشان داد سلول‌های اپیدرمی در گیاهان قرار گرفته در تنش سرب نسبت به گیاهان شاهد بزرگ‌تر و نامنظم‌تر هستند. سلول‌های اپیدرمی، بافت مرزی

کلروفیل و در نتیجه بهبود شاخص‌های رشد را در گیاه برنج قرار گرفته در تنش کادمیوم به حفاظت کلروفیل در برابر تنش اکسیداتیو با کاربرد سدیم هیدروسولفید به صورت خارجی نسبت داده‌اند. آنها همچنین گزارش کردند هیدروژن سولفید که مولکولی مشارکت‌کننده در سیگنالینگ است، فرایند فتوسنتز را با افزایش بیوژنز کلروپلاست و تثبیت دی‌اکسید کربن بهبود می‌بخشد.

جذب و تجمع فلزهای سنگین به تغییرات ساختاری و زیرساختاری در ریشه گیاهان منجر می‌شود. نتایج پژوهش حاضر افزایش قطر ریشه و دستجات آوندی ریشه را در تنش سرب نشان دادند. در موافقت با نتایج بررسی حاضر، Ghelich و Zarinkamar (۲۰۱۳) گزارش کرده‌اند تنش سرب افزایش قطر ریشه و دستجات آوندی ریشه را در گیاه یونجه باعث می‌شود. مطالعه حاضر نشان داد افزایش قطر ریشه به افزایش قطر دستجات آوندی مربوط می‌شود. افزایش قطر ریشه و دستجات آوندی، سازوکاری برای جبران کاهش رشد ریشه است (Panou-Filothou and Bosabalidis, 2004). گزارش‌های متعددی نشان می‌دهند حضور سرب بر وضعیت آب در گیاهان به‌طور معنی‌داری اثر می‌گذارد (Sharma and Dubey, 2005). افزایش قطر دستجات آوندی در بررسی حاضر ممکن است به افزایش آب درونی لازم و انتقال راحت‌تر آب از ریشه به اندام هوایی مربوط باشد و به حفظ روابط آبی گیاه در شرایط تنش کمک کند (Panou-Filothou and Bosabalidis, 2004). Ghelich و Zarinkamar (۲۰۱۳) با بررسی اثر تنش سرب در گیاه یونجه علت افزایش ناحیه

پیش تیمار بذر با سدیم هیدروسولفید کاهش ضخامت ریشه و دستجات آوندی ریشه و اندازه سلول‌های پارانشیمی پوست و اپیدرم ریشه گیاهان ذرت را در تنش سرب باعث می‌شود؛ اما این کاهش درباره اندازه سلول‌های پارانشیمی پوست معنی دار نبود. هیدروژن سولفید احتمالاً با تعدیل تنش سرب آثار این فلز سنگین را بر شاخص‌های آناتومیک جبران می‌کند؛ زیرا داده‌های آناتومیک در گیاهان پیش تیمار شده با سدیم هیدروسولفید در شرایط تنش به داده‌های شاهد نزدیک است. پیش تیمار سدیم هیدروسولفید همچنین افزایش ضخامت برگ و رگبرگ گیاهی را موجب می‌شود. هیدروژن سولفید مولکول علامتی است که با سایر مولکول‌های علامتی مانند نیتریک اکسید و هورمون‌های گیاهی برای پاسخ‌های دفاعی گیاه برهم کنش می‌کند (Jin and Pei, 2015). هیدروژن سولفید ممکن است با تأثیر بر هورمون اکسین که در طول شدن و تقسیم سلولی نقش دارد و احتمالاً عمل آن با تنش سرب مختل شده است، افزایش ضخامت برگ و رگبرگ میانی را موجب می‌شود. افزایش محتوای اکسین و نیتریک اکسید در سه گیاه سویا، *Salix matsudana* و *Ipomoea batatas* بر اثر تیمار سدیم هیدروسولفید گزارش شده است (Zhang *et al.*, 2009). Zhang و همکاران (۲۰۰۹) گزارش کردند هیدروژن سولفید تحریک اندام‌زایی را در ریشه این گیاهان باعث می‌شود. آنها پیشنهاد کردند هیدروژن سولفید در مسیر علامتی اندام‌زایی ریشه مولکول علامتی است که در بالادست اکسین و نیتریک اکسید عمل می‌کند. در بررسی حاضر نیز باتوجه به شکل ۱

برای تماس مستقیم با فلزهای سمی ایجاد می‌کنند. آسیب به سلول‌های اپیدرمی در پژوهش Panou-Filotheou و Bosabalidis (۲۰۰۴) بر گیاه پونه کوهی بر اثر سمی بودن مس مشاهده شده است که جذب آب و مواد غذایی را کاهش می‌دهد. Panou-Filotheou و Bosabalidis (۲۰۰۴) افزایش حجم ناحیه پوست و ضخامت دستجات آوندی را در تنش غلظت‌های سمی مس برای حفظ آب درونی گزارش کرده‌اند. Chaca و همکاران (۲۰۱۴) دلیل تغییرات آناتومی ریشه گیاه سویا را در تنش کادمیوم کاهش جذب آب و مواد غذایی، کاهش نرخ تعرق و تغییرات هورمونی گزارش کرده‌اند.

ضخامت برگ و رگبرگ میانی در گیاهان تیمار شده با سرب کاهش نشان داد (جدول ۳). یافته‌های پژوهش حاضر با گزارش‌های ارائه شده در گیاه بارهنگ در شرایط تنش سرب همسو بود (Kosobrukhov *et al.*, 2004). Chaca و همکاران (۲۰۱۴) گزارش کرده‌اند تغییرات آناتومیک در برگ‌های گیاه سویای قرار گرفته در تنش کادمیوم به بازدارندگی رشد سلول به دلیل مداخله کادمیوم در تولید جاسمونات مربوط می‌شود. همچنین گزارش شده است سرب به طور مستقیم بر طول شدن سلول‌ها با تأثیر بر آنزیم‌های دیواره سلولی و ATPase موجود در پلاسمالما مؤثر است (Breckle and Kahle, 1992). Kosobrukhov و همکاران (۲۰۰۴) گزارش کرده‌اند کاهش قطر رگبرگ میانی در نقل و انتقال آب و مواد غذایی اختلال ایجاد می‌کند.

هستند یکی از دلایل کاهش پروتئین در گیاهان بررسی شده در پژوهش حاضر است. تنش اکسیداتیو نیز ممکن است یکی از دلایل کاهش مقدار پروتئین‌ها باشد. ROS القاشده با فلزهای سنگین آسیب به نوکلئیک اسیدها را باعث می‌شود (Michalak, 2006) که در نهایت تولید پروتئین‌ها را کاهش می‌دهد. پیش‌تیمار بذر با سدیم هیدروسولفید افزایش محتوای قندهای محلول و پروتئین محلول شد. مشابه نتایج ما کاربرد سدیم هیدروسولفید به صورت خارجی در گیاهان Bermudagrass در تنش شوری و سرما نیز میزان قندهای محلول را افزایش داد (Shi *et al.*, 2013). همچنین گزارش شده است سدیم هیدروسولفید محتوای پروتئین محلول را در گیاه پنبه در تنش سرب افزایش داده است (Bharwana *et al.*, 2014). به نظر می‌رسد سدیم هیدروسولفید با افزایش مقدار کلروفیل، کاهش تنش اکسیداتیو، حفاظت از غشاهای کلروپلاستی و سلولی و حفاظت از ماکرومولکول‌هایی مانند پروتئین‌ها و آنزیم‌ها افزایش میزان قندهای موجود در گیاه ذرت را در تنش سرب موجب می‌شود. به نظر می‌رسد هیدروژن سولفید با کاهش میزان تنش اکسیداتیو در حفاظت از غشاهای اندامک‌های سلولی از جمله ماشین پروتئین‌سازی سلول و ساختار پروتئین‌ها و آنزیم‌ها موفق عمل می‌کند و از اکسیداسیون یا تجزیه آنها می‌کاهد؛ در نتیجه بر محتوای پروتئین اثر مثبت دارد. کاهش تنش اکسیداتیو با کاربرد سدیم هیدروسولفید به صورت خارجی در گیاهان قرار گرفته در تنش در پژوهش‌های بسیاری گزارش شده است (Bharwana *et al.*, 2014; Ali *et al.*, 2014).

تشکیل ریشه جانبی به وضوح در گیاهان پیش‌تیمار شده با سدیم هیدروسولفید در حالت شاهد مشاهده می‌شود. فلزهای سنگین همانند دیگر تنش‌های محیطی در متابولیسم کربوهیدرات‌ها اختلال ایجاد می‌کنند و تغییر در متابولیسم کربوهیدرات‌های محلول مهم‌ترین پاسخ معنی‌دار گیاهان آلوده به فلز سنگین به شمار می‌رود (Li *et al.*, 2007). در پژوهش حاضر محتوای قندهای محلول در پاسخ به تنش سرب کاهش یافت (شکل ۲). Tripathi و Pandey (۲۰۱۱) کاهش محتوای قندهای محلول را در گیاه *Albizia procera* قرار گرفته در تنش کادمیوم، آرسنیک و سرب گزارش کرده‌اند که با نتایج پژوهش حاضر مطابقت داشت. در تغییر محتوای کربوهیدرات‌ها در گیاهان عوامل بسیار گسترده‌ای دخیل هستند و مقدار قندها با فرایندهایی مانند فتوسنتز، تنفس و انتقال ارتباط مستقیم دارد (Rodriguez *et al.*, 2015; Watkinson *et al.*, 2008). کاهش محتوای قند ممکن است به دلیل بازدارندگی فتوسنتز و تحریک تنفس باشد (Li *et al.*, 2007). کاهش رنگیزه‌های فتوسنتزی، القای کلروفیلاز، کاهش CO<sub>2</sub> در دسترس، کاهش فعالیت کربوکسیلازی رویسکو، کاهش فعالیت چرخه کالوین و کاهش پروتئین‌ها و آنزیم‌ها و عناصر ضروری در گیاه همه در کاهش محصولات فتوسنتزی نقش دارند (Sultana *et al.*, 1999). در پژوهش حاضر تنش سرب کاهش محتوای پروتئین محلول را باعث شد (شکل ۳). Padash و همکاران (۲۰۱۶) کاهش محتوای پروتئین کل را در گیاه ریحان در تنش سرب گزارش کردند. کاهش مقدار قندها که اسکلت کربنی لازم برای سنتز پروتئین

biochemical changes in cotton. Environmental Science and Pollution Research 21(1): 717-731.

Breckle, S. W. and Kahle, H. (1992) Effects of toxic heavy metals (Cd, Pb) on growth and mineral nutrition of *Fagus sylvatica*. Vegetado 101: 43-53.

Chaca, M. P., Vigliocco, A., Reinoso, H., Molina, A., Abdala, G., Zirulnik, F. and Pedranzani, H. (2014) Effects of cadmium stress on growth, anatomy and hormone contents in *Glycine max* (L.) Merr. Acta Physiologiae Plantarum 36(10): 2815-2826.

Chen, J., Wang, W., Wu, F., You, C., Liu, T., Dong, X., He, J. and Zheng, H. (2013) Hydrogen sulfide alleviates aluminum toxicity in barley seedlings. Plant and Soil 362: 301-318.

Christou, A., Filippou, P., Manganaris, G. A. and Fotopoulos, V. (2014) Sodium hydrosulfide induces systemic thermotolerance to strawberry plants through transcriptional regulation of heat shock proteins and aquaporin. BMC Plant Biology 14(1): 42-53.

Dubios, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Roberts, P. A. and Smit, F. (1956) Colorometric method for determination of sugars and related substances. Analytical Chemistry 28: 350-356.

Elzbieta, W. and Chwil, M. (2005) Lead-induced histological and ultra-structural changes in the leaves of soybean (*Glycine max* (L.) Mee.). Soil Sciences and Plant Nutrition 51: 203-212.

Fahr, M., Laplaze, L., Bendaou, N., Hoher, V., El Mzibri, M., Bogusz, D. and Smouni, A. (2013) Effect of lead on root growth. Frontiers in Plant Science 4: 1-7.

Fu, P., Wang, W., Hou, L. and Liu, X. (2013) Hydrogen sulfide is involved in the chilling stress response in *Vitis vinifera* L. Acta Societatis Botanicorum Poloniae 82(4): 295-302.

Ghelich, S. and Zarinkamar, F. (2013) Histological and ultrastructure changes in *Medicago sativa* response to lead stress. Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry 2: 20-29.

## جمع بندی

در بررسی حاضر تنش سرب کاهش رشد، محتوای کلروفیل کل، قندهای محلول و پروتئین کل و تغییرات آناتومیک را در گیاه ذرت موجب می شود. پیش تیمار بذر با سدیم هیدروسولفید صدمات ناشی از تنش سرب مانند بازدارندگی رشد را کاهش و محتوای کلروفیل، محتوای قندهای محلول و پروتئین کل را افزایش می دهد. همچنین هیدروژن سولفید احتمالاً با تأثیر مثبت بر وضعیت گیاه در شرایط تنش بهبود شاخص‌های آناتومیک گیاه را در شرایط تنش موجب می شود.

## سپاسگزاری

از خانم مهندس ندا فرناد کارشناس آزمایشگاه بیوشیمی دانشگاه ارومیه، آقای دکتر قاسم محمدی نژاد و خانم دکتر فاطمه ابراهیمی اساتید گروه زراعت دانشگاه شهید باهنر کرمان برای همکاری در پژوهش حاضر سپاسگزاری می شود.

## منابع

Ali, B., Mwamba, T. M., Gill, R. A., Yang, C., Ali, S., Daud, M. K., Wu, Y. and Zhou, W. (2014) Improvement of element uptake and antioxidative defense in *Brassica napus* under lead stress by application of hydrogen sulfide. Plant Growth Regulation 74(3): 261-273.

Bhardwaj, P., Chaturvedi, A. K. and Prasad, P. (2009) Effect of enhanced lead and cadmium in soil on physiological and biochemical attributes of *Phaseolus vulgaris* L. Natural Science 7(8): 63-75.

Bharwana, S. A., Ali, S., Farooq, M. A., Ali, B., Iqbal, N., Abbas, F. and Ahmad, M. S. A. (2014) Hydrogen sulfide ameliorates lead-induced morphological, photosynthetic, oxidative damages and

- 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.
- Jin, Z. and Pei, Y. (2015) Physiological implications of hydrogen sulfide in plants: pleasant exploration behind its unpleasant odour. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2015: 1-6.
- Johnson, F. M. (1998) The genetic effects of environmental lead. *Mutation Research* 410: 123-140.
- Kim, Y. Y., Yang, Y. and Lee, Y. (2002) Pb and Cd uptake in rice roots. *Plant Physiology* 116: 368-372.
- Kosobrukhov, A., Knyazeva, I. and Mudrik, V. (2004) *Plantago major* plants responses to increase content of lead in soil: growth and photosynthesis. *Plant Growth Regulation* 42: 145-151.
- Li, C. X., Feng, S. L., Yun, S., Jiang, L. N., Lu, X. Y. and Hou, X. L. (2007) Effects of arsenic on seed germination and physiological activities of wheat seedlings. *Journal of Environmental Sciences* 19(6): 725-732.
- Li, L., Wang, Y. and Shen, W. (2012) Roles of hydrogen sulfide and nitric oxide in the alleviation of cadmium-induced oxidative damage in alfalfa seedling roots. *Biometals* 25(3): 617-631.
- Li, Y., Wang, N., Zhao, F., Song, X., Yin, Z., Huang, R. and Zhang, C. (2014) Changes in the transcriptomic profiles of maize roots in response to iron-deficiency stress. *Plant Molecular Biology* 85(4-5): 349-363.
- Lichtenthaler, H. K. (1987) Chlorophyll and carotenoids: pigments photosynthetic of bio-membranes. *Methods in Enzymology* 148: 350-382.
- Lisjak, M., Srivastava, N., Teklic, T., Civale, L., Lewandowski, K., Wilson, I., Wood, M. E., Whiteman, M. and Hancock, J. T. (2010) A novel hydrogen sulfide donor causes stomatal opening and reduces nitric oxide accumulation. *Plant Physiology and Biochemistry* 48: 931-935.
- Lowry, O. J., Rosebrough, A. L. and Randall, R. J. (1951) Protein measurement with the phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry* 193: 265-275.
- Michalak, A. (2006) Phenolic compounds and their antioxidant activity in plants growing under heavy metal Stress. *Polish Journal of Environmental Studies* 15: 523-530.
- Mostofa, M. G., Rahman, A., Ansary, M. M. U., Watanabe, A., Fujita, M. and Tran, L. S. P. (2015) Hydrogen sulfide modulates cadmium-induced physiological and biochemical responses to alleviate cadmium toxicity in rice. *Scientific Reports* 5: 1-17.
- Padash, A., Ghanbari, A. and Asgharipour, M. R. (2016) Effect of salicylic acid on concentration of nutrients, protein and antioxidant enzymes of basil under lead stress. *Iranian Journal of Plant Biology* 27: 17-33 (in Persian).
- Pandey, P. and Tripathi, A. K. (2011) Effect of heavy metals on morphological and biochemical characteristics of *Albizia procera* (Roxb.) Benth. seedlings. *International Journal of Environmental Sciences* 1(5): 1009-1018.
- Panou-Filotheou, H. and Bosabalidis, A. M. (2004) Root structural aspects associated with copper toxicity in oregano (*Origanum vulgare* subsp. *hirtum*). *Plant Science* 166(6): 1497-1504.
- Potters, G., Pasternak, T. P., Guisez, Y., Palme, K. J. and Jansen, M. A. K. (2007) Stress-induced morphogenic responses: growing out of trouble? *Plant Science* 12: 98-105.
- Pourrut, B., Shahid, M., Dumat, C., Winterton, P. and Pinelli, E. (2011) Lead uptake, toxicity, and detoxification in plants. in *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology* 213: 113-136.

- Prasad, M. N. V. and Freitas, H. (2003) Metal hyperaccumulation in plants biodiversity prospecting for phytoremediation technology. *Electronic Journal of Biotechnology* 6: 275-321.
- Rodriguez, E., da Conceição Santos, M., Azevedo, R., Correia, C., Moutinho-Pereira, J., de Oliveira, J. M. P. F. and Dias, M. C. (2015) Photosynthesis light-independent reactions are sensitive biomarkers to monitor lead phytotoxicity in a Pb-tolerant *Pisum sativum* cultivar. *Environmental Science and Pollution Research* 22(1): 574-585.
- Sengar, R. S., Gautam, M., Sengar, R. S., Garg, S. K., Sengar, K. and Chaudhary, R. (2008) Lead stress effects on physiobiochemical activities of higher plants. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology* 196: 73-93.
- Shan, C. J., Zhang, S. L., Li, D. F., Zhao, Y. Z., Tian, X. L., Zhao, X. L., Wu, Y. X., Wei, X. Y. and Liu, R. Q. (2011) Effects of exogenous hydrogen sulfide on the ascorbate and glutathione metabolism in wheat seedlings leaves under water stress. *Acta Physiologiae Plantarum* 33(6): 2533-2540.
- Sharma, P. and Dubey, R. S. H. (2005) Lead toxicity in Plants. *Plant Physiology* 17: 35-52.
- Shi, H., Ye, T. and Chan, Z. (2013) Exogenous application of hydrogen sulfide donor sodium hydrosulfide enhanced multiple abiotic stress tolerance in bermudagrass (*Cynodon dactylon* (L). Pers.). *Plant Physiology and Biochemistry* 71: 226-234.
- Sultana, N., Ikeda, T. and Itoh, R. (1999) Effect of NaCl salinity on photosynthesis and dry matter accumulation in developing rice grains. *Environmental and Experimental Botany* 42(3): 211-220.
- Wang, Y. Q., Li, L., Cui, W. T., Xu, S., Shen, W. B. and Wang, R. (2012) Hydrogen sulfide enhances alfalfa (*Medicago sativa*) tolerance against salinity during seed germination by nitric oxide pathway. *Plant and Soil* 351: 107-119.
- Wani, S. H., Kumar, V., Shriram, V. and Sah, S. K. (2016) Phytohormones and their metabolic engineering for abiotic stress tolerance in crop plants. *The Crop Journal* 4(3): 162-176.
- Watkinson, J. I., Hendricks, L., Sioson, A. A., Heath, L. S., Bohnert, H. J. and Grene, R. (2008) Tuber development phenotypes in adapted and acclimated, drought-stressed *Solanum tuberosum* ssp. *andigena* have distinct expression profiles of genes associated with carbon metabolism. *Plant Physiology and Biochemistry* 46: 34-45.
- Zhang, H., Tang, J., Liu, X. P., Wang, Y., Yu, W., Peng, W. Y., Fang, F., Ma, D. F., Wei, Z. J. and Hu, L. Y. (2009) Hydrogen sulfide promotes root organogenesis in *Ipomoea batatas*, *Salix matsudana* and *Glycine max*. *Journal of Integrative Plant Biology* 51(12): 1086-1094.



