

## Lead and nickel effect on some physiological and biochemical characteristics of *Anethum graveolens* L.

Monireh Ranjbar<sup>1\*</sup>, Sheida Esmaili<sup>1</sup>, Ali Asghar Moshtaghi<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Department of Biology, Falavarjan Branch, Islamic Azad University, Isfahan, Iran

### Abstract

Soil contamination with heavy metals is one of the most important environmental problems in many parts of the world. Nickel (Ni) and lead (Pb) are heavy metals that are major contributors to environmental pollution. Since dill (*Anethum graveolens* L.) is cultivated as a leafy vegetable in various places, even in heavy metal-contaminated areas, this study was conducted to investigate the effects of lead and nickel on the activity of dill antioxidant enzymes and antioxidant compounds. In this study, dill seeds were planted into pots containing coco peat and perlite and treated with lead nitrate (0, 500 and 1000  $\mu\text{M}$ ) and nickel nitrate concentrations (0, 100 and 200  $\mu\text{M}$ ) in three replications. After the treatments, the length, fresh weight and dry weight of root and shoot, photosynthetic pigments content, the amount of phenolic compounds, flavonoids, anthocyanins, catalase (CAT), guaiacol peroxidase (GPX), ascorbate peroxidase (APX), superoxide dismutase (SOD) activity and the concentration of Pb and Ni in the shoot and root were evaluated. Use together of lead with nickel on the plant showed that plant length, Chlorophyll a, chlorophyll b, and total chlorophyll decreased respectively to 1.32, 1.02, and 2.03 compared to the control with values of 6.26, 4.54, and 10.32 mg / g under lead and nickel treatments. The anthocyanins, total phenols and flavonoid contents were respectively 4.7, 0.69 and 0.51 mg/g which increased by 23.5, 8.6 and 6.37 compared to the control. CAT, APX and SOD activities increased. Whereas, carotenoid content, fresh and dry weight of roots and shoots, guaiacol peroxidase activity were not affected. Simultaneous use of lead and nickel led to an increase in the amount of lead and nickel in shoot and root. The presence of lead reduces the uptake of nickel by the plant. Accordingly, it seems the plant uses antioxidant compounds such as phenols and some antioxidant enzymes to counter lead and nickel oxidative stress from. On the one hand, the treatment had no effect on fresh and dry weight and also roots and stem length decreased slightly. A number of antioxidant enzymes were activated and the antioxidant compounds increased and the more accumulation of elements in the root, it is possible that even if the plant is not resistant to these stresses, it can grow in the Pb and Ni contaminated soil without serious damage.

**Keywords:** *Anethum graveolens* L., Anthocyanin, Chlorophyll, Catalase, Flavonoids, Lead, Phenol

\* Corresponding Author: ranjbar@iaufala.ac.ir

## تأثیر سرب و نیکل بر برخی ویژگی‌های فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی شوید (*Anethum graveolens* L.)

منیره رنجبر<sup>۱\*</sup>، شیدا اسماعیلی<sup>۱</sup>، علی اصغر مشتاقی<sup>۱</sup>

<sup>۱</sup> گروه زیست‌شناسی، واحد فلاورجان، دانشگاه آزاد اسلامی، اصفهان، ایران

### چکیده

آلودگی خاک با فلزات سنگین یکی از مهم‌ترین مشکلات زیست‌محیطی در بسیاری از نقاط جهان است. نیکل و سرب از جمله فلزات سنگینی هستند که سهم عمده‌ای در آلودگی‌های محیطی دارند. از آنجاکه شوید (*Anethum graveolens*)، نوعی سبزی برگی است که در نقاط مختلف و حتی در مناطق آلوده به فلزات سنگین کشت می‌شود، پژوهش حاضر به منظور بررسی آثار سرب و نیکل بر فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان و ترکیبات آنتی‌اکسیدانی گیاه شوید انجام شد. در پژوهش حاضر، بذره‌های گیاه شوید درون گلدان حاوی کوکوپیت و پرلیت کاشته شدند و در معرض تیمارهای نیترات سرب (صفر، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میکرومولار) همراه با غلظت‌های نیترات نیکل (صفر، ۱۰۰ و ۲۰۰ میکرومولار) در سه تکرار قرار گرفتند. پس از اعمال تیمارها، سنجش طول، وزن تر و وزن خشک ریشه و اندام‌های هوایی، رنگیزه‌های فتوسنتزی، میزان فنل کل، فلاونوئید، آنتوسیانین، فعالیت آنزیم کاتالاز و گایاکول پراکسیداز، آسکوربات پراکسیداز، سوپراکسید دیسموتاز و میزان عناصر سرب و نیکل در بخش هوایی و ریشه گیاه انجام شد. استفادهٔ توأم از سرب و نیکل روی گیاه شوید نشان داد طول گیاه، میزان کلروفیل a، کلروفیل b و کلروفیل کل با افزایش سرب و نیکل به ترتیب تا ۱/۳۲، ۱/۰۲ و ۲/۰۳ در مقایسه با شاهد با مقادیر ۶/۲۶، ۴/۵۴ و ۱۰/۳۲ میلی گرم بر گرم کاهش می‌یابد. میزان آنتوسیانین، فنل کل و فلاونوئید نیز به ترتیب به ۴/۷، ۰/۶۹ و ۰/۵۱ میلی گرم بر گرم رسید که ۲۳/۵، ۸/۶ و ۶/۳۷ برابر نسبت به شاهد افزایش داشت. فعالیت آنزیم‌های کاتالاز، آسکوربات پراکسیداز و سوپراکسید دیسموتاز افزایش داشت. تیمار توأم این دو عنصر روی میزان کاروتنوئید، وزن تر و خشک ریشه و اندام هوایی، فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز تأثیری نداشت. استفادهٔ هم‌زمان از سرب و نیکل به افزایش میزان عناصر سرب و نیکل در بخش هوایی و ریشه منجر شد. وجود سرب در محیط از جذب نیکل کاست؛ بر اساس این، گیاه برای مقابله با تنش اکسیداتیو حاصل از فلزات سرب و نیکل از ترکیبات آنتی‌اکسیدانی مانند فنل‌ها و برخی آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی بهره می‌برد. با توجه به تأثیر نداشتن تیمار بر وزن تر و خشک و همچنین کاهش اندک طول اندام‌ها، فعال شدن تعدادی از آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و افزایش ترکیبات آنتی‌اکسیدانی بررسی شده از یک سو و تجمع بیشتر عناصر در ریشه از سوی دیگر، می‌توان احتمال داد حتی اگر گیاه نسبت به این تنش‌ها مقاوم نباشد، می‌تواند بدون آسیب‌های جدی در خاک‌های آلوده به سرب و نیکل رشد کند.

\* نگارندهٔ مسئول: نشانی پست الکترونیک: ranjbar@iaufala.ac.ir، شمارهٔ تماس: ۰۳۱۳۶۵۰۰۳۹۶

### واژه‌های کلیدی: آنتوسیانین، سرب، شوید، کلروفیل، کاتالاز، فنل، نیکل

#### مقدمه

سمیت این عنصر شامل کاهش جوانه‌زنی دانه، کاهش رشد ریشه، القای کلروزیس برگ‌گی و کاهش زیست‌توده مشاهده شده‌اند و به کاهش زیست‌توده گندم و کلم اشاره شده است (Drazkiewicz, 1994). احتمال داده می‌شود کاهش زیست‌توده ناشی از تغییر فرایندهای متابولیکی القاشده از طریق فلز نیکل و کاهش محتوای آب گیاه باشد (Chen *et al.*, 2009). در غلظت‌های زیاد فلزات سنگین، میزان پراکسیداسیون و تجزیه لیپیدهای غشایی به‌ویژه غشای کلروپلاستی تحریک می‌شود (Gill and Tuteja, 2010). سرب یکی دیگر از فلزات سنگین و از مهم‌ترین آلاینده‌های محیط‌زیست است (Islam *et al.*, 2007). این فلز بر فعالیت ریزجانداران خاک تأثیر می‌گذارد و سبب ازدست‌رفتن حاصلخیزی خاک، کاهش شاخص‌های فیزیولوژیک و رشد گیاهان می‌شود و در نهایت، کاهش عملکرد آنها را در پی دارد.

گیاهان برای مقابله با تنش اکسیداتیو دارای سیستم آنتی‌اکسیدانی هستند که از آنها در برابر گونه‌های فعال اکسیژن و رادیکال‌های آزاد محافظت می‌کند و آسیب‌های ناشی از فعالیت عوامل اکسیداتیو را به حداقل می‌رساند. سیستم‌های آنتی‌اکسیدانی به دو گروه آنزیمی و غیر آنزیمی تقسیم می‌شوند (Esrefoglu, 2012). آنزیم‌هایی همچون گلوکاتایون پراکسیداز (GPX) و کاتالاز (CAT) مهم‌ترین عوامل آنتی‌اکسیدانی و ویتامین E (a توکوفرول)، کاروتنوئید، فنل و فلاونوئید مهم‌ترین ترکیبات آنتی‌اکسیدانی غیر آنزیمی درون سلول‌ها هستند (Arora *et al.*, 2002).

آلودگی خاک با فلزات سنگین یکی از مهم‌ترین مشکلات زیست‌محیطی در بسیاری از نقاط جهان است (Nisi *et al.*, 2014)؛ نیکل و سرب از جمله فلزات سنگینی هستند که سهم عمده‌ای در آلودگی‌های محیطی دارند و هر دو سبب تنش اکسیداتیو می‌شوند (Amini and Amirjani, 2013). نیکل، فلزی ضروری برای گیاهان محسوب می‌شود و نقش مهمی در متابولیسم گیاهان ایفا می‌کند؛ باوجود این، افزایش میزان آن در محیط رشد سبب آسیب به گیاه می‌شود. غلظت‌های زیاد نیکل برای بیشتر گونه‌های گیاهی سمی است و بسیاری از فرایندهای فیزیولوژیک را تحت تأثیر قرار می‌دهد (Pandey and Sharma, 2002). کاهش تعداد گل‌ها، میوه‌ها، کمبود برخی عناصر، کاهش محتوای کلروفیل، تخریب غشای تیلاکوئید، تأخیر در جوانه‌زنی و کاهش هدایت روزنه‌ای (Chen *et al.*, 2009) از جمله آثار نیکل بر گیاهان هستند. مطالعه‌ها نشان می‌دهند نیکل مازاد می‌تواند جوانه‌زنی دانه و رشد گیاه را مهار کند، موجب تخریب کلروفیل شود و در فعالیت سیستم نوری مداخله کند (Ali *et al.*, 2009). غلظت زیاد نیکل در سلول‌ها سبب مهار تقسیم سلولی در دایره محیطی می‌شود و در نتیجه، ایجاد ریشه‌های فرعی را ممانعت می‌کند (Sharma and Madhulika, 2005). در سطح سلولی، نیکل تولید گونه‌های اکسیژن فعال را القا می‌کند و از این طریق موجب آسیب اکسیداتیو به لیپیدها، پروتئین‌ها و نوکلئیک‌اسیدهای سلول‌ها می‌شود (Gardea-Torresdey *et al.*, 2004). در پژوهش‌های انجام‌شده در زمینه گیاهان مختلف، نشانه‌های

از این رو، بررسی پاسخ گیاه در حالت آلودگی به دو فلز سرب و نیکل اهمیت دارد و باتوجه به اینکه تنها بخش هوایی این گیاه مصرف خوراکی دارد، تعیین محل تجمع این عناصر ضروری است. باتوجه به مطالب یادشده، در پژوهش حاضر به مطالعه تأثیر دو فلز سرب و نیکل بر برخی از ویژگی‌های رشدی، شیوه فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی، تغییر محتوای رنگیزه و تعدادی از متابولیت‌های ثانویه و میزان این دو فلز در ریشه و بخش هوایی پرداخته شد.

### مواد و روش‌ها

آزمایش به شکل فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با دو عامل سرب در سه سطح صفر، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میکرومولار و نیکل در سه سطح صفر، ۱۰۰ و ۲۰۰ میکرومولار و در سه تکرار انجام شد. بذر گیاه شوید (*Anethum graveolens* L.) از شرکت پاکان بذر اصفهان تهیه و درون گلدان‌هایی با قطر ۱۵ سانتی‌متر و حاوی پرلیت و کوکوپیت کشت شد. تعداد بذرهای کشت شده، ۳۰ عدد بود که پس از رشد گیاه، حدود نیمی از آنها حذف شدند. پیش از کشت، درصد جوانه‌زنی بذرها ۸۰/۲ و سرعت جوانه‌زنی در روز ۰/۰۸۳ تعیین شد. گلدان‌ها هر روز با آب مقطر آبیاری شدند. یک هفته پس از کشت بذرها و با مشاهده جوانه‌ها، روزانه یک نوبت محلول‌پاشی هوگلند علاوه بر آبیاری با آب مقطر انجام شد. پس از گذشت دو هفته از زمان کشت بذرها و رسیدن گیاه به مرحله دوبرگچه‌ای، تیمار به مدت چهار هفته به شکل یک روز در میان اعمال شد. به منظور جلوگیری از انباشت فلزات در گلدان‌ها، زیرگلدانی‌ها ۵ تا ۶

شوید (*Anethum graveolens* L.) گیاهی است که در نواحی معتدل رشد می‌کند و منشأ آن، نواحی شرق مدیترانه گزارش شده است. این گیاه در ایران، هند، قفقاز، اتیوپی، مصر و اروپای جنوبی به شکل خودرو رشد می‌کند و انتشار جغرافیایی آن در ایران به طور طبیعی و در نواحی مختلف مانند تبریز، اصفهان، خراسان، یزد و فارس گزارش شده است (Zargari, 1997). بر اساس یافته‌های مطالعه‌ای در جنوب پالایشگاه تهران، میزان تجمع سرب و نیکل در گیاه شوید کشت شده به ترتیب ۳۴/۸۱ و ۵/۲۶ میلی‌گرم در کیلوگرم است (Kazemzadeh *et al.*, 2012). میانگین غلظت نیکل و سرب در سبزی جعفری مزارع شهر همدان به ترتیب ۲/۵۶ و ۱۶/۶۵ میلی‌گرم در کیلوگرم و میانگین غلظت این فلزات در خاک به ترتیب ۲۳/۵۱ و ۲۰/۸۵ میلی‌گرم در کیلوگرم گزارش شده است (Cheraghi and Ghobadi, 2013). بر اساس مطالعه انجام شده در مازندران و با استفاده از نمونه خاک عرصه‌های طبیعی، غلظت زمینه طبیعی نیکل و سرب به ترتیب ۷/۴۵ و ۲/۳۴ میلی‌گرم در کیلوگرم برآورد شده است (Azimzadeh and Khademi, 2013).

آلودگی ناشی از فلزات سنگین از جمله نیکل و سرب و خطرهای ناشی از این آلودگی برای گیاهان و انسان‌ها بر کسی پوشیده نیست؛ از سوی دیگر، گیاه شوید یکی از سبزیجات برگی خوراکی و دارویی است که در غذاهای مختلف استفاده می‌شود و بنابراین، در مناطق مختلف کشت می‌شود. بسیاری از مزارع کنار مراکز صنعتی قرار دارند یا با فاضلاب‌ها آلوده می‌شوند؛

روش Chance و Maehly (۱۹۹۵) برای سنجش فعالیت آنزیم کاتالاز استفاده شد؛ مطابق این روش، جذب نوری با دستگاه اسپکتروفتومتری در طول موج ۲۴۰ نانومتر طی مدت ۳۰ ثانیه تعیین شد و مقدار ۲۰ میکرولیتر بافر فسفات ۲۰ میلی‌مولار با اسیدیته ۷ و مقدار ۲۰ میکرولیتر هیدروژن پراکسید ۳۰ درصد (حجمی-حجمی) برای پذیرندهٔ الکترون استفاده شد. میزان فعالیت کاتالاز بر حسب واحد در میلی‌گرم پروتئین بیان شد.

فعالیت آنزیم سوپراکسیددیسموتاز با سنجش مهار احیای نوری تترازولیوم در طول موج ۵۶۰ نانومتر سنجیده شد. مخلوط واکنش نمونه‌ها شامل بافر فسفات ۵۰ میلی‌مولار با اسیدیته ۷، تترازولیوم ۰/۰۷۵ میکرومولار، EDTA-Na ۰/۱ میلی‌مولار، ربیوفلاوین ۷۵ میکرومولار، متیونین ۱۳ میلی‌مولار و ۵۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی بود. به منظور سنجش فعالیت این آنزیم، نمونهٔ شاهد علاوه بر بلانک استفاده و میزان فعالیت آنزیم در نمونه‌ها نسبت به بلانک سنجیده شد. واکنش در نمونه‌های تهیه‌شده در دمای ۲۵ درجهٔ سانتی‌گراد و با روشن کردن لامپ فلورسنت آغاز و پس از ۸ دقیقه و با خاموش کردن لامپ متوقف شد. فعالیت آنزیم بر اساس واحد آنزیمی به ازای هر میلی‌گرم پروتئین برای تمام نمونه‌ها محاسبه شد (Daneshmand, 2014).

مخلوط واکنش برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز شامل بافر فسفات پتاسیم ۵۰ میلی‌مولار با اسیدیته ۷، آسکوربیک اسید ۰/۵ میلی‌مولار، آب اکسیژنه ۰/۱۵ میلی‌مولار، EDTA ۰/۱ میلی‌مولار و ۵۰ میکرولیتر عصارهٔ آنزیمی

ساعت پس از تیمار تخلیه و محتویات گلدان با آب مقطر شستشو می‌شدند. پس از پایان تیماردهی (شش هفته از زمان کشت بذرها)، گیاهان برای ارزیابی میزان رنگیزه‌های کلروفیل، کاروتنوئید، آنتوسیانین، فعالیت آنزیم‌های پراکسیداز و کاتالاز و میزان فنل کل و فلاونوئید برداشت شدند.

**اندازه‌گیری رنگیزه‌های فتوسنتزی:** تعیین محتوای کلروفیل a، b و کل و کاروتنوئیدها در برگ‌های گیاه تازه به روش Lichtenthaler (۱۹۹۴) انجام شد؛ مطابق این روش، ۰/۵ گرم از برگ‌های گیاه با استون ۸۰ درصد (حجمی-حجمی) ساییده و سپس حجم محلول با استون ۸۰ درصد به ۵۰ میلی‌لیتر رسانده شد. مقدار کلروفیل a، b و کل و مقدار کاروتنوئید از رابطه‌های زیر بر حسب میلی‌گرم بر گرم وزن تر محاسبه شد (Saboora and Behjati, 2017).

$$\text{رابطهٔ ۱} \quad C_a = 12.25(A_{663.2}) - 2.79(A_{646.8})$$

$$\text{رابطهٔ ۲} \quad C_b = 21.50(A_{646.8}) - 5.1(A_{663.2})$$

$$\text{رابطهٔ ۳} \quad C_{\text{total}} = C_a + C_b$$

$$\text{رابطهٔ ۴} \quad C_c = (1000(A_{470}) - 1.82C_a - 85.02C_b) / 198$$

**سنجش فعالیت آنزیم‌های کاتالاز، سوپراکسیددیسموتاز و پراکسیداز:** به منظور استخراج آنزیم‌ها از روش Mac-Adam و همکاران (۱۹۹۲) استفاده شد. اندام هوایی تازه گیاهان در هاون چینی دارای ازت مایع خرد و به شکل پودر درآمد؛ سپس ۰/۵ میلی‌لیتر بافر فسفات سدیم با اسیدیته ۶ به آن اضافه و با سرعت ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. به منظور اندازه‌گیری فعالیت آنزیم‌ها، نمونه‌هایی از محلول رویی برداشت شدند.

نمونه به مدت ۳۰ دقیقه در دمای آزمایشگاه نگهداری شد. میزان جذب نوری نمونه در ۷۶۵ نانومتر تعیین و برای محاسبه محتوای فنل کل از معادله خط مربوط به نمودار استاندارد گالیک اسید (رابطه ۶) استفاده شد. مقدار فنل کل بر حسب میلی گرم بر گرم وزن تر گیاه تعیین شد (singh *et al.*, 2002).

$$Y=0.05X + 0.0912 \quad \text{رابطه ۶}$$

سنجش فلاونوئید به روش Chang و همکاران (۲۰۰۲) انجام شد؛ به این ترتیب که ۱ میلی لیتر محلول کلرید آلومینیوم ۲ درصد (وزنی-حجمی) و ۶ میلی لیتر محلول استات پتاسیم ۵ درصد (وزنی-حجمی) به عصاره متانولی افزوده شدند و نمونه به مدت ۴۰ دقیقه روی شیکر قرار داده شد و سپس جذب محلول‌ها در طول موج ۴۱۵ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر خوانده شد. به منظور محاسبه محتوای فلاونوئید از معادله خط مربوط به نمودار استاندارد کوئرستین (رابطه ۷) استفاده و مقدار فلاونوئید بر حسب میلی گرم بر گرم وزن تر گیاه تعیین شد.

$$Y=0.0031X + 0.0159 \quad \text{رابطه ۷}$$

تعیین مقدار آنتوسیانین بر اساس روش Maleki و Ehsanpour (۲۰۱۸) انجام شد. مقدار ۰/۱ گرم برگ تازه گیاه با ۱۰ میلی لیتر متانول اسیدی به نسبت ۹۹ به ۱ ساییده و عصاره برای ۲۴ ساعت در تاریکی قرار داده شد؛ سپس عصاره به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۴۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ و جذب محلول رویی در طول موج ۵۳۰ نانومتر خوانده شد. میزان آنتوسیانین از رابطه ۸ به دست آمد.

$$A= \epsilon bc \quad \text{رابطه ۸}$$

بود؛ به دنبال اکسید شدن آسکوربیک اسید با آغاز واکنش آنزیمی، کاهش جذب در ۲۹۰ نانومتر پس از دو دقیقه از آغاز واکنش نسبت به زمان آغاز واکنش محاسبه شد (Esfandiari and Rostami, 2016).

به منظور سنجش فعالیت آنزیم پراکسیداز به روش Mac-Adam و همکاران (۱۹۹۲)، جذب نوری در طول موج ۴۷۵ نانومتر در مدت ۶۰ ثانیه با دستگاه اسپکتروفتومتری خوانده شد. در این روش، بافر فسفات سدیم ۲۰ میلی مولار با اسیدیته ۶ و گایاکول ۲۰۰ میلی مولار برای الکترون دهنده و ۱۰ میکرو لیتر هیدروژن پراکسید ۳۰ درصد (حجمی-حجمی) برای پذیرنده (پیش ماده) استفاده شد و نتایج بر حسب واحد در میلی گرم پروتئین گزارش شدند.

استخراج پروتئین‌های محلول کل به کمک بافر استخراج با ترکیب بافر فسفات پتاسیم ۱۰۰ میلی مولار با اسیدیته ۷، اتیلن دی آمین تترا استیک اسید (EDTA) ۱ میلی مولار، پتاسیم کلرید ۱۰ میلی مولار، منیزیم سولفات ۱ میلی مولار، گلیسرول ۱۰ درصد، پلی وینیل پلی پیرولیدون ۱ درصد، تریتون و بتا ۲- مرکاپتواتانول ۵۰ میلی مولار انجام شد. میزان پروتئین با نمودار استاندارد آلومین به روش Bradford تعیین شد (Azizian-Shermeh, 2018).

**سنجش فنل کل، فلاونوئید و آنتوسیانین:** عصاره اندام هوایی تازه گیاه با متانول ۸۰ درصد (حجمی-حجمی) تهیه و برای سنجش ترکیبات فنلی و فلاونوئید استفاده شد. کربنات سدیم ۷ درصد (وزنی-حجمی) و معرف فولین ۱۰ درصد (حجمی-حجمی) به عصاره متانولی اضافه شدند و

آنها با آب مقطر کاملاً خالص به ۱۰ میلی‌لیتر رسانده شد. مقدار عناصر سرب و نیکل در ریشه و بخش هوایی با دستگاه طیف‌سنجی جذب اتمی مدل AAnalyst 100 perkin elmer اندازه‌گیری شد.

**تجزیه و تحلیل آماری:** آزمایش به شکل فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی و در سه تکرار طراحی شد. نتایج با نرم‌افزار آماری SPSS19 تجزیه و تحلیل شدند. آنالیز واریانس به روش ANOVA و مقایسهٔ میانگین‌ها با آزمون دانکن انجام شد.

### نتایج

نتایج تحلیل واریانس داده‌های مربوط به شاخص‌های اندازه‌گیری شده در جدول‌های ۱، ۲ و ۳ دیده می‌شوند.

**تغییرات طول ریشه و بخش هوایی گیاه:** بر اساس جدول آنالیز واریانس ۳، تأثیر تیمارهای استفاده‌شده روی طول ریشه و بخش هوایی شوید در سطح ۵ درصد معنادار بوده است. مطابق شکل ۱، طول ریشه در تیمارهای نیکل ۱۰۰ و ۲۰۰ میکرومولار، سرب ۵۰۰ میکرومولار همراه با نیکل ۱۰۰ میکرومولار و سرب ۱۰۰۰ میکرومولار همراه با نیکل ۱۰۰ و ۲۰۰ میکرومولار نسبت به شاهد کاهش یافته و این کاهش حدود ۸ تا ۴۹ درصد بوده است. شکل ۲ نشان می‌دهد تفاوت چندانی در طول بخش هوایی (۶ تا ۱۷ درصد) گیاهان وجود ندارد و افزایش طول در تیمار سرب ۱۰۰۰ میکرومولار بدون نیکل و سرب ۱۰۰۰ میکرومولار همراه با نیکل ۲۰۰ میکرومولار نسبت به شاهد رخ داده است.

**اندازه‌گیری عناصر سرب و نیکل:** به منظور اندازه‌گیری مقدار عناصر در گیاهان از روش Baker و همکاران (۲۰۰۰) استفاده شد. در ریشه، ابتدا زدودن عناصر از سطح آن انجام شد؛ به این منظور، ریشه‌ها بلافاصله پس از برداشت و جداکردن قطعه‌های جامد متصل به آنها به مدت ۱۰ دقیقه در محلول ۵ میلی‌مولار  $\text{CaSO}_4$  و ۱ میلی‌مولار MES-KOH با اسیدیتهٔ ۵/۷ که روی یخ سرد شده بود، قرار گرفتند و هر چند دقیقه به آرامی هم زده شدند و سپس با آب مقطر شستشو شدند. پس از برداشت و خشک کردن سطحی ریشه‌ها با دستمال کاغذی، آنها به مدت ۲۴ ساعت در آون با دمای ۷۰ درجهٔ سانتی‌گراد خشک و برای اندازه‌گیری غلظت عناصر، هضم اسیدی شدند. بخش‌های هوایی نیز پس از برداشت، چند بار با آب مقطر دوبار تقطیر شستشو، مشابه ریشه‌ها خشک و به منظور اندازه‌گیری غلظت عناصر در آنها، هضم اسیدی شدند. پس از توزین نمونه‌های خشک‌شده، ۳/۵ میلی‌لیتر نیتریک‌اسید (۶۰ درصد (حجمی-حجمی) به نمونه‌ها اضافه شد (در لوله‌های شیشه‌ای شستشو شده با کلریدریک‌اسید ۲ درصد) و نمونه‌ها به مدت ۱۲ ساعت در شرایط آزمایشگاه قرار داده شدند؛ سپس به مدت ۳ تا ۴ ساعت در دمای ۹۰ درجهٔ سانتی‌گراد حرارت داده شدند تا تمام بافت‌ها کاملاً متلاشی شوند؛ پس از سرد شدن، ۱ میلی‌لیتر  $\text{H}_2\text{O}_2$  ۳۰ درصد (حجمی-حجمی) به نمونه‌ها اضافه شد و به مدت ۲۰ دقیقه یا تا زمانی که محلول کاملاً شفاف به دست آید، در دمای ۹۰ درجهٔ سانتی‌گراد قرار داده شدند. نمونه‌ها پس از سرد شدن صاف شدند و حجم

جدول ۱- آنالیز واریانس اثر تیمار سرب و نیکل روی کلروفیل a، b و کل، کاروتنوئید، آنتوسیانین، فعالیت کاتالاز و گایاکول پراکسیداز شوید

منابع تغییر	درجه آزادی	کلروفیل a (میلی گرم بر گرم وزن تر)	کلروفیل b (میلی گرم بر گرم وزن تر)	کلروفیل کل (میلی گرم بر گرم وزن تر)	کاروتنوئید (میلی گرم بر گرم وزن تر)	آنتوسیانین (میکرومول بر گرم وزن تر)	فعالیت کاتالاز (واحد آنزیم بر میلی گرم پروتئین)	فعالیت گایاکول پراکسیداز (واحد آنزیم بر میلی گرم پروتئین)
سرب	۲	۱۰/۷۹۸*	۹/۲۲۰*	۳۹/۸۳۹*	۶۵۷/۳۵۰ ns	۰/۰۰۴**	۰/۰۰۱**	۰/۰۰۱ ns
نیکل	۲	۱۳/۵۳۴*	۷/۱۶۰*	۴۰/۳۸۱*	۱۷۹/۳۸۴ ns	۰/۰۱۰**	۰/۰۰۱**	۰/۰۰۲ ns
سرب * نیکل	۴	۱/۴۰۴*	۰/۵۰۶*	۲/۶۵۳**	۲۹۳/۷۵۰ ns	۰/۰۰۶**	۰/۰۰۱**	۰/۰۰۱ ns
ضرب تغییرات		۵/۰۶	۱/۷۶	۱۲/۳۷	۲/۳۵	۴/۰۵	۹/۰۱	۰/۰۰

\*\* و \* به ترتیب وجود تفاوت معنادار در سطح ۰/۰۱ و ۰/۰۵ و ns وجود داشتن تفاوت معنادار را نشان می‌دهند.

جدول ۲- آنالیز واریانس اثر تیمار غلظت‌های سرب و نیکل روی فنل کل، فلاونوئید، میزان عناصر سرب و نیکل شوید

منابع تغییر	درجه آزادی	فنل (میلی گرم بر گرم وزن تر)	فلاونوئید (میلی گرم بر گرم وزن تر)	میزان نیکل در بخش هوایی (میلی گرم بر کیلوگرم)	میزان سرب در بخش هوایی (میلی گرم بر کیلوگرم)	میزان نیکل در ریشه (میلی گرم بر کیلوگرم)	میزان سرب در ریشه (میلی گرم بر کیلوگرم)
سرب	۲	۱۳۷۷/۸۴۳*	۸۶/۹۶۴**	۳۹۲۷/۱۶۵*	۲۷۴۲/۱۷۲*	۳۵۹۹/۱۵۱*	۴۲۵۱/۴۲۷*
نیکل	۲	۵۲۷۹/۴۸۳*	۵۰۹/۵۱۲**	۱۴۳۹/۸۱۴*	۱۳۳۴/۱۸۴*	۸۳۶۷/۱۲۵*	۶۳۹۵/۴۴۹*
سرب * نیکل	۴	۷۴۰/۶۸۳**	۵۲۹/۱۴۴**	۱۰۷۵/۹۶۵*	۲۲۰۱/۱۶۵*	۱۱۰۰/۴۷۵*	۵۲۱۷/۶۳۰*
ضرب تغییرات		۶/۵۹	۷/۴۳	۲/۴۷	۲/۳۹	۳/۵۳	۳/۰۹

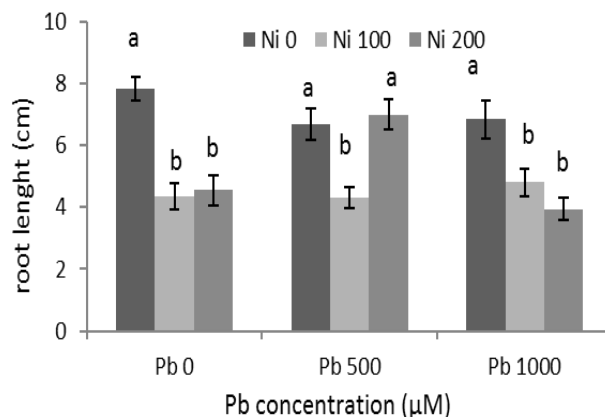
\*\* و \* به ترتیب وجود تفاوت معنادار در سطح ۰/۰۱ و ۰/۰۵ و ns وجود داشتن تفاوت معنادار را نشان می‌دهند.

جدول ۳- آنالیز واریانس اثر تیمار سرب و نیکل روی طول ریشه و بخش هوایی، وزن تر و خشک ریشه و بخش هوایی، فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز و سوپراکسید دیسموتاز شوید

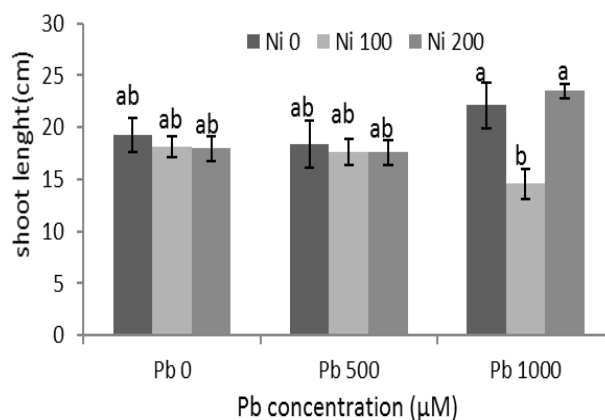
منابع تغییر	درجه آزادی	طول ریشه (سانتی متر)	طول بخش هوایی (سانتی متر)	وزن تر ریشه (گرم)	وزن تر بخش هوایی (گرم)	وزن خشک ریشه (گرم)	وزن خشک بخش هوایی (گرم)	آسکوربات پراکسیداز (واحد آنزیم بر ...)	سوپراکسید دیسموتاز (واحد آنزیم بر ...)
سرب	۲	۱۷/۰۰۹*	۱۸/۳۴*	۱۹/۳۳۹ ns	۲۳/۴۵۰ ns	۱۴/۴۰۴ ns	۳۲/۸۰۱ ns	۱/۲۳۱**	۳/۸۷۱**
نیکل	۲	۱۵/۳۴*	۲۴/۵۶۶*	۵۱/۳۲۴ ns	۵۲/۱۲۴ ns	۲۶/۷۶۰ ns	۲۷/۷۴۱ ns	۳/۵۰۲**	۶/۶۳**
سرب * نیکل	۴	۵/۶۶*	۹/۳۴۶*	۱/۷۶ ns	۶/۸۵۰ ns	۵/۲۱ ns	۶/۴۰۱ ns	۱/۵۴۱**	۲/۷۵۴**
ضرب تغییرات		۶/۰۶	۵/۷۶	۰/۱۷	۰/۳۸	۰/۰۵	۰/۰۱	۸/۶۵	۹/۸۶

\*\* و \* به ترتیب وجود تفاوت معنادار در سطح ۰/۰۱ و ۰/۰۵ و ns وجود داشتن تفاوت معنادار را نشان می‌دهند.





شکل ۱- مقایسهٔ برهم‌کنش سرب و نیکل روی طول ریشهٔ *Anethum graveolens* L. مقادیر میانگین سه تکرار  $\pm$  انحراف معیار هستند و حرف‌های یکسان وجودنداشتن اختلاف معنادار با استفاده از آزمون دانکن را نشان می‌دهند.



شکل ۲- مقایسهٔ برهم‌کنش سرب و نیکل روی طول بخش هوایی *Anethum graveolens* L. مقادیر میانگین سه تکرار  $\pm$  انحراف معیار هستند و حرف‌های یکسان وجودنداشتن اختلاف معنادار با استفاده از آزمون دانکن را نشان می‌دهند.

غلظت ۱۰۰۰ میکرومولار سرب همراه با ۲۰۰ میکرومولار نیکل رخ داده است. شکل نشان می‌دهد در سطح صفر و ۵۰۰ میکرومولار سرب، افزودن نیکل به محیط رشد در دو غلظت ۱۰۰ و ۲۰۰ میکرومولار سبب کاهش معنادار مقدار کلروفیل a شده است؛ باوجوداین، افزودن ۱۰۰ میکرومولار نیکل در سطح ۱۰۰۰ میکرومولار سرب سبب تفاوت معنادار نسبت به تیمار بدون نیکل نشده، اما کاهش در نیکل ۲۰۰ میکرومولار نسبت به سرب ۱۰۰۰ میکرومولار بدون نیکل معنادار بوده است.

### تغییرات وزن تر و خشک ریشه و بخش هوایی

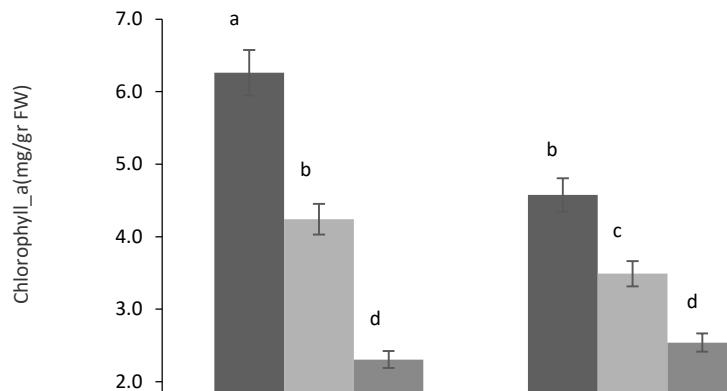
گیاه: بر اساس جدول آنالیز واریانس ۳، تفاوت وزن تر ریشه و بخش هوایی و وزن خشک آنها از نظر آماری معنادار نیست.

### تغییر رنگیزه‌های فتوسنتزی گیاه: بر اساس جدول

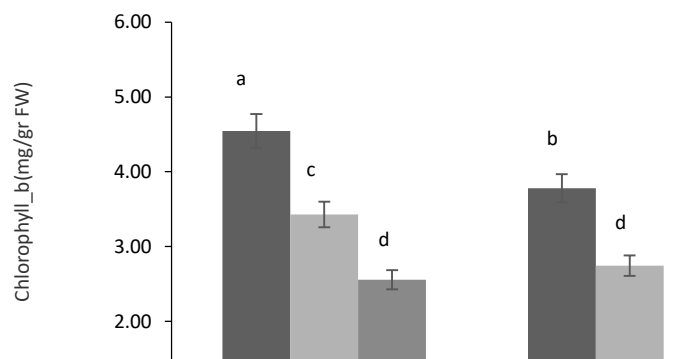
آنالیز واریانس ۱، تأثیر تیمارها بر محتوای کلروفیل a و کلروفیل b گیاهان معنادار بوده است ( $P < 0.05$ ). با توجه به شکل ۳، استفاده از تیمار توأم سرب و نیکل سبب کاهش (۱۷ تا ۵۴ درصد) محتوای کلروفیل a شده است؛ به طوری که کاهش درخور توجهی در

به طوری که محتوای کلروفیل کل گیاه در اثر غلظت‌های مختلف نیکل و سرب و با افزایش غلظت، کاهش یافته و کمترین محتوا به تیمار سرب ۱۰۰۰ میکرومولار و نیکل ۲۰۰ میکرومولار تعلق یافته است (شکل ۵). روند کاهش کلروفیل کل مشابه با کلروفیل b است. بر اساس جدول آنالیز واریانس ۱، تیمار غلظت‌های سرب و سرب همراه با نیکل روی مقدار کاروتنوئید معنادار نبوده است.

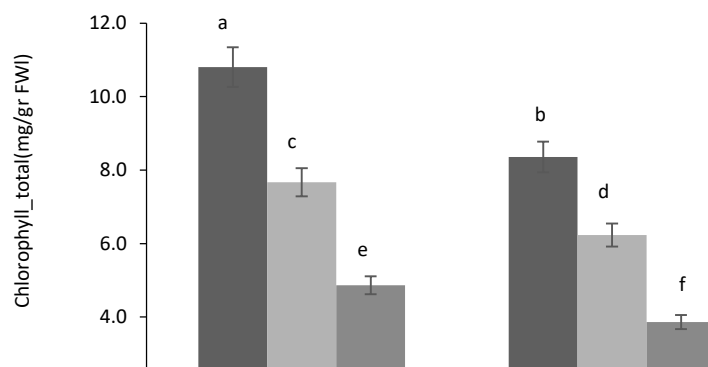
شکل ۴ نشان می‌دهد محتوای کلروفیل b گیاه شوید در تیمار ۲۰۰ میکرومولار نیکل همراه با غلظت‌های ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میکرومولار سرب کاهش (۲۲ تا ۵۶ درصد) یافته و در هر سه غلظت سرب، افزودن نیکل با دو غلظت سبب کاهش میزان کلروفیل b شده است. فلزات سنگین سنتز کلروفیل را مختل می‌کنند و سبب کاهش محتوای آن در گیاه می‌شوند. مطابق شکل، تأثیر نیکل و سرب روی محتوای کلروفیل کل معنادار بوده است ( $P < 0.01$ );



شکل ۳- مقایسه برهم کنش سرب و نیکل روی کلروفیل a گیاه *Anethum graveolens* L. مقادیر میانگین سه تکرار  $\pm$  انحراف معیار هستند و حرف‌های یکسان وجودنداشتن اختلاف معنادار با استفاده از آزمون دانکن را نشان می‌دهند.



شکل ۴- مقایسه برهم کنش سرب و نیکل روی کلروفیل b گیاه *Anethum graveolens* L. مقادیر میانگین سه تکرار  $\pm$  انحراف معیار هستند و حرف‌های یکسان وجودنداشتن اختلاف معنادار با استفاده از آزمون دانکن را نشان می‌دهند.



شکل ۵- مقایسهٔ برهم‌کنش سرب و نیکل روی کلروفیل کل *Anethum graveolens* L. مقادیر میانگین سه تکرار  $\pm$  انحراف معیار هستند و حرف‌های یکسان وجودنداشتن اختلاف معنادار با استفاده از آزمون دانکن را نشان می‌دهند.

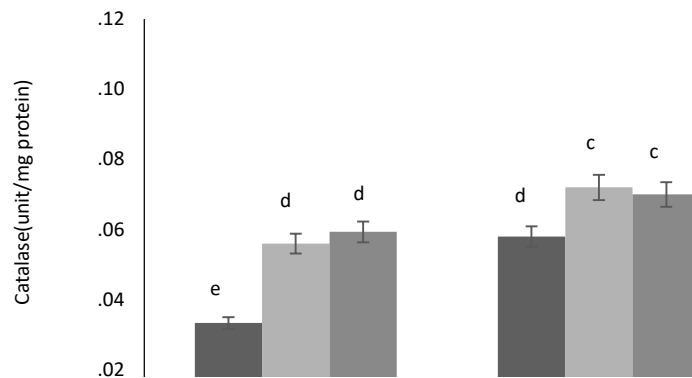
بر اساس جدول ۳، تفاوت فعالیت آنزیم سوپراکسیددیسموتاز شوید در معرض تیمار نیکل و سرب از نظر آماری معنادار بوده است ( $P < 0.01$ ). بر اساس شکل ۷، بیشترین فعالیت این آنزیم در تیمار سرب ۱۰۰۰ میکرومولار همراه با ۲۰۰ میکرومولار نیکل رخ داده است. مطابق شکل، فعالیت این آنزیم در گیاهان شاهد بسیار اندک و در گیاهان تیمارشده با دو غلظت نیکل بدون حضور سرب بیشتر بوده است. در هر سه سطح سرب، افزودن نیکل در دو غلظت سبب افزایش فعالیت آنزیم شده است. در دو سطح صفر سرب، اختلاف فعالیت آنزیم در دو سطح نیکل معنادار نبوده، ولی در سطوح ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میکرومولار سرب، تفاوت در دو سطح نیکل معنادار بوده است. بر اساس یافته‌ها، فعالیت این آنزیم ۲۷ تا ۷۰ درصد نسبت به گیاهان شاهد افزایش یافته است.

بر اساس جدول آنالیز واریانس ۱، اختلاف داده‌های مربوط به فعالیت آنزیم گایاکول‌پراکسیداز گیاه شوید در معرض تیمار غلظت‌های مختلف سرب و نیکل معنادار نبوده است.

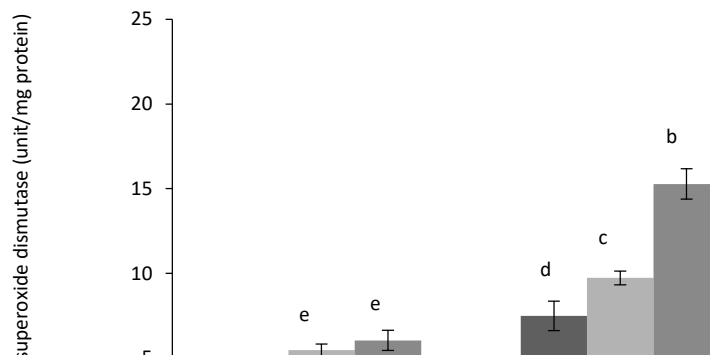
**تغییر فعالیت آنزیم‌های کاتالاز، سوپراکسیددیسموتاز، گایاکول‌پراکسیداز و آسکوربات‌پراکسیداز گیاه:** بر اساس جدول آنالیز واریانس ۱، تفاوت فعالیت آنزیم کاتالاز گیاه شوید در معرض تیمار نیکل و سرب از نظر آماری معنادار بوده است ( $P < 0.01$ ). شکل ۶ نشان می‌دهد با افزایش غلظت سرب، میزان فعالیت آنزیم کاتالاز ۱۶ تا ۲۷ درصد در مقایسه با شاهد افزایش یافته است؛ به طوری که بیشترین میزان فعالیت در تیمار ۱۰۰۰ میکرومولار سرب و غلظت‌های ۱۰۰ و ۲۰۰ میکرومولار نیکل رخ داده است. مطابق شکل، میزان فعالیت آنزیم کاتالاز در تیمار توأم سرب و نیکل نسبت به تیمارهای سرب بیشتر شده است. شکل نشان می‌دهد در سطح غلظت صفر سرب، افزودن نیکل به محیط در هر دو سطح سبب افزایش فعالیت آنزیم شده، ولی فعالیت آنزیم در دو سطح نیکل بدون حضور سرب تفاوت معناداری با یکدیگر نداشته است. در سطح سرب ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میکرومولار، وجود نیکل در دو سطح سبب افزایش فعالیت آنزیم کاتالاز شده است؛ درحالی که دو غلظت نیکل تفاوت معناداری با یکدیگر نداشته‌اند.

تیمارشده با دو غلظت نیکل بدون حضور سرب نسبت به شاهد افزایش یافته و استفاده از سرب در دو غلظت سبب افزایش فعالیت این آنزیم نسبت به گیاهان شاهد شده است. در هر سه سطح سرب، افزودن نیکل در دو غلظت سبب افزایش فعالیت آنزیم شده است. در سطح صفر سرب، اختلاف فعالیت آنزیم در دو سطح نیکل معنادار نبوده، ولی در سطوح ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میکرومولار سرب، تفاوت در دو سطح نیکل معنادار بوده است.

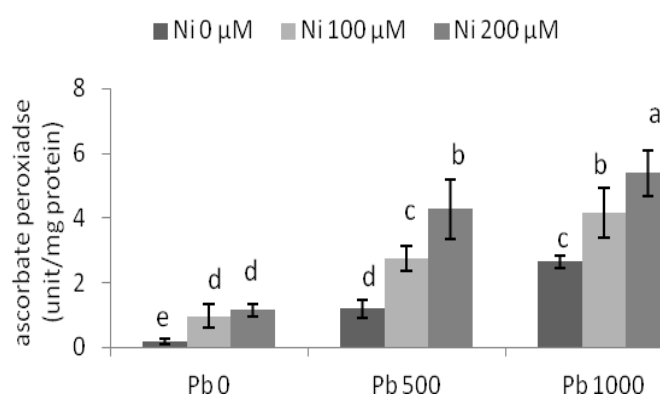
بر اساس جدول ۳، تفاوت فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز شوید در معرض تیمار نیکل و سرب از نظر آماری معنادار بوده است ( $P < 0.01$ ). بر اساس شکل ۸، بیشترین فعالیت این آنزیم در تیمار سرب ۱۰۰۰ میکرومولار همراه با ۲۰۰ میکرومولار نیکل رخ داده و این افزایش ۵ تا ۲۸ درصد نسبت به گیاهان شاهد بوده است. فعالیت این آنزیم در گیاهان شاهد نسبت به تمام تیمارها کمتر بوده است. شکل نشان می‌دهد آنزیم در گیاهان



شکل ۶- مقایسه برهم کنش سرب و نیکل روی آنزیم کاتالاز *Anethum graveolens* L. مقادیر میانگین سه تکرار  $\pm$  انحراف معیار هستند و حرف‌های یکسان وجودنداشتن اختلاف معنادار با استفاده از آزمون دانکن را نشان می‌دهند.



شکل ۷- مقایسه برهم کنش سرب و نیکل روی آنزیم سوپراکسید دیسموتاز *Anethum graveolens* L. مقادیر میانگین سه تکرار  $\pm$  انحراف معیار هستند و حرف‌های یکسان وجودنداشتن اختلاف معنادار با استفاده از آزمون دانکن را نشان می‌دهند.

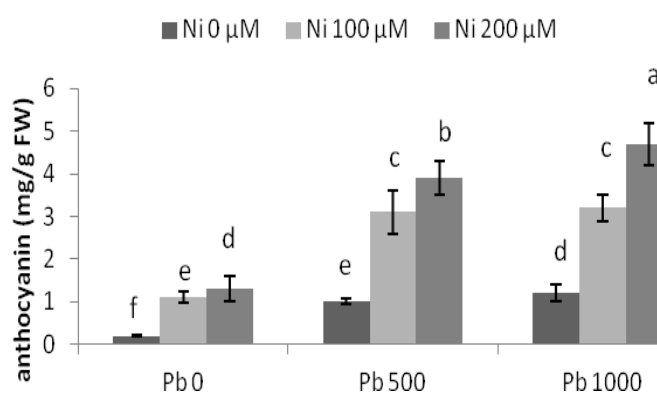


شکل ۸- مقایسهٔ برهم‌کنش سرب و نیکل روی آنزیم آسکوربات‌پراکسیداز *Anethum graveolens* L. مقادیر میانگین سه تکرار  $\pm$  انحراف معیار هستند و حرف‌های یکسان وجودنداشتن اختلاف معنادار با استفاده از آزمون دانکن را نشان می‌دهند.

میکرومولار نیکل همراه با سرب ۱۰۰۰ میکرومولار تولید شده است. در غلظت ۱۰۰۰ میکرومولار سرب همراه با ۱۰۰ میکرومولار نیکل و ۵۰۰ میکرومولار سرب همراه با ۱۰۰ میکرومولار نیکل، میزان آنتوسیانین در گیاه شوید تفاوتی نشان نداده است. در هر سه سطح سرب، افزودن نیکل در دو غلظت سبب افزایش محتوای آنتوسیانین شده است؛ به طوری که در هر سه سطح سرب، وجود نیکل در محیط سبب تفاوت معنادار در سطح دو غلظت نیکل شده است.

#### تغییرات آنتوسیانین، فنل کل و فلاونوئید گیاه:

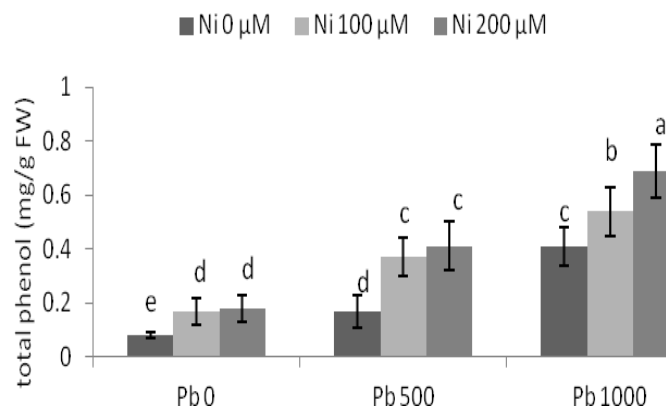
بر اساس جدول آنالیز واریانس ۱، تفاوت میزان آنتوسیانین در گیاهان شوید در معرض تیمار نیکل و سرب از نظر آماری معنادار بوده است ( $P < 0.01$ ). شکل ۹ نشان می‌دهد نیکل سبب افزایش میزان آنتوسیانین در گیاه شوید شده است؛ به طوری که با افزایش غلظت سرب در گیاه، میزان آنتوسیانین ۶ تا ۴۲ درصد افزایش یافته است. مطابق شکل، به کارگیری سرب و نیکل در گیاه شوید به افزایش میزان آنتوسیانین منجر شده است؛ به طوری که بیشترین میزان آنتوسیانین در غلظت‌های ۲۰۰



شکل ۹- مقایسهٔ برهم‌کنش سرب و نیکل روی آنتوسیانین *Anethum graveolens* L. مقادیر میانگین سه تکرار  $\pm$  انحراف معیار هستند و حرف‌های یکسان وجودنداشتن اختلاف معنادار با استفاده از آزمون دانکن را نشان می‌دهند.

نیکل سبب افزایش میزان فنل کل نسبت به تیمار سرب یا نیکل به‌تنهایی شده‌اند. در هر سه سطح سرب، افزودن نیکل در دو غلظت سبب افزایش محتوای فنل کل شده است. همان‌طور که در شکل دیده می‌شود در سطح صفر و ۵۰۰ میکرومولار سرب، اختلاف محتوای فنل کل در دو سطح نیکل معنادار نبوده، ولی در سطح ۱۰۰۰ میکرومولار سرب، تفاوت در دو سطح نیکل معنادار بوده است.

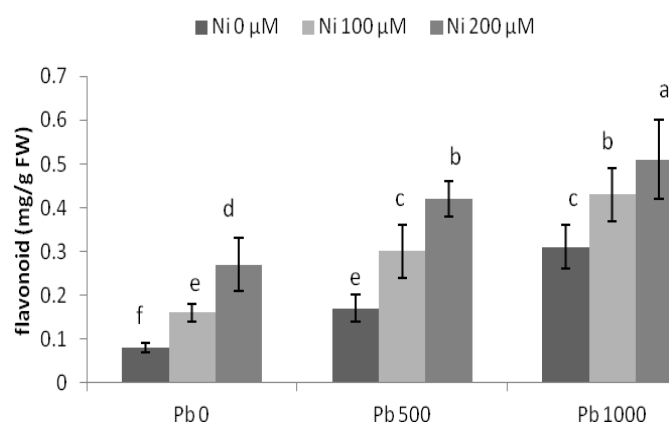
بر اساس جدول آنالیز واریانس ۲، اختلاف داده‌های مربوط به میزان فنل کل معنادار بوده است. شکل ۱۰ نشان می‌دهد با افزایش غلظت سرب و نیکل، میزان فنل کل گیاه شوید از ۹ تا ۶۱ درصد افزایش یافته است؛ به‌طوری‌که بیشترین میزان فنل کل در غلظت ۱۰۰۰ میکرومولار سرب همراه با ۲۰۰ میکرومولار نیکل تولید شده است. شکل نشان می‌دهد تیمار سرب یا نیکل سبب افزایش میزان فنل کل گیاه شوید شده است و تیمارهای توأم سرب و



شکل ۱۰- مقایسه برهم‌کنش سرب و نیکل روی فنل کل *Anethum graveolens* L. مقادیر میانگین سه تکرار  $\pm$  انحراف معیار هستند و حرف‌های یکسان وجودنداشتن اختلاف معنادار با استفاده از آزمون دانکن را نشان می‌دهند.

نیکل، افزایش بیشتری را در میزان فلاونوئید در پی داشته است؛ به‌طوری‌که بیشترین میزان فلاونوئید در تیمار ۱۰۰۰ میکرومولار سرب همراه با ۲۰۰ میکرومولار نیکل تولید شده است. در هر سه سطح سرب، افزودن نیکل به محیط سبب افزایش معنادار محتوای فلاونوئید در گیاهان شده است (شکل ۱۱).

جدول آنالیز واریانس ۲ نشان می‌دهد تفاوت میزان فلاونوئید در گیاه شوید در معرض تنش سرب و نیکل از نظر آماری معنادار بوده است ( $P < 0.01$ ). شکل ۱۱ نشان می‌دهد استفاده از سرب یا نیکل سبب افزایش ۸ تا ۴۳ درصدی میزان فلاونوئید شده است. به‌کارگیری توأم سرب و

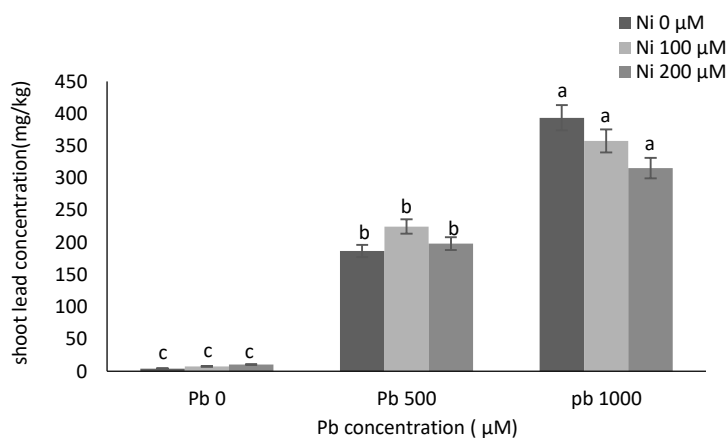


شکل ۱۱- مقایسهٔ برهم کنش سرب و نیکل روی فلاونوئید *Anethum graveolens* L. مقادیر میانگین سه تکرار  $\pm$  انحراف معیار هستند و حرف‌های یکسان وجودنداشتن اختلاف معنادار با استفاده از آزمون دانکن را نشان می‌دهند.

افزایش غلظت سرب، تجمع این یون در بخش هوایی گیاه افزایش یافته است. در هر سه سطح سرب، وجود نیکل در محیط تأثیری بر میزان سرب تجمع یافته در بخش هوایی نداشته است (شکل ۱۲).

#### تجمع سرب و نیکل در ریشه و بخش هوایی: بر

اساس جدول آنالیز واریانس ۲، اختلاف داده‌های مربوط به تیمار سرب و نیکل در رابطه با میزان سرب بخش هوایی در سطح ۵ درصد معنادار بوده و با



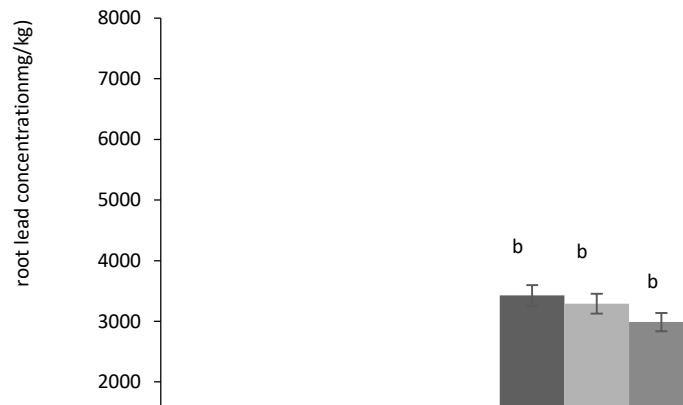
شکل ۱۲- مقایسهٔ برهم کنش سرب و نیکل روی میزان سرب بخش هوایی *Anethum graveolens* L. مقادیر میانگین سه تکرار  $\pm$  انحراف معیار هستند و حرف‌های یکسان وجودنداشتن اختلاف معنادار با استفاده از آزمون دانکن را نشان می‌دهند.

و ۵۰۰ میکرومولار سرب، افزودن نیکل به محیط در دو غلظت تأثیری بر میزان تجمع سرب ریشه نداشته است. در غلظت ۱۰۰۰ میکرومولار سرب، زمانی بیشترین مقدار تجمع سرب در ریشه اتفاق می‌افتاد

بر اساس جدول آنالیز واریانس ۲، اختلاف داده‌های مربوط به تیمار سرب و نیکل در رابطه با میزان سرب ریشه در سطح ۵ درصد معنادار بوده است (شکل ۱۳). شکل نشان می‌دهد در سطح صفر

است. مقایسهٔ تجمع سرب در ریشه و ساقه نشان می‌دهد در شرایط یکسان، میزان زیادی از سرب در ریشه تجمع یافته است.

که نیکل در محیط وجود نداشته باشد. در دو غلظت دیگر نیکل، تفاوتی در تجمع سرب در ریشه دیده نشد؛ بنابراین در غلظت زیاد سرب، افزایش غلظت نیکل از تجمع سرب در ریشه جلوگیری کرده

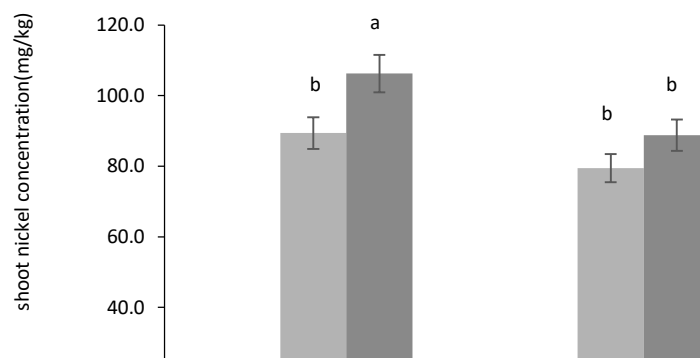


شکل ۱۳- مقایسهٔ برهم کنش سرب و نیکل روی میزان سرب ریشهٔ *Anethum graveolens* L. مقادیر میانگین سه تکرار  $\pm$  انحراف معیار هستند و حرف‌های یکسان وجودنداشتن اختلاف معنادار با استفاده از آزمون دانکن را نشان می‌دهند.

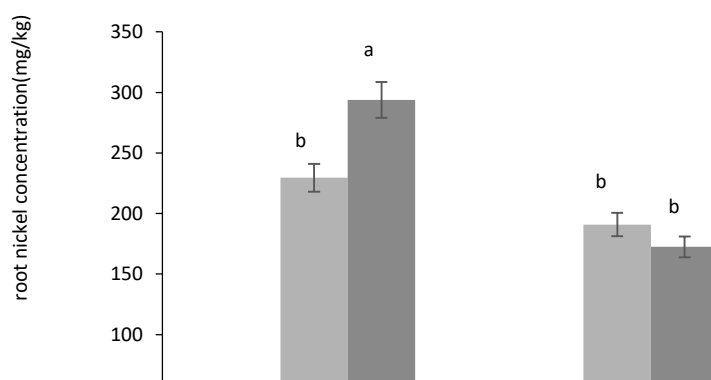
بر اساس جدول آنالیز واریانس ۲، اختلاف داده‌ها برای میزان نیکل ریشه در سطح ۵ درصد معنادار بوده است. در تمام تیمارها، میزان نیکل ریشه در مقایسه با شاهد افزایش یافته است. مطابق شکل ۱۵، افزایش غلظت سرب در محیط سبب کاهش تجمع نیکل در ریشه شده است؛ به طوری که در ۱۰۰۰ میکرومولار سرب، میزان نیکل ریشه نسبت به غلظت ۵۰۰ میکرومولار سرب و وجودنداشتن سرب در محیط کمتر شده است (شکل ۱۵). افزایش غلظت نیکل در حضور سرب، تأثیری بر تجمع نیکل در ریشه نداشته است. در هر سه سطح سرب، افزودن نیکل به محیط سبب افزایش تجمع نیکل در ریشه شده است. تفاوت بین دو غلظت نیکل تنها در سطح سرب صفر معنادار بوده است.

نتایج نشان دادند تفاوت میزان نیکل در بخش هوایی گیاهان در معرض تنش از نظر آماری در سطح ۵ درصد معنادار است. با توجه به شکل ۱۴، میزان نیکل بخش هوایی در مقایسه با شاهد افزایش یافته است. چنانچه سرب در محیط وجود نداشته باشد، افزایش نیکل سبب تجمع این عنصر در بخش هوایی می‌شود. شکل نشان می‌دهد در تمام غلظت‌های سرب، افزایش غلظت نیکل سبب تجمع این عنصر در بخش هوایی شده و غلظت ۱۰۰۰ میکرومولار سرب، تجمع نیکل در بخش هوایی گیاه را نسبت به غلظت ۵۰۰ میکرومولار سرب کاهش داده است. در سطح ۵۰۰ میکرومولار سرب، افزودن نیکل به محیط سبب تجمع این عنصر شده است، ولی تفاوت معناداری بین دو غلظت نیکل دیده نمی‌شود (شکل ۱۴).





شکل ۱۴- مقایسهٔ برهم کنش سرب و نیکل روی میزان نیکل بخش هوایی *Anethum graveolens* L. مقادیر میانگین سه تکرار  $\pm$  انحراف معیار هستند و حرف‌های یکسان وجودداشتن اختلاف معنادار با استفاده از آزمون دانکن را نشان می‌دهند.



شکل ۱۵- مقایسهٔ برهم کنش سرب و نیکل روی میزان نیکل ریشهٔ *Anethum graveolens* L. مقادیر میانگین سه تکرار  $\pm$  انحراف معیار هستند و حرف‌های یکسان وجودداشتن اختلاف معنادار با استفاده از آزمون دانکن را نشان می‌دهند.

## بحث

عمدهٔ تجمع عناصر است، سرب از تجمع نیکل در گیاه جلوگیری می‌کند. وجود فلزات سنگین در محیط سبب کاهش توان رشد گیاه و در حالت شدیدتر موجب از بین رفتن گیاه می‌شود (Baker *et al.*, 2000). نتایج پژوهش حاضر نشان دادند تیمار سرب و نیکل سبب کاهش محتوای کلروفیل a، b و کل می‌شود و علت این کاهش را می‌توان ممانعت از آنزیم‌های مسئول بیوسنتز کلروفیل در اثر تنش فلزات سنگین دانست (Zengin and Munzuroglu, 2005). فلزات سنگین از جمله

بر اساس نتایج، مقادیر سرب و نیکل به کاررفته در آزمایش حاضر سبب کاهش ناچیز طول گیاهان شدند و تأثیری بر وزن و مقدار کاروتنوئید آنها نداشتند. محتوای کلروفیل‌ها با کاربرد نیکل و سرب به‌طور معناداری کاهش و مقدار ترکیبات فعال زیستی از جمله آنتوسیانین، فنل کل و فلاونوئید افزایش یافت و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی مانند کاتالاز، سوپراکسیددیسموتاز و آسکوربات پراکسیداز بیشتر شد. اگرچه ریشه محل

اکسیژن فعال است (Callahan *et al.*, 2005). سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی با کارایی زیاد شامل آنزیم‌های کاتالاز و پراکسیداز در گیاهان وجود دارد که رادیکال‌های آزاد را از بین می‌برد و خنثی یا جاروب می‌کند (Shahid *et al.*, 2014). میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی بسته به مدت و نوع تنش، گونه گیاهی و بخش‌های گیاه متفاوت است (Dinakar *et al.*, 2009). در پژوهش حاضر، فعالیت آنزیم‌های کاتالاز، آسکوربات پراکسیداز و سوپراکسید دیسموتاز در گیاه شوید در معرض تیمار توأم سرب و نیکل افزایش یافت که بیان‌کننده فعال‌شدن سیستم آنتی‌اکسیدان آنزیمی در گیاه به منظور جلوگیری از انباشت رادیکال‌های آزاد اکسیژن در شرایط تنش فلزات سنگین است؛ به نظر می‌رسد فعالیت این آنزیم‌ها احتمالاً به واسطه تجمع رادیکال سوپراکسید، سنتز از نو پروتئین آنزیمی و القای بیان ژن‌های کدکننده آنزیم‌ها باشد (Verma and Dubey, 2003) و احتمالاً افزایش فعالیت این آنزیم‌ها نشان‌دهنده سازوکار مقابله گیاه با تنش است. در پژوهشی نشان داده شده است فعالیت کاتالاز طی تیمار گیاه کلم با کادمیوم افزایش می‌یابد (Burjian *et al.*, 2017). یکی از سازوکارهای حفاظتی غیرآنزیمی که در شرایط تنش‌های غیرزیستی تحریک می‌شود، بیوستنز ترکیبات فنلی از جمله فلاونوئیدهاست؛ این ترکیبات در شرایط مطلوب محیطی نیز در سلول‌های گیاهی سنتز می‌شوند، اما تنش‌های محیطی مقدار آنها را در سلول تغییر می‌دهند (Hou *et al.*, 2003). در پژوهش حاضر، میزان ترکیبات فنلی در گیاه شوید در معرض تنش فلزات سنگین

سرب، نیکل و کادمیوم با اختلال در جذب عناصر ضروری همانند منیزیم و آهن، سنتز کلروفیل در گیاه را بر هم می‌زنند؛ همچنین افزایش تجزیه کلروفیل در گیاهان در اثر تیمار سرب از افزایش فعالیت کلروفیل‌ناشی می‌شود. بررسی اثر فلزات سنگین شامل نیکل، سرب و روی در ذرت نشان داده است در شرایط تنش، فتوسنتز کاهش می‌یابد و در غلظت‌های بیشتر و مدت زمان بیشتر تیمار، کاهش درخورد توجه است (Tripathi *et al.*, 2016). Amini و همکاران (۲۰۱۲) نشان داده‌اند میزان کلروفیل کل در یونجه تیمار شده با سرب و نیکل به‌طور معناداری نسبت به گیاه شاهد کاهش می‌یابد؛ نتایج یادشده با یافته‌های پژوهش حاضر همخوانی دارند. پژوهش‌ها نشان داده‌اند در برگ‌های گیاهچه‌های ده‌روزه لوبیا، محتوای کلروفیل کل با افزایش غلظت فلزات سنگین (سرب، مس، کادمیوم و جیوه) به تدریج کاهش می‌یابد (Zengin and Munzuroglu, 2005). Pour Akbar و Ebrahim Zadeh (۲۰۱۴) گزارش کرده‌اند با تیمار مس و نیکل در ذرت، محتوای رنگیزه‌ای کلروفیل a به مقدار ۱۴ تا ۶۷ درصد و کلروفیل b به مقدار ۳۲ تا ۷۹ درصد نسبت به شاهد کاهش می‌یابد. کاهش کلروفیل به دو علت رخ می‌دهد: (۱) ورود فلزات سنگین به درون کلروپلاست، تجمع آنها و تداخل در بیوستنز کلروفیل؛ (۲) اثر مهارکنندگی روی آنزیم‌ها که به پراکسیداسیون رنگیزه‌ها و کاهش آنها منجر می‌شود (Heckathorn *et al.*, 2004). یکی از آسیب‌های بافتی مهم که در اثر قرارگرفتن گیاهان در معرض فلزات سنگین رخ می‌دهد، افزایش تولید گونه‌های

همچنین در برگ‌های فیلاتنوس که روی آنها سولفات مس پاشیده بود (Santiago *et al.*, 2000)، گزارش شده است. مطالعه‌های Steyn و همکاران (۲۰۰۲) نشان داده‌اند آنتوسیانین در پاسخ به تنش عناصر سنگین افزایش می‌یابد و احتمالاً این ترکیب به‌شکل ناقل فلز سنگین به واکوئل عمل می‌کند. فلزات سنگین سنتز آنزیم گلوکاتایون-S-ترانسفراز (GST) را که آنزیمی کلیدی در آخرین مرحلهٔ بیوسنتز آنتوسیانین است، تحریک می‌کنند و از این طریق سبب افزایش سنتز آنتوسیانین می‌شوند؛ افزایش میزان آنتوسیانین در پژوهش حاضر ممکن است به این علت باشد. در پژوهش حاضر با افزایش غلظت سرب محیط کشت، تجمع سرب در ریشه و برگ‌های شوید افزایش یافت. تفاوت مشاهده‌شده در انباشت سرب در ریشه و بخش هوایی ممکن است به این علت باشد که سمیت‌زدایی سرب ابتدا از بخش ریشه‌ای آغاز می‌شود و در پی آن، میزان سرب انتقال‌یافته به بخش هوایی به کمترین مقدار می‌رسد (Soltani *et al.*, 2006). تجمع سرب در گیاه شوید به غلظت آن در محیط کشت بستگی دارد، ولی در کل میزان سرب در ریشه بیشتر از برگ است. عمدتاً سرب از مسیر آپوپلاستی یا کانال یونی کلسیم وارد ریشه می‌شود. انتقال سرب از مسیر آپوپلاستی به‌سهولت از طریق انحلال سرب در آب انجام می‌شود و نوار کاسپاری در آندودرم مانع از انتقال آن به استوانهٔ مرکزی می‌شود؛ به‌همین‌علت، تجمع در ریشه بیشتر اتفاق می‌افتد (Sharma and Madhulika, 2005). بر اساس مطالعهٔ Akinci و همکاران (۲۰۱۰)، بیشترین میزان سرب از طریق سیستم‌های ریشه‌ای جذب گیاهان

افزایش یافت که احتمالاً به این علت است که ترکیبات فنلی طی تنش فلزات سنگین به‌شکل شلاتورهای فلزات عمل می‌کنند و از سوی دیگر، گونه‌های مولکولی اکسیژن فعال را به‌طور مستقیم پاکسازی می‌کنند. افزایش ترکیبات فنلی به افزایش فعالیت آنزیم‌های درگیر در متابولیسم ترکیبات فنلی وابسته است که سنتز ترکیبات فنلی جدید را در شرایط تنش فلزات سنگین نشان می‌دهد (Michalak., 2006). در پژوهش حاضر، سرب و نیکل باعث افزایش میزان آنتوسیانین در گیاه شوید شدند. آنتوسیانین‌ها از ترکیبات فنلی حاصل از مسیر فنیل‌پروپانویید هستند که در بافت‌های گیاهی به‌وفور یافت می‌شوند. آنزیم فنیل‌آلانیل‌آمونیا‌لیاز (PAL) آغازگر مسیر فنیل‌پروپانویید است و افزایش فعالیت آن که نخستین آنزیم مسیر بیوسنتز فنل‌هاست، در پاسخ به برخی تنش‌های زیستی و غیرزیستی گزارش شده است (Tian and Li., 2007). آنتوسیانین در سمیت‌زدایی فلزات سنگین از طریق تشکیل کمپلکس‌های فلز-آنتوسیانین ایفای نقش می‌کند (Boulton, 2001). Kumar و همکاران (۲۰۱۲) پیشنهاد کرده‌اند سنتز آنتوسیانین در گیاهان، راهبرد مؤثری علیه تولید ROS طی مقابله با تنش سرب است. در پژوهش حاضر، افزایش میزان آنتوسیانین در شوید به‌علت مقابله با تنش اکسیداتیو حاصل از فلزات سنگین و نقش حفاظتی آن در برابر گونه‌های اکسیژن فعال اتفاق افتاد. زیاد شدن مقدار ترکیبات فنلی گندم در پاسخ به سمیت نیکل، در پاسخ به سمیت آلومینیوم در ذرت (Malekzadeh *et al.*, 2015)، در پاسخ به سمیت کادمیوم در لوبیا (Kovacik *et al.*, 2011) و

در پژوهش حاضر، به کارگیری نیکل و سرب در محیط کشت گیاه شوید سبب اثر کاهشی بر طول ریشه و بخش هوایی و محتوای کلروفیل a، b و کل و اثر افزایشی بر محتوای آنتوسیانین، فنل کل، فلاونوئید، فعالیت آنزیم کاتالاز، آسکوربات پراکسیداز و سوپراکسیددیسموتاز شد. افزایش غلظت سرب در محیط از جذب نیکل جلوگیری کرد، ولی نیکل چنین تأثیری بر جذب سرب نداشت. تیمارهای به کار رفته تأثیری بر وزن تر و خشک ریشه و بخش هوایی، محتوای کاروتنوئید، فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز نداشتند؛ در نتیجه، گیاه شوید تحت تأثیر وجود سرب و نیکل در محیط رشد، سیستم‌های آنزیمی و ترکیبات آنتی‌اکسیدانی خاصی را فعال می‌کند و با وجود کاهش رنگیزه‌ها، تغییر چندانی در وزن تر و خشک ریشه و بخش هوایی ایجاد نمی‌شود و از سویی، مقادیر زیادی از عناصر را در ریشه ذخیره می‌کند.

## References

- Akinci, I. E., Akinci, S. and Yilmaz, K. (2010) Response of tomato (*Solanum lycopersicum* L.) to lead toxicity: Growth, element uptake, chlorophyll and water content. *African Journal of Agricultural Research* 5(6): 416-423.
- Ali, M. A., Ashraf, M. and Athar, H. R. (2009) Influence of nickel stress on growth and some important some physiological/ biochemical attributes in some diverse canola (*Brassica napus* L.) cultivars. *Materials Hazardous* 172: 969-964.
- Amini, F., Noori, M., Askari, M., Foroughi, M. and Abbaspour, J. (2012) Ni induction changes to some biochemical traits and protein electrophoresis pattern of *Corronilla varia* under hydroponic culture. *Journal of Crop Production and Processing* 2(5): 143-152 (in Persian).

می‌شود و مقادیر ناچیزی از طریق برگ و به‌ویژه برگ‌های کرک‌دار جذب می‌شود. Kosobrukhov (۲۰۰۴) گزارش کرده است سرب در اندام‌های گیاهی به‌ویژه در ریشه تجمع می‌یابد. در پژوهش Zheljzkov و همکاران (۲۰۰۶) مشخص شده است با افزایش میزان سرب در محیط رشد گیاه، انتقال آن از ریشه‌ها به اندام هوایی افزایش می‌یابد؛ این افزایش ممکن است به علت اختلال در ساختار غشای پلاسمایی در اثر وجود غلظت‌های زیاد سرب در محیط و کاهش ممانعت انتقال سرب از خاک به گیاه باشد. میزان انباشت سرب در ریشه بیشتر از ساقه و برگ‌هاست (Zhao *et al.*, 2012). نتایج پژوهش حاضر نشان دادند تجمع نیکل در ریشه بیش از بخش هوایی گیاه شوید است و با افزایش غلظت نیکل در محیط رشد، غلظت آن در ریشه افزایش بیشتری در مقایسه با بخش هوایی دارد. بر اساس انباشتگی بیشتر نیکل در ریشه نسبت به اندام‌های هوایی شوید، به نظر می‌رسد کده‌بندی یون‌های نیکل در ریشه نوعی سازوکار مقاومتی است که گیاه شوید در برابر تنش فلز سنگین نیکل در پیش می‌گیرد. غلظت نیکل موجود در گیاه با غلظت آن در خاک و محیط ارتباط مستقیم دارد. مطالعه Parida و همکاران (۲۰۰۳) روی گیاه ارزن نشان داده است افزایش غلظت نیکل در بافت‌های گیاهی به‌علت افزایش غلظت این عنصر در محیط رشد این گیاهان است. تجمع فلزات سنگین در ریشه بسیار بیشتر از بخش هوایی است؛ به‌همین علت، ریشه شوید و بسیاری از گیاهان زراعی می‌توانند مقدار زیادی نیکل را ذخیره کنند (Fuentes *et al.*, 2006).

- Amini, F. and Amirjani, M. R. (2013) Effect of Ni and Pb on chlorophyll content and metals accumulation in *Medicago sativa*. *Journal of Crop Production and Processing* 2(6): 11-20 (in Persian).
- Arora, A., Sairam, R. K. and Srivastava, G. C. (2002) Oxidative stress and antioxidative system in plants. *Current Science* 22: 1227-1238.
- Azimzadeh, B. and Khademi, H. (2013) Estimation of background concentration of selected heavy metals for pollution assessment of surface soils of Mazandaran province, Iran. *Journal of Water and Soil* 548-559 (in Persian).
- Azizian-Shermeh, O., Einali, A. and Valizadeh, J. (2018) Physiological and biochemical responses of basil (*Ocimum basilicum*) seedlings to different concentrations of zinc. *Iranian Journal of Plant Biology* 10(2): 35-56 (in Persian).
- Baker, A. J. M., Mc Grath, S. P., Reeves, R. D. and Smith, J. A. C. (2000) Metal hyper accumulator plants: A review of the ecology and physiology of a biological resource for phytoremediation of metal-polluted soils. In: *Phytoremediation of contaminated soil and water* (Eds. Terry, N. and Banuelos, G.) 85-107. CRC Press, Boca Raton, Florida
- Boulton, R. (2001) The pigmentation of anthocyanins and its role in the color of red wine: A critical review. *American Journal of Enology and Viticulture* 52(2): 67-87.
- Burjjan, M., Khoshsokhan Mozafar, M. and Khosravi Rina, M. (2017) Antioxidant changes in *Brassica oleraceal* cv. under cadmium stress in hydroponic culture. *Journal of Alzahra University (Applied Biology)* 4(13): 84-69 (in Persian).
- Callahan, D. L., Baker, A. J. M., Kolev, S. D. and Wedd, A. G. (2005) Metal ion ligands in hyper accumulating plants. *Journal of Biological Inorganic Chemistry* 11(1): 2-12.
- Chance, B. and Maehly, A. C. (1995) Assay of catalases and peroxidase. *Methods of Biochemical Analysis* 11(1): 755-764.
- Chang, C., Yang, M., Wen, H. and Chern, J. (2002) Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. *Journal of Food and Drug Analysis* 10(3): 78-82.
- 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(5): 304-313.
- Cheraghi, M. and Ghobadi, A. (2013) Health risk assessment of heavy metals (cadmium, nickel, lead and zinc) in withdrawn parsley vegetable from some farms in Hamedan city. *Sunrise Health* 4(13): 129-143 (in Persian).
- Daneshmand, F. (2014) Response of antioxidant system of tomato to water deficit stress and its interaction with ascorbic acid. *Iranian Journal of Plant Biology* 6(19): 57-72. (in Persian).
- Dinakar, N., Nagajyoth, P.C., Suresh, S., Damodharam, T. and Suresh, C. (2009) Cadmium induced changes on proline, antioxidant enzymes, nitrate and nitrite reductases in *Arachis hypogaea* L. *Journal of Environmental Biology* 30(2): 289-294.
- Drazkiewicz, M. (1994) Chlorophyllase: Occurrence, functions, mechanism of action, effects of external and internal factors (Review). *Photosynthetica* 30(1): 321-331.
- Esfandiari, E. and Rostami, N. (2016) Evaluation of Cd effects on growth and some oxidative stress parameters of wheat cultivars during seedling stage. *Iranian Journal of Plant Biology* 8(27): 1-16 (in Persian).
- Esrefoglu, M. (2012) Experimental and clinical evidence of antioxidant therapy in acute pancreatitis. *World Journal of Gastroenterology* 18(39): 5533-5541.
- Fuentes, F., Montes, J. and Fernandez, L. M. (2006) Total quality management,

- strategic orientation and organizational performance: the case of Spanish companies. *Total Quality Management* 17(3): 303-323.
- Gardea-Torresdey, J.L., Peralta-Videa, G. 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.
- Gill, S. S. and Tuteja, N. (2010) Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry* 48(12): 909-930.
- Heckathorn, S. A., Mueller, J. K., LaGuidice, S., Zhu, B., Barrett, T., Blair, B. and Dong, Y. (2004) Chloroplast small heat-shock proteins protect photosynthesis during heavy metal stress. *American Journal of Botany* 91(9): 1312-1318.
- Hou, W. C., Lin, R. D., Cheng, K. T., Hung, Y. T., Cho, C. H., Chen, C. H., Hwang, S. Y. and Lee, M. H. (2003) Free radical scavenging activity of Taiwanese native plants. *Phytomedicine* 10: 170-175.
- Islam, E., Yang, X., Li, T., Liu, D., Jin, X. and Meng, F. (2007) Effect of Pb toxicity on root morphology, physiology and ultrastructure in the two ecotypes of *Elsholtzia argyi*. *Journal of Hazardous Materials* 147(3): 806-816.
- Kazemzadeh, J., Nouriee, A., Pourang, N., Alizadeh, M., Qureshi, H. and Reward, A. (2012) Investigation and measurement of heavy metals nickel, lead, copper, manganese, zinc, cadmium and Vanadium in edible vegetables south of Tehran refinery. *Environmental Research* 3(6): 65-74 (in Persian).
- 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(2): 145-151.
- Kovacik, J., Klejdus, B., Hedbavny, J. and Zon, J. (2011) Significance of phenols in cadmium and nickel uptake. *Journal of Plant Physiology* 168(6): 576-584.
- Kumar, A., Prasad, M. N. V. and Sytar, O. (2012) Lead toxicity, defense strategies and associated indicative biomarkers in *Talinum triangulare* grown hydroponically. *Chemosphere* 89(9): 1056-1065.
- Lichtenthaler, H. K. and Welburn, W. R. (1994) Determination of total carotenoids and chlorophyll a and b of leaf extracts in different solvents. *Biochemical of Transport* 11(5): 591-592.
- Mac-Adam, J. W., Nelson, C. J. and Sharp, R. E. (1992) Peroxidase activity in the leaf elongation zone of tall fescue. *Plant Physiology* 99: 872-878.
- Maleki, M. S. and Ehsanpour, A. A. (2018) Effect of salicylic acid on total phenol, flavonoid, anthocyanin and PAL and TAL enzymes in tomato (*Solanum lycopersicum* Mill) plants. *Iranian Journal of Plant Biology* 9(34): 55-67 (in Persian).
- Malekzadeh, P., Shikhakbari Mehr, R. and Hatamnia, A. A. (2015) Effects of aluminum toxicity on maze seedlings. *Iranian Journal of Plant Physiology* 5(2): 1289-1296.
- Michalak, A. (2006) Phenolic compounds and their antioxidant activity in plants growing under heavy metal Stress. *Polish Journal of Environmental Studies* 15(4): 523-530.
- Nisi, A., Vosoughi, M., Mohammadi, B., Mohammadi, M. J., Naimabadi, A. and Hashemzadeh, B. (2014) Phytoremediation of by *Helianthus* plant: a review study. *Journal of Torbat-e-Heydarieh University of Medical Sciences* 2(2): 65-55 (In Persian).
- Pandey, N. and Sharma, C. P. (2002) Effect of heavy metals  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$  and  $\text{Cd}^{2+}$  on growth and metabolism of cabbage. *Plant Science* 163(4): 753-758.

- Parida, B. K., Chhibba, I. M. and Nayyar, V. K. (2003) Influence of nickel-contaminated soils on fenugreek (*Trigonella corniculata* L.) growth and mineral composition. *Science. Horticulture*. 98: 113-119.
- Pour Akbar, L. and Ebrahim Zadeh, N. (2014) Growth and physiological answer of *Zea mays* L. to Cu and Ni. *Agriculture Journal* 103: 147-157 (in Persian).
- Saboora, A. and Behjati, R. (2017) The effect of boron and iron deficiency on the contents of photosynthetic pigments, carbohydrates and phenolic compounds in two cultivars of *Sorghum bicolor* L. *Iranian Journal of Plant Biology* 9(33): 19-38 (in Persian).
- Santiago, L. J. M., Louro, R. P. and De Oliveira, D. E. (2000) Compartmentation of Phenolic Compounds and Phenylalanine Ammonia-Lyase in Leaves of *Phyllanthus tenellus* Roxb. and their Induction by Copper Sulphate. *Annals of Botany* 86(5): 1023-1032.
- Shahid, M., Pourrut, B., Dumat, C., Nadeem, M., Aslam, M. and Pinelli, E. (2014) Heavy-metal induced reactive oxygen species: phytotoxicity and physicochemical changes in plants. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology* 232(1): 1-44.
- Sharma, R. K. and Madhulika, A. (2005) Biological effects of heavy metals: An overview. *Environmental Biology*. 26: 301-313.
- Singh, R. P., Murthy, K. N. and Jayaprakasha, G. K. (2002) Studies on the antioxidant activity of Pomegranate peel and seed extracts using in vitro models. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50: 81-86.
- Soltani, F., Ghorbanli, M. and Manouchehri-kalantari, K. H. (2006) Effect of cadmium on photosynthetic pigments, sugars and malonaldehyde content in *Brassica napus* L. *Iranian Journal Biology* 19(2): 136-145.
- Steyn, W.J., Wand, S.J. E., Holcroft, D.M. and Jacobs, G. (2002) Anthocyanins in vegetative tissues: a proposed unified function in photoprotection. *New Phytologist* 155(3): 349-361.
- Tian, X., and Li, Y. (2007) Nitric oxide treatment alleviates drought stress in wheat seedlings. *Biologia Plantarum* 50(4): 775-778.
- Tripathi, A. K, Gupta, M. K., Verma, N., Sinha, S. and Bhushan, A. (2016) Antioxidative and biochemical responses in *Dalbergia sissoo* Roxb seedlings growing under cobalt and lead stress. *Indian Journal of Forestry* 39(3): 1-4.
- Verma, S. and Dubey, R. S. (2003) Lead toxicity induces lipid peroxidation and alters the activities of antioxidant enzymes in growing rice plants. *Plant Science* 164(4): 645-655.
- Zargari, A. S. (1997) *Medicinal Plants*. 5<sup>th</sup> edition, Tehran University Press, Tehran (in Persian)
- Zhao, Y. D., Pan, Y. Z., Liu, B. Y. and Cai, L. (2012) *Pilea cadierei* Gagnep. guill's growth and accumulation under single and combined pollution of Cd and Pb. *Journal of Agro-Environment Science* 31(1): 48-53.
- Zheljazkov, D., Craker, L. E. and Xing, B. (2006) Effects of Cd, Pb, and Cu on growth and essential oil contents in dill, peppermint, and basil. *Environmental and Experimental Botany* 58(1): 9-16.
- Zengin, F. K. and Munzuroglu, O. (2005) Effects of some heavy metals on content of chlorophyll, proline and some antioxidant chemicals in bean (*Phaseolus vulgaris* L.) seedlings. *Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica* 47(2): 157-164.