فصلنامه علمی زیست‌شناسی کاربردی دانشگاه الزهرا(س)
دوره ۳۵، شماره ۲، پیاپی ۷۲، تابستان ۱۴۰۱، ص ۳۶-۱۹
نوع مقاله: مقاله پژوهشی

The Quarterly Scientific Journal of Applied Biology
Vol.36, No.2, Sering.72, Summer 2022, p. 19-36
Article type: Research paper

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۳/۳ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۱۲/۳
وب سایت نشریه: https://jab.alzahra.ac.ir
10.22051/JAB.2021.34309.1398

بررسی میزان تجمع و تحمل نیکل توسط گیاه شبدر سفید (*Trifolium repens* L.) در شرایط کشت هیدروپونیک

ثریا امیر احمدی،[۱] طهماسب آسمانه*،[۲] اطهر السادات جوانمرد[۳]

چکیده

نیکل یک عنصر ضروری برای گیاهان است ولی در غلظت‌های بالا، دارای اثرات سمی است. شبدر سفید، یک گیاه علوفه‌ای زراعی و دارای زیست‌توده‌ی بالایی است. از طرفی دیگر، آلایندگی نیکل در مزارع افزایش یافته است. بر این اساس، در این پژوهش، در قالب طرح آماری کاملا تصادفی، اثر تیمار سطوح مختلف نیکل بر شاخص‌های جوانه‌زنی بذر گیاه شبدر سفید در اتاقک رشد و سپس بر شاخص‌های بیوشیمیایی و فیزیولوژیک این گیاه در محیط کشت هیدروپونیک، مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که درصد و سرعت جوانه‌زنی، شاخص بنیه‌ی بذر و طول گیاهچه، در حضور سطوح پایین و بالای تیمار نیکل، به ترتیب افزایش و کاهش پیدا کرد. در شرایط کشت هیدروپونیک نیز، سطوح ۱۰۰ میکرومولار و بالاتر نیکل، منجر به مرگ گیاهچه‌ها گردید. غلظت‌های ۱۰ و ۵۰ میکرومولار نیکل، اثر منفی بر شاخص‌های بیوشیمیایی از جمله مقدار کلروفیل،کربوهیدرات، پروتئین محلول کل و آنزیم پراکسیداز و اثر مثبت بر مقدار محتوای کاروتنوئیدها داشت. با افزایش غلظت تیمار نیکل، غلظت آن در ریشه و اندام هوایی افزایش یافت. غلظت ۱۰ و ۵۰ میکرومولار نیکل به ترتیب منجر به افزایش و کاهش وزن خشک ساقه و طول اندام هوایی، وزن خشک و سطح برگ نسبت به شاهد گردید. با توجه به نتایج حاصل، به نظر می‌رسد غلظت ۱۰ میکرومولار نیکل برای رشد گیاه مناسب باشد، درحالیکه سطح ۵۰ میکرومولار آن، برای گیاه سمی بود. همچنین به نظر می‌رسد که شبدر سفید، گیاهی حساس به نیکل بوده و توانایی تحمل و تجمع نیکل را ندارد و گزینه مناسبی برای اهداف گیاه‌پالایی نیست.

واژه های کلیدی: انباشت نیکل، تنش فلزات سنگین، شبدر سفید، گیاه‌پالایی.

---

۱ . دانش‌آموخته کارشناسی ارشد، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه یاسوج، یاسوج، ایران
۲ . استادیار، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه یاسوج، یاسوج، ایران
۳. استادیار، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه یاسوج، یاسوج، ایران *نویسنده مسئول: asemaneh@yu.ac.ir

مقدمه

فلزات سنگین گروهی از عناصر شیمیایی فلزی هستند که دارای چگالی، وزن اتمی و عدد اتمی نسبتا بالا می‌باشند. فلزات سنگین، از منابع طبیعی منشا می‌گیرند و همچنین حاصل فعالیت‌های انسانی مانند صنایع نفت و گاز، استفاده از کودهای فسفات در کشاورزی، لجن فاضلاب، استخراج معادن فلزی، استفاده از آفت‌کش‌هاو سوزاندن سوخت‌های فسیلی است (Yan *et al*., 2020). فلزات سنگین توسط فرایندهای زیستی یا فیزیکی قابل تجزیه نیستند و به مدت طولانی در خاک باقی می‌مانند که منجر به تهدید طولانی مدت محیط زیست می‌گردند (Suman *et al*., 2018). روش‌های پالایش متنوعی در مورد خاک‌های آلوده به فلزات سنگین ایجاد شده است که عمدتا مبتنی بر روش‌های مکانیکی یا فیزیکوشیمیایی هستند، مانند خاکبرداری و دفن، شستن خاک. این روش‌ها دارای محدویت‌هایی مانند هزینه بالا، عدم کارایی برای آلودگی‌های با غلظت پایین، تغییرات برگشت‌ناپذیر ویژگی‌های زیستی و فیزیکوشیمیایی خاک و ایجاد آلودگی‌های ثانویه هستند. گیاه‌پالایی روشی است که از گیاهان برای استخراج و حذف آلودگی‌های عناصر شیمیایی یا کاهش دسترسی‌زیستی به آنها در خاک استفاده می‌کند. گیاهان توسط سیستم ریشه خود توانایی جذب ترکیبات یونی موجود در خاک حتی در غلظت‌های پایین را دارند. بنابراین خاک آلوده را اصلاح کرده و منجر به پایداری حاصلخیزی خاک می‌شوند (DalCorso *et al*., 2019).

نیکل در غلظت‌های پایین (0.05-10 mg/kg dry weight) یک عنصر ضروری برای رشد و نمو گیاه است (Nieminen *et al*., 2007)، ولی در غلظت‌های بالا برای گیاهان سمی است. نیکل به عنوان کوفاکتور آنزیم اوره‌آز عمل می‌کند. این آنزیم به نوبه‌ی خود در سوخت و ساز ترکیبات نیتروژن‌دار مؤثر است، بنابراین در فرآیندهای حیاتی مهم از جمله جوانه‌زنی و تشکیل میوه نقش دارد (Gheibi *et al*., 2009). با این حال، مقدار بیش از حد نیکل در گیاه نسبت به کمبود آن معمول‌تر است (Alloway, 1995). مقدار بیش از حد نیکل اثرات زیانباری برای گیاه دارد، شاخص‌های جوانه زنی (Rao & Sresty 2000)، رشد گیاه (Molas, 2002)، جذب مواد غذایی (Aggarwal *et al*, 1990)، فتوسنتز و تنفس (Rahman *et al*, 2005) را کاهش می‌دهد و منجر به کلروز و نکروز برگ می‌شود (Gajewska *et al*., 2006). مقدار مازاد بر نیاز نیکل منجر به تولید گونه‌های فعال اکسیژن و ایجاد تنش اکسیداتیو در گیاهان می‌شود. گیاهانی که بتوانند پاسخ آنتی‌اکسیدانی مؤثر به تنش نیکل ارائه دهند، می‌توانند نیکل را تحمل کنند. البته این میزان تحمل بسته به نوع گونه، رقم و واریته‌ی گیاهی متفاوت است (Aschmann & Zasoski, 1987). برخی از گیاهان مانند جنس *Allysum* (خانواده Brassicaceae) و جنس *Phyllanthus* (خانواده Euphorbiaceae) به عنوان انباشت‌گر این عنصر معرفی شده‌اند (Brooks *et al*., 1979; Bouman *et al*., 2018).

شبدر سفید یکی از گیاهان علوفه‌ای چندساله متعلق به تیره باقلا و دارای زیست‌توده بالا است (عباسی و زمانیان، ۱۳۸۴). جنس شبدر (*Trifolium*)، از مهم‌ترین گیاهانی است که در کشور ایران مصرف علوفه‌ای دارد. از آنجایی‌که احتمال آلایندگی نیکل در مزارع وجود داشته و همچنین یونجه، از دیگر گیاهان این تیره، توانایی تجمع نیکل و مقاومت به آن را نشان داده است (امینی و امیرجانی،۱۳۹۱)، به نظر می‌رسید شبدر سفید پتانسیل گیاه‌پالایی و تجمع نیکل را داشته باشد. بر این اساس و به منظور بررسی پتانسیل گیاه‌پالایی نیکل توسط این گونه، در این پژوهش اثر غلظت‌های مختلف نیکل بر شاخص‌های رشد این گیاه مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش ها

جوانه زنی

بذرهای سالم تهیه شده از مرکز رسمی فروش بذر سبزینه آذر، پس از ضدعفونی شدن توسط هیپوکلریت سدیم و شستشو با آب مقطر در پتری‌دیش‌های ۹ سانتی‌متری (هر پتری‌دیش، ۵۰ بذر) قرار داده شده و تحت تیمار سولفات نیکل (NiSO4) با غلظت‌های صفر، ۱۰، ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میکرومولار قرار گرفتند. پتری‌دیش‌ها در اتاقک کشت، در شرایط محیطی رطوبت نزدیک به ۹۰ درصد، تناوب نوری (۸ ساعت نور و ۱۶ ساعت تاریکی) و دمای ۱۸ درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری شدند. تعداد بذرهای جوانه زده به صورت روزانه مورد شمارش قرار گرفت و درصد جوانه‌زنی، سرعت جوانه‌زنی و شاخص بنیه‌ی بذر طبق روابط زیر محاسبه شد.

رابطه ۱ $$G=(n/N)\times100$$

G: درصد جوانه‌زنی، n: تعداد نهایی بذرهای جوانه‌زده، N: تعداد بذرهای کشت شده (شهبازی و محقق دوست، ۱۳۷۵).

رابطه ۲ $$G.R=\sum Ni/Ti$$

G.R: سرعت جوانه‌زنی، Ni: تعداد بذور جوانه‌زده در روزهای شمارش، Ti: تعداد روزهای پس از انجام آزمایش (سوهانی، ۱۳۸۹).

رابطه ۳ شاخص بنیه‌ی بذر= (میانگین طول گیاهچه mm × درصد جوانه‌زنی)/۱۰۰

(Abdul-baki & Anderson, 1973)

در پایان آزمایش، طول ساقه‌چه، ریشه‌چه و وزن تر اندازه‌گیری شد. تمام مراحل آزمایشگاهی در قالب طرح آماری کاملا تصادفی در سه تکرار صورت گرفت.

تهیه گیاهچه و اعمال تیمار نیکل

جهت تهیه گیاهچه‌های شبدر سفید، بذرهای گیاه در گلدان‌های حاوی شن ضدعفونی شده و عاری از مواد آلی کشت شده و تا زمان سبز شدن با آب مقطر و پس از آن به مدت دو هفته با محلول هوگلند (Parker & Norvell, 1999)، آبیاری شدند. سپس گیاهچه‌ها به محیط کشت هیدروپونیک منتقل شده و پس از دو هفته تحت تیمار سولفات نیکل با غلظت‌های صفر، ۱۰، ۵۰، ۲۰۰ و ۵۰۰ میکرومولار قرار گرفتند. هر تیمار شامل سه تکرار و هر تکرار شامل چهار گیاه بود و در قالب طرح آماری کاملا تصادفی اجرا شد. گلدان‌ها، در اتاق کشت در دمای متناوب ۱۸ درجه سانتی‌گراد برای شب و ۲۲ درجه سانتی‌گراد برای روز نگه‌داری و اسیدیته محلول غذایی هوگلند در حدود ۶±۰/۲ ثابت نگه داشته شد. محلول غذایی در طول هفته، دو مرتبه تعویض گردید. گیاهان چهار هفته پس از اعمال تیمار برداشت شده و شاخص‌های رشد و فیزیولوژیک مورد سنجش قرار گرفتند.

اندازه گیری شاخص‌های رشد

چهار هفته بعد از اعمال تیمار، ساقه‌ها و ریشه‌ها از محل یقه جدا شدند ، طول و وزن تر و خشک آن‌ها با استفاده از ترازوی دیجیتال مدل Te313s با دقت ۰/۰۰۱ گرم، اندازه‌گیری شد. برای محاسبه‌ی سطح برگ، سه برگ تصادفی از هر گلدان استفاده شد، مطابق روش مهدویان و همکاران (۱۳۸۵).

رنگیزه‌های فتوسنتزی

برای سنجش رنگیزه‌های فتوسنتزی (کلروفیل a، b، کلروفیل کل و کاروتنوئید) از روش لیچن تالر استفاده شد (Lichtenthaler, 1987). برای انجام این سنجش ۰/۱ گرم از برگ‌های تازه، با ۷ میلی‌لیتر استون ۸۰ درصد به خوبی سائیده شده و پس از عبوراز کاغذ صافی، جذب نمونه‌ها با دستگاه اسپکتروفتومتر مدل UV-2100 در طول موج‌های ۶۴۶/۸، ۶۶۳/۲ و ۴۷۰ نانومتر خوانده شد. برای محاسبه غلظت رنگیزه‌ها از روابط زیر استفاده گردید.

رابطه ۴ $$Chl\ a = (12.25\ A_{663.2} - 2.79\ A_{646.8})$$

رابطه ۵ $$Chl\ b = (21.21\ A_{646.8} - 5.1\ A_{663.2})$$

رابطه ۶ $$Total\ Chl = Chl\ a + Chl\ b$$

رابطه ۷ $$Car = (1000A_{470} - 1.8\ Chl\ a - 85.02\ Chl\ b)/\ 198$$

در این رابطه‌ها؛ Chl a، Chl b، Chl T، Car، به ترتیب غلظت کلروفیل a، غلظت کلروفیل b، غلظت کلروفیل کل و غلظت کاروتنوئید است. نتایج حاصل از اندازه‌گیری مقدار رنگیزه‌های فتوسنتزی بر حسب میلی‌گرم بر گرم وزن تر محاسبه و ارائه گردید.

سنجش آنتوسیانین‌های برگ

جهت سنجش مقدار آنتوسیانین از روش واگنر استفاده شد (Wagner, 1979). برای این منظور ۰/۰۵ گرم از برگ‌های گیاه شبدر سفید با ۱۰ میلی¬لیتر متانول اسیدی سائیده شد. عصاره به مدت ۲۴ ساعت در تاریکی نگهداری و سپس سانتریفیوژ (۳۰۰۰ دور در دقیقه) گردید و میزان جذب محلول روشناور در طول موج ۵۵۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. برای محاسبه غلظت از ضریب خاموشی $cm^{-1}\ M^{-1}$ ۳۳۰۰۰ استفاده گردید و نتایج بر حسب میکروگرم بر گرم وزن تر ارائه شد.

رابطه ۸ $$A=\varepsilon bc$$

A: جذب نوری، ε: ضریب خاموشی، b: عرض کووت (cm)، c: غلظت نمونه (M)

سنجش مقدار پروتئین محلول کل و فعالیت آنزیم پراکسیداز

مقدار پروتئین محلول کل با استفاده از روش برادفورد (Bradford, 1976) مورد سنجش قرار گرفت. برای تهیه‌ی عصاره، مقدار ۰/۰۵ گرم از برگ‌های تازه ساییده شده در ازت مایع با ۵۰۰ میکرولیتر بافر تریس فسفات مونو بازی سرد (۰/۱ مولار، pH برابر با

۶/۸) مخلوط شده و پس از ۵ دقیقه ورتکس در دمای اتاق، به مدت ۲۰ دقیقه در دمای چهار درجه سانتی‌گراد و نیروی g ۱۰۰۰۰ سانتریفیوژ شدند. از این روشناور برای سنجش مقدار پروتئین محلول کل و فعالیت آنزیم پراکسیداز استفاده گردید.

مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از محلول روشناور حاصل با ۴۹۰۰ میکرولیتر محلول برادفورد مخلوط و پس از مدت ۲۰ دقیقه نگهداری بر روی دستگاه شیکر در دمای اتاق، جذب آنها با دستگاه اسپکتروفتومتر مدل UV-2100 در طول موج ۵۹۵ نانومتر خوانده شد.

مخلوط آنزیمی حاوی ۲۶۰۰ میکرولیتر بافر فسفات منو بازی (۰/۱ مولار، pH برابر با ۶/۸)، ۵۰ میکرولیتر پیروگالول (۲۰ میلی‌مولار)، ۵۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی و ۳۰۰ میکرولیتر پراکسید هیدروژن (۳۰ درصد) تهیه شده و جذب آن دستگاه اسپکتروفتومتر در ۴۲۰ نانومتر و بعد از گذشت یک، دو و پنج دقیقه اندازه گیری شد. فعالیت آنزیم با ضریب خاموشی $cm^{-1}\ mM^{-1}$ ۲/۴۷ محاسبه شد (قادری‌فر و همکاران، ۱۳۹۳).

هر واحد فعالیت آنزیمی معادل مقدار آنزیمی است که یک میکرومول سوبسترای واکنش را در مدت زمان یک دقیقه مصرف می‌کند.

سنجش کربوهیدرات‌های محلول اندام هوایی

جهت سنجش غلظت کربوهیدارت‌های محلول نمونه‌ها، ۰/۱ گرم از هر نمونه خشک با ۱۰ میلی‌لیتر اتانول ۷۰ درصد مخلوط شده و به مدت هفت روز در تاریکی نگهداری شد. یک میلی‌لیتر از محلول روشناور با یک میلی‌لیتر آب مقطر، یک میلی‌لیتر فنول پنج درصد (w/v) و پنج میلی‌لیتر اسیدسولفوریک مخلوط شده و به مدت ۳۰ دقیقه در یخچال نگهداری گردید. سپس میزان جذب نوری محلول توسط دستگاه اسپکتوفتومر و در طول موج ۴۸۵ نانومتر اندازه‌گیری شد. جهت محاسبه غلظت کربوهیدرات کل، از نمودار استاندارد گلوکز استفاده گردید (Kennedy & Chapin, 1994).

اندازه گیری غلظت عناصر

پس از آماده‌سازی نمونه‌های ریشه و اندام هوایی گیاهان، غلظت عناصر نیکل، آهن، روی و مس با استفاده از دستگاه طیف¬سنج جذب اتمی مدل (HITACHI-7JO-8324) تعیین گردید. برای آماده‌سازی نمونه ها، ۰/۱ گرم نمونه خشک با دو میلی‌لیتر نیتریک اسید ۶۰ درصد (v/v) مخلوط شده و پس از گذشت ۲۴ ساعت ،در حمام بخار آب با دمای ۹۰ درجه سانتی‌گراد (به مدت دو ساعت) نگهداری شد. نمونه‌ها سرد شده و یک میلی‌لیتر پراکسیدهیدروژن به آنها اضافه گردید و به مدت ۳۰ دقیقه در حمام بخار آب با دمای ۹۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. حجم نمونه‌ها پس از سرد شدن با استفاده از آب مقطر به ۱۰ میلی‌لیتر رسانده شد (Zhong *et al.*, 2016).

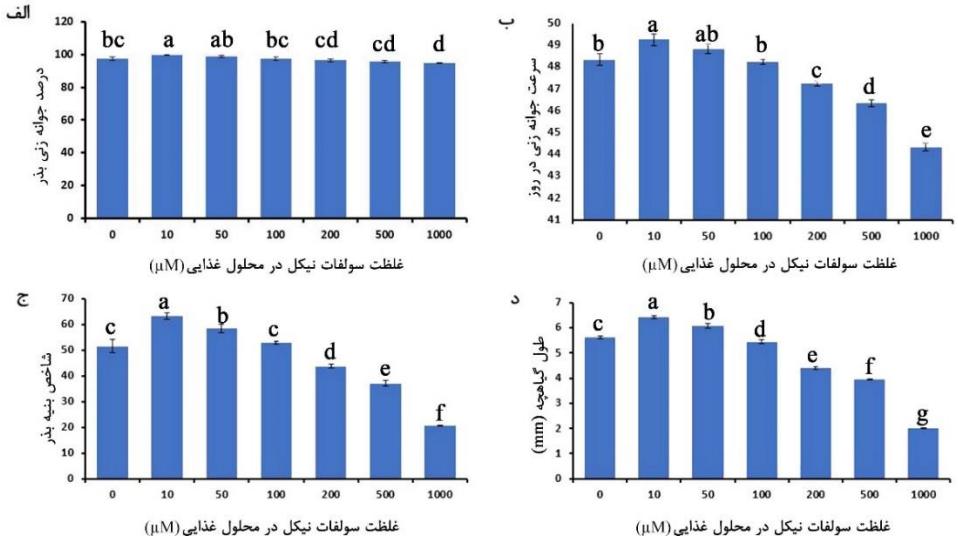
تجزیه و تحلیل داده‌ها

در نهایت، تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزارهای SPSS و Excel انجام گردید. مقایسه میانگین داده‌ها (آنالیز واریانس one-way ANOVA) با استفاده از آزمون دانکن انجام گرفت. *p*-value کمتر از ۰/۰۵ به عنوان تفاوت معنی‌دار بین داده‌ها در نظر گرفته شد.

نتایج و بحث

بررسی شاخص‌های جوانه‌زنی بذر گیاه شبدر سفید تحت تیمار نیکل

تجزیه واریانس اثر سطوح مختلف نیکل بر شاخص‌های جوانه‌زنی شبدر سفید، نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار شاخص‌های درصد جوانه‌زنی، سرعت جوانه‌زنی، شاخص بنیه و طول گیاهچه در سطح احتمال یک درصد است. بررسی اثر غلظت‌های مختلف نیکل بر درصد و سرعت جوانه‌زنی نشان داد که تاثیر غلظت‌های ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰ و ۵۰۰ میکرومولار نیکل نسبت به سطح شاهد تفاوت معنی‌داری نداشت. در حالی‌که، اثر غلظت‌های ۱۰ و ۱۰۰۰ میکرومولار نیکل بر درصد و سرعت جوانه‌زنی نسبت به شاهد، به ترتیب افزایش و کاهش معنی‌دار را نشان داد. بیشترین درصد و سرعت جوانه‌زنی بذر (به ترتیب ۹۹/۷ درصد و ۶۶/۵) و کمترین آن (به ترتیب ۹۴/۷ درصد و ۶۲/۹)، برای سطوح ۱۰ و ۱۰۰۰ میکرومولار نیکل به دست آمد که به ترتیب نسبت به شاهد ۲/۴ و ۲/۷۴ درصد افزایش و کاهش داشتند (شکل ۱، الف و ب).



شکل ۱- مقایسه‌ی اثر سطوح مختلف نیکل در محلول غذایی هوگلند بر شاخص‌های جوانه‌زنی بذر گیاه شبدر سفید (*Trifolium repens*)، (الف) درصد جوانه‌زنی بذر، (ب) سرعت جوانه‌زنی بذرها در روز، (ج) شاخص بنیه بذر و (د) طول گیاهچه (میلی‌متر). حروف غیرمشترک نشان‌دهنده‌ی تفاوت معنی‌دار میانگین‌ها، بر اساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن است ($p \leq 0.05$).

اثر غلظت‌های ۱۰ و ۵۰ میکرومولار نیکل بر شاخص بنیه‌ی بذر و طول گیاهچه نسبت به شاهد، منجر به افزایش معنی‌دار گردید، در حالی‌که اثر غلظت ۱۰۰ میکرومولار نیکل بر این دو شاخص، نسبت به شاهد تفاوت معنی‌داری را نشان نداد و اثر غلظت‌های ۲۰۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میکرومولار بر این شاخص‌ها، نسبت به شاهد، به صورت معنی‌دار کاهشی بود. بیشترین شاخص بنیه بذر و طول گیاهچه (به ترتیب ۶۳/۴ و ۶/۴ میلی‌متر) و کمترین آنها (به ترتیب ۲۰/۷ و ۲ میلی‌متر) برای سطوح ۱۰ و ۱۰۰۰ میکرومولار نیکل، به دست آمد (شکل ۱، ج و د). تیمارهای ۱۰ و ۱۰۰۰ میکرومولار نیکل به ترتیب منجر به افزایش ۲۳/۳ و کاهش ۵۹/۷۵ درصدی شاخص بنیه بذر نسبت به شاهد (غلظت صفر نیکل) گردیدند، در حالی‌که بذرهای تیمارشده با این دو غلظت عنصر نیکل به ترتیب افزایش ۱۴/۱ و کاهش ۶۴/۳۵ درصدی طول گیاهچه را نسبت به شاهد نشان دادند. به‌طورکلی، سطوح پایین و بالای نیکل به ترتیب، اثر افزایشی و کاهشی بر شاخص‌های جوانه‌زنی بذر گیاه شبدر سفید داشت. در مطالعه‌ای بر روی گیاه یونجه (*Medicago sativa* L.)، با بالا رفتن غلظت فلز نیکل در محیط کشت، جوانه‌زنی بذر، طول ریشه‌چه و ساقه‌چه گیاه کاهش پیدا کرد (Peralta *et al*., 2001). فلزات سنگین در محیط جوانه‌زنی به علت نفوذ سریع به داخل بذر همراه با آب از طریق تأثیر بر فرایندهای فیزیولوژیکی و ممانعت از تقسیم سلول‌ها، در رشد گیاهچه اختلال ایجاد می‌کنند (Márquez-García *et al*., 2013). علت کاهش درصد جوانه‌زنی بذر شبدر سفید می‌تواند ناشی از افزایش پتانسیل اسمزی محلول و کاهش قدرت جذب آب توسط بذر و ایجاد سمیت برای بذرها باشد (Taiz & Zeiger, 2002). سطوح بالای فلزات سنگین منجر به کاهش رشد گیاهچه می‌شود که علت این کاهش را می‌توان، کاهش مقدار و فعالیت آنزیم‌های هیدرولیتیک در آندوسپرم و لپه‌ها دانست. زمانی‌که فلز سنگین مقدار و فعالیت این آنزیم‌ها را تحت تأثیر قرار می‌دهد به مقدار کافی مواد آلی مورد نیاز به گیاهچه‌ی در حال رشد نمی‌رسد و در نتیجه طول گیاهچه‌ها را تحت تأثیر قرار می‌دهد (Kabir *et al*., 2008).

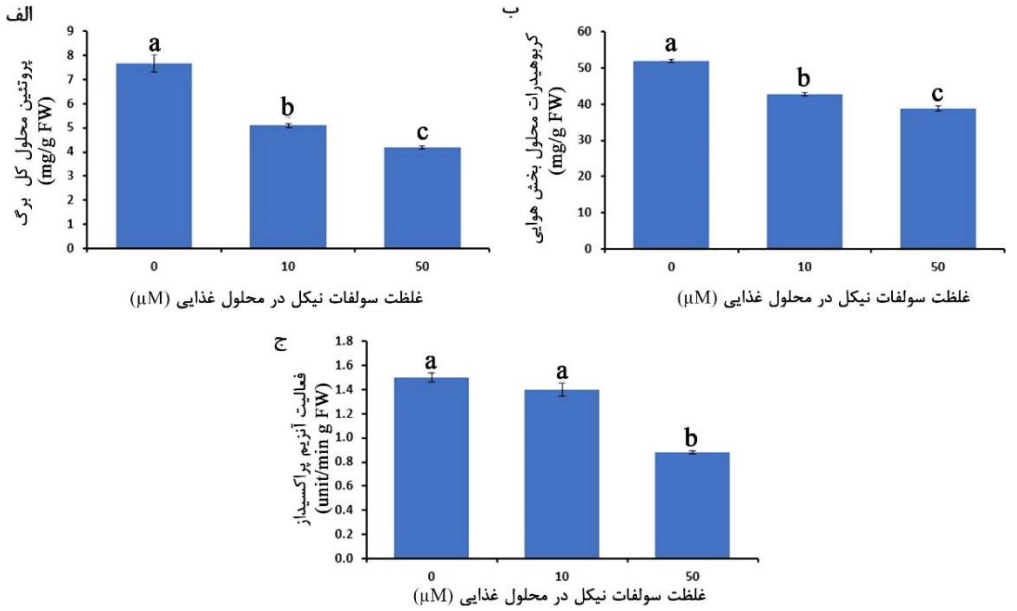
بررسی شاخص‌های فیزیولوژیک گیاه شبدر سفید (*T. repens*) تحت تیمار نیکل

سطوح ۱۰۰ میکرومولار و بالاتر نیکل در محلول غذایی، منجر به کلروز، کاهش شدید رشد و در نهایت مرگ گیاهچه‌های شبدر سفید، حدود دو هفته پس از اعمال تیمار گردید. بنابراین در ادامه‌ی این پژوهش، اثرات سطوح صفر (شاهد)، ۱۰ و ۵۰ میکرومولار نیکل، بر شاخص‌های مورد نظر سنجش و ارزیابی شد.

همان‌طور که شکل ۲ (الف و ب) نشان می‌دهد غلظت‌های ۱۰ و ۵۰ میکرومولار نیکل در محلول غذایی، منجر به کاهش تدریجی معنی‌دار پروتئین محلول کل (به ترتیب کاهش ۱۷/۸ و ۲۵/۲۵ درصدی) و کربوهیدرات‌های بخش هوایی گیاهان (به ترتیب کاهش ۳۳/۴ و ۴۵/۲۵ درصدی) نسبت به شاهد گردید. عناصر سنگین منجر به کاهش زیست‌توده گیاه می‌شوند و این کاهش می‌تواند ناشی از کاهش و اختلال در سنتز پروتئین باشد (Manivasagaperumal *et al*., 2011). تحت تنش فلز سنگین رادیکال‌های اکسیژن تولید و منجر به آسیب‌های اکسیداتیو بر نوکلئیک اسیدها، چربی‌ها، پروتئین‌ها، اختلال در فرایندهای متابولیسم سلولی، فتوسنتز، تنفس و کاهش رشد می‌شوند (Mishra *et al*., 2006). نتایج مربوط به تحقیقات مختلف نشان می‌دهد که میزان کربوهیدرات محلول و نامحلول در گیاهان رشد یافته تحت تنش فلزات سنگین، با توجه به غلظت به کار رفته از فلزات در آزمایش، می‌تواند افزایش یا کاهش یابد (John *et al*., 2008). چنانچه مطالعه بر روی گیاهان ذرت و سویا نشان داد که با افزایش غلظت عنصر نیکل در محیط رشد گیاه،

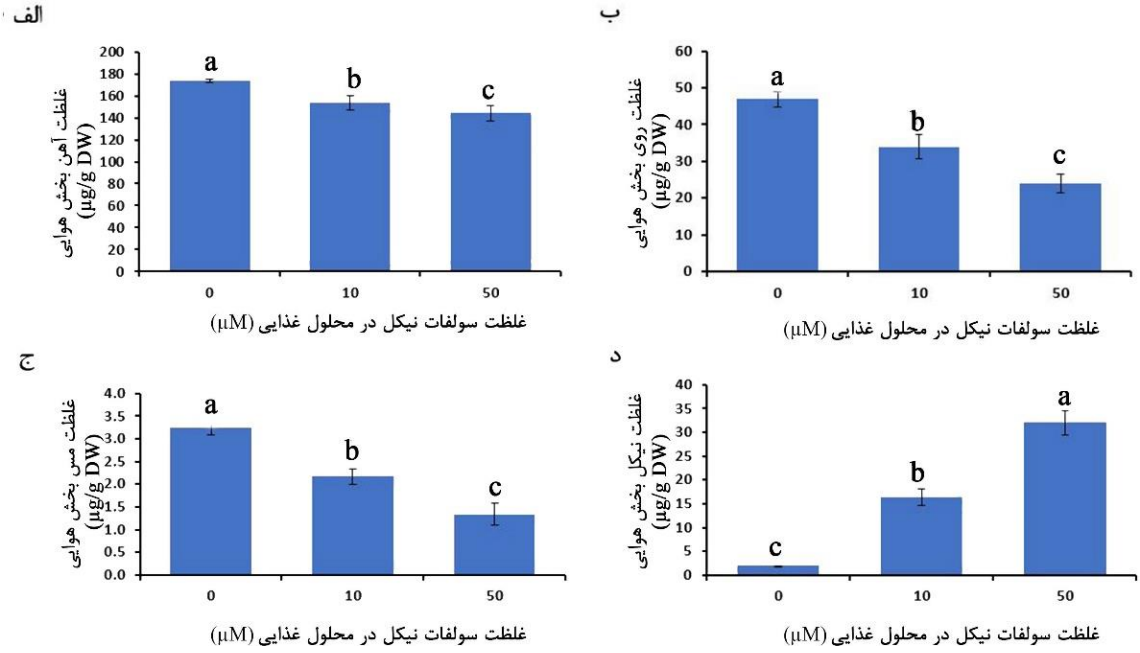
محتوای کربوهیدرات برگ دچار کاهش معنی‌دار می‌گردد که با مطالعه حاضر هم‌خوانی دارد (Nie *et al*., 2015; Duan *et al*., 2020). افزایش محتوای کربوهیدرات اندام هوایی گیاه در مواردی مشاهده شده است که غلظت نیکل در حد سمیت برای گیاه بالا بوده است (Hassan *et al*., 2019). اگر غلظت فلزات سنگین زیاد باشد در سوخت و ساز قندها در گیاهان اختلال ایجاد می¬شود، به طور کلی مقدار قندهای کل در گیاهان حاکی از اثر سمی فلزات سنگین روی سوخت و ساز کربن است (Hattab *et al*., 2009). یکی از عوامل افزایش قندهای محلول (در حضور مقدار بالای نیکل) را می‌توان افزایش آنزیم‌های تجزیه کننده‌ی قندهای غیرمحلول مانند انورتاز و سوکروز سنتتاز و همچنین کاهش مصرف این قندها دانست (Verma & Dubey, 2001).

تیمار سطح ۱۰ میکرومولار نیکل در محلول غذایی هوگلند، منجر به اختلاف معنی‌دار فعالیت آنزیم پراکسیداز برگ گیاه شبدر سفید (کاهش ۶ درصدی)، نسبت به تیمار شاهد نگردید، ولی سطح ۵۰ میکرومولار نیکل بر این شاخص، اثر کاهشی (۴۰/۹ درصد نسبت به شاهد) داشت. آسیب‌های وارد شده به گیاه در پی تنش فلز سنگین به دلیل ایجاد رادیکال‌های آزاد اکسیژن است که در این موقعیت آنزیم‌های مختلفی نظیر سوپراکسیددیسموتاز، کاتالاز، پلی‌فنول اکسیداز، پراکسیداز و اسکوربات پراکسیداز وارد عمل شده و با مکانیسم‌های مختلف، این رادیکال‌ها را از بین می برند (Schutzendubel & Polle, 2002). برخلاف نتایج این تحقیق، در پژوهشی دیگر، مشاهده گردید که اعمال تیمار فلز سنگین بر گیاه لوبیا چیتی، موجب افزایش فعالیت آنزیم پراکسیداز می‌شود (امینی و بلوچی، ۱۳۹۶). بنابراین، به نظر می‌رسد این گیاه، توانایی استفاده از این پتانسیل آنتی‌اکسیدانی، جهت مقاومت به نیکل را ندارد.



شکل ۲- مقایسه‌ی اثر سطوح مختلف نیکل در محلول غذایی هوگلند بر شاخص‌های فیزیولوژیک گیاه شبدر سفید (*Trifolium repens*)، (الف) پروتئین کل محلول برگ (mg/g FW)، (ب) کربوهیدرات محلول بخش هوایی (mg/g FW) و (ج) فعالیت آنزیم پراکسیداز (unit/min g FW). حروف غیرمشترک نشان‌دهنده‌ی تفاوت معنی‌دار میانگین‌ها، بر اساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن می‌باشد ($p \leq 0.05$).

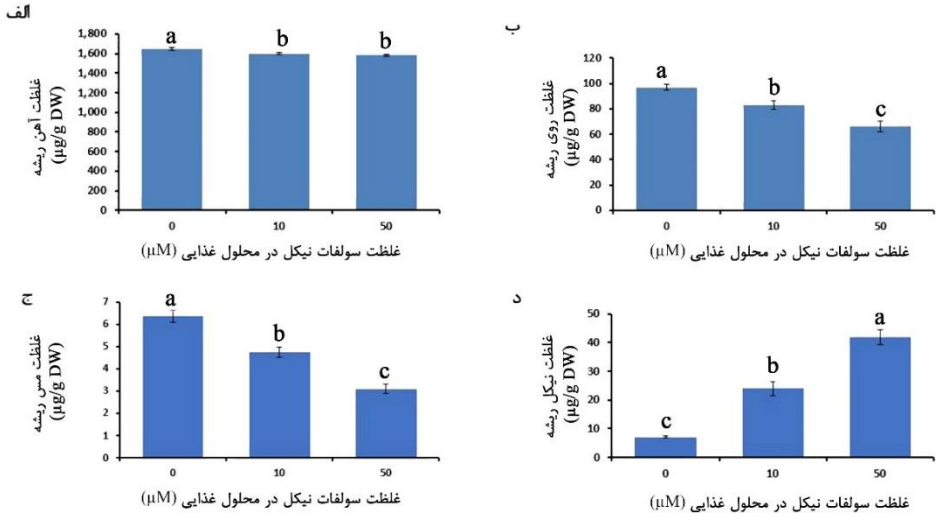
سطوح ۱۰ و ۵۰ میکرومولار نیکل در محلول غذایی، بدون داشتن اختلاف معنی‌دار نسبت به هم‌دیگر، منجر به کاهش معنی‌دار مقدار آهن، روی و مس بخش هوایی (شکل ۳، الف، ب و ج) و ریشه‌ی (شکل ۴، الف، ب و ج) گیاه شبدر سفید نسبت به شاهد گردید. درصد کاهش غلظت این عناصر در بخش هوایی گیاهان تیمار شده با سطوح ۱۰ و ۵۰ میکرومولار نیکل نسبت به شاهد، به ترتیب ۱۱/۵ و ۱۶/۷ درصد برای آهن، ۲۷/۶۶ و ۴۸/۹۴ درصد برای روی و ۳۱/۲۵ و ۶۵/۲۵ درصد برای مس و در ریشه به ترتیب، ۲/۰۳ و ۴/۴۸ درصد برای آهن، ۱۴/۴۴ و ۳۲ درصد برای روی و ۲۶/۵۷ و ۵۱/۵۷ درصد برای مس مشاهده گردید. اثر سطوح ۱۰ و ۵۰ میکرومولار نیکل در محلول غذایی، با روندی مشابه، منجر به افزایش معنی‌دار مقدار نیکل بخش هوایی (تا حدود ۱۶ برابر) و ریشه (تا حدود ۷ برابر) در گیاه شبدر سفید نسبت به شاهد گردید (شکل ۳ و ۴، د).



شکل ۳- مقایسه‌ی اثر سطوح مختلف نیکل در محلول غذایی هوگلند بر غلظت عناصر غذایی در اندام هوایی شبدر سفید (*Trifolium repens*)، (الف) غلظت آهن (µg/g DW)، (ب) غلظت روی (µg/g DW)، (ج) غلظت مس(µg/g DW) و (د) غلظت نیکل اندام هوایی (µg/g DW). حروف غیرمشترک نشان‌دهنده‌ی تفاوت معنی‌دار میانگین‌ها، بر اساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن است ($p \leq 0.05$).

نیکل برای جذب و انتقال با دیگر مواد غذایی رقابت می‌کند و این می تواند غلظت بسیاری از دیگر مواد مغذی گیاه را تا سطح کمبود تحت تاثیر قرار دهد. بنابراین، در شرایطی که گیاه تحت تنش نیکل قرار دارد، معمولا غلظت های بسیاری از مواد مغذی مانند آهن، مس، روی، منیزیوم و منگنز کاهش می‌یابد (Krupa & Basznski, 1995). آهن یکی از عناصر ضروری برای گیاه است که در ساختار هموپروتئین‌ها و پروتئین‌های حاوی خوشه‌های Fe-S و سنتز کلروفیل نقش مهمی داشته و نیکل نیز عنصر ضروری بوده که در فعال‌سازی آنزیم مالات دهیدروژناز نقش دارد ولی بیش‌بود آن در هم‌ایستایی آهن دخالت می‌کند (عزیزی و قاسمی، ۱۳۸۹). گیاهان به راحتی نیکل در دسترس را جذب و به صورت عمده آن را در ریشه انباشت می‌کنند، گرچه در برخی گونه‌ها، نیکل جذب

شده به اندام هوایی گیاه نیز منتقل می‌شود (Alloway, 1995). در مطالعه حاضر، فلز نیکل به میزان بیشتری در ریشه نسبت به بخش هوایی انباشته گردید که با نتایج مطالعه‌ای که به بررسی اثر غلظت‌های مختلف نیکل بر *Trigonella corniculata* L. پرداخته است، مطابقت دارد (Parida *et al*., 2003). مطالعات نشان داده است که نیکل با آهن در تشکیل کمپلکس با لیگاندهایی چون سیترات و نیکوتین‌آمین که مسئول انتقال آهن هستند، رقابت می‌کند و پویایی کمپلکس را کاهش می‌دهد (Saito *et al*., 2010). مشابه با نتایج این تحقیق، مطالعات نشان دادند که در حضور افزایش غلظت نیکل، جذب روی در ریشه کاهش می‌یابد (Mishra & Kar, 1974). نیکل، با عنصر روی در فرایند جذب توسط سلول‌های ریشه رقابت می‌کند (Nishida *et al*., 2011). علاوه بر این، نیکل دارای تحرک بالایی است و می‌تواند از برگ‌های پیرتر به برگ‌های جوان‌تر گیاه جا به جا شود (Gray & Mclaren, 2006). دلیل نگهداری بیشتر نیکل در ریشه، توقف نیکل در جایگاه‌های مبادله کاتیون دیواره‌های آوند و پارانشیم آوند چوبی است (Seregin & Kozhevinkova, 2006).

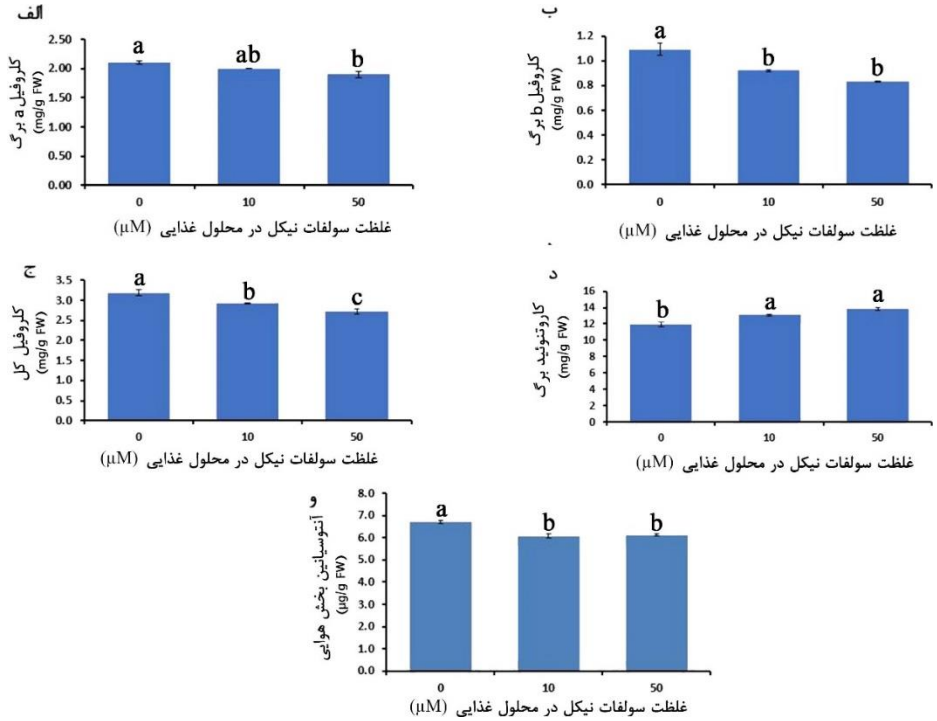


شکل ۴- مقایسه‌ی اثر سطوح مختلف نیکل در محلول غذایی هوگلند بر غلظت عناصر غذایی در ریشه شبدر سفید (*Trifolium repens*)، (الف) غلظت آهن (µg/g DW)، (ب) غلظت روی (µg/g DW)، (ج) غلظت مس(µg/g DW) و (د) غلظت نیکل ریشه (µg/g DW). حروف غیرمشترک نشان‌دهنده‌ی تفاوت معنی‌دار میانگین‌ها، بر اساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن می‌باشد ($p \leq 0.05$).

بررسی رنگیزه‌های گیاه شبدر سفید (*T. repens*) تحت تیمار نیکل

اثر سطح ۱۰ میکرومولار نیکل در محلول غذایی بر کلروفیل a نسبت به شاهد و سطح ۵۰ میکرومولار نیکل معنی‌دار نبود، ولی سطح ۵۰ میکرومولار نیکل میزان کلرفیل a را نسبت به شاهد به صورت معنی‌داری (۹/۵۳ درصد) کاهش داد (شکل ۵، الف). سطوح ۱۰ و ۵۰ میکرومولار نیکل، منجر به کاهش معنی‌دار مقدار کلروفیل b گیاه شبدر سفید (به ترتیب ۱۵/۶ و ۲۳/۸۶ درصد) و آنتوسیانین آن (به ترتیب ۷/۷۹ و ۵/۴ درصد) نسبت به شاهد شدند (شکل ۵، ب و د). دو تیمار نیکل با روند تدریجی، مقدار کلروفیل

کل گیاه شبدر سفید را نسبت به شاهد به صورت معنی‌داری (به ترتیب ۸/۴۷ و ۱۴/۴۳ درصد) کاهش دادند (شکل ۵، ج). افزایش معنی‌دار مقدار کاروتنوئید گیاه شبدر سفید نسبت به شاهد (به ترتیب ۹/۱ و ۱۵ درصد)، در اثر اعمال تیمارهای ۱۰ و ۵۰ میکرومولار نیکل مشاهده گردید (شکل ۵، و). به‌طورکلی می‌توان بیان کرد که، تیمار نیکل، اثر کاهشی بر کلروفیل و آنتوسیانین و اثر افزایشی بر کاروتنوئیدهای گیاه شبدر سفید داشته است.



شکل ۵- مقایسه‌ی اثر سطوح مختلف نیکل در محلول غذایی هوگلند بر غلظت رنگیزه‌های فتوسنتزی گیاه شبدر سفید (*Trifolium repens*)، (الف) غلظت کلروفیل a (mg/g FW)، (ب) کلروفیل b (mg/g FW)، (ج) کلروفیل کل (mg/g FW)، (د) غلظت کارتنوئید برگ (mg/g FW) و (و) غلظت آنتوسیانین بخش هوایی (mg/g FW). حروف غیرمشترک نشان‌دهنده‌ی تفاوت معنی‌دار میانگین‌ها، بر اساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن است ($p \leq 0.05$).

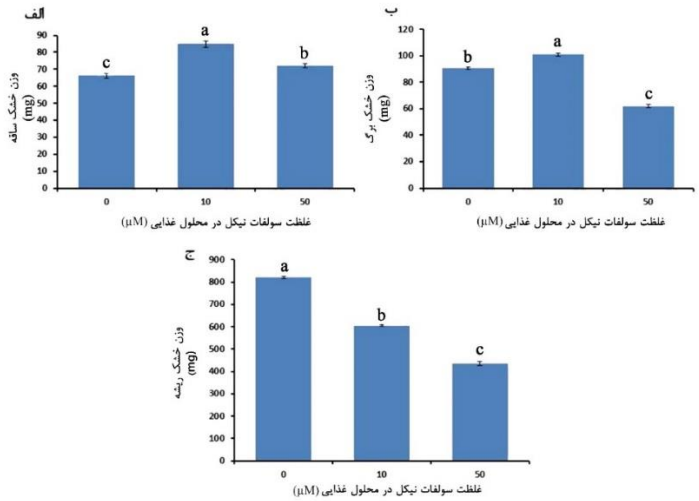
سمیت نیکل در گیاهان، رنگیزه‌های فتوسنتزی (کلروفیل a و b و کارتنوئیدها) را تحت تاثیر قرار می‌دهد (Seregin & Kozhevnikova, 2006) که منجر به کلروز و نکروز برگ‌های گیاه می‌گردد (Gajewska *et al*., 2006). تنش نیکل، غلظت رنگیزه‌های فتوسنتزی را به میزان قابل توجهی در آفتابگردان کاهش داد (Ahmad *et al*., 2011). مهار آنزیم‌های پروتوکلروفیل ردوکتاز و آلفا-آمینو لوالونیک اسید دهید روژناز توسط فلزات سنگین، منجر به مهار بیوسنتز کلروفیل می‌شود. برهم‌کنش متقابلی که بین گروه سولفیدریل آنزیم‌ها و فلزات سنگین وجود دارد، اساسی‌ترین مکانیسم برای مهار فتوسنتز محسوب می‌شود (Soltani *et al*., 2006). تنش فلزات سنگین وابسته به نوع فلز و گونه گیاه می‌تواند منجر به کاهش یا افزایش تولید کاروتنوئیدها گردد (Fargašová, 1998; Sinha *et al*., 2003). قرار گرفتن گیاه *Vicia faba* در معرض فلزات سنگین و تیمار گیاه *Arabidopsis*

thaliana توسط فلز سرب منجر به افزایش تولید کاروتنوئیدها گردید (Azooz *et al*., 2011; Baek *et al*., 2012). ترکیب‌های فنلی، آنتوسیانین‌ها و کـــاروتنـــوئیدها عمدتـــا گـــزینه‌های اصلی جهت مقـابله با رادیکال‌های آزاد در تنش‌های مرتبط با فلزات سنگین هستند (Posmyk *et al*., 2009). آنتوسیانین‌ها نیز، از مهم‌ترین ترکیبات آنتی‌اکسیدانی در گیاهان هستند. این ترکیبات نه تنها رادیکال‌های آزاد را از بین می‌برند، بلکه از تولید بیشتر آن‌ها در گیاه جلوگیری می‌کنند. آنتوسیانین‌ها به احتمال زیاد باعث تسهیل ورود فلزات سنگین به واکوئل سلول‌ها و در نتیجه جمع‌آوری آن‌ها از سایر بخش‌ها می‌شوند (Tripathi *et al*., 2006). به نظر می‌رسد گیاه شبدر سفید با افزایش تولید کاروتنوئیدها سعی بر مقابله با اثرات اکسیداتیو فلز نیکل داشته است.

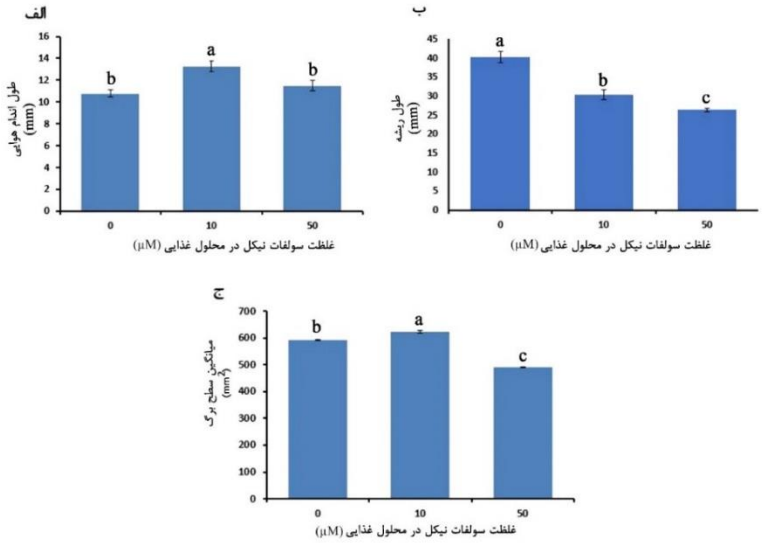
بررسی شاخص‌های رویشی گیاه شبدر سفید (*T. repens*) تحت تیمار نیکل

سطوح ۱۰ و ۵۰ میکرومولار نیکل در محلول غذایی، ضمن داشتن اختلاف معنی‌دار نسبت به یکدیگر، منجر به افزایش معنی‌دار وزن خشک ساقه گیاه شبدر سفید (تا حدود ۲۸ درصد) نسبت به شاهد گردید (شکل ۶، الف). تیمار ۱۰ و ۵۰ میکرومولار نیکل، به ترتیب منجر به افزایش ۱۲/۳ درصدی و کاهش ۳۱/۱ درصدی وزن خشک برگ (شکل ۶، ب) و افزایش ۵ درصدی و کاهش ۱۷/۳ درصدی سطح برگ گیاه (شکل ۷، ج) نسبت به شاهد گردید. غلظت ۱۰ میکرومولار نیکل، طول اندام هوایی را به صورت معنی‌داری افزایش داد (۲۳/۲۵ درصد)، ولی غلظت۵۰ میکرومولار آن منجر به تغییر معنی دار طول اندام هوایی نگردید (شکل ۷، الف). وزن خشک ریشه گیاه شبدر سفید تا حدود ۵۹ درصد و طول ریشه تا حدود ۵۰ درصد نسبت به شاهد، تحت تاثیر غلظت های ۱۰ و ۵۰ میکرومولار نیکل به صورت معنی‌داری کاهش یافت (به ترتیب شکل ۶، ج و شکل ۷، ب).

کاهش شاخص‌های رشد گیاه شبدر سفید تحت تنش غلظت‌های بالای نیکل، می‌تواند ناشی از کاهش محتوی کلروفیل و به تبع آن کاهش فتوسنتز، کاهش محتوی کربوهیدرات‌ها و پروتئین‌ها، تجمع مقادیر سمی نیکل در گیاه و کاهش غلظت روی و آهن گیاه باشد. عنصر نیکل باعث کاهش در وزن تر ریشه، برگ، ساقه و وزن خشک بخش هوایی و ریشه‌ی گیاهان و در مجموع منجر به کاهش زیست‌توده گیاهی می‌شود (Fuentes *et al*., 2007). با بالارفتن سطوح آلودگی نیکل کاهش در رشد گیاه دیده می‌شود که این کاهش با کاهش در تقسیم سلولی و طویل شدن مرتبط است (Molas, 2002). در ساختار رشد در اثر بالا رفتن غلظت نیکل منجر به کاهش در جذب مواد غذایی شده که این فرایند منجر به کاهش در رشد و وزن خشک گیاه می‌شود (Fuentes *et al*., 2007). در گزارشی، اعمال تیمار نیکل، مانع رشد ریشه‌ی گیاه گندم شد و این کاهش رشد، توسط کاهش در وزن تر و طول ریشه نمایان گردید (Gajewska *et al*., 2006). ریشه و اندام هوایی در مقابل غلظت‌های گوناگون نیکل از خود پاسخ رشدی متمایزی نشان می‌دهند که این عملکرد می‌تواند ناشی از این باشد که ریشه‌چه نسبت به اندام هوایی زودتر پوسته‌ی دانه را می‌شکند و نمایان می‌شود پس زودتر تحت تأثیر غلظت‌های بالای نیکل قرار می‌گیرد و دیگر اینکه، انتقال نیکل از ریشه‌چه به اندام هوایی کمتر صورت می‌گیرد که با یافته‌ی محققین مطابقت دارد (Li *et al*., 2009). از عوامل اصلی کاهش رشد اندام هوایی، می‌توان آسیب‌های ریشه‌ای ناشی از فلزات سنگین و کاهش محتوی کلروفیل و اختلال در فتوسیستم I را نام برد (Ewais, 1997). در پژوهشی دیگر که گیاه (*Silene italic*) تحت تـــأثیر نیکل قرار گرفت، سطح برگ گیاه کاهش یافت که ناشی از ممانعت غلظت‌های سمی نیکل از تقسیم سلولی بود (Gabbrielli *et al*., 1990).



شکل ۶- مقایسه‌ی اثر سطوح مختلف نیکل در محلول غذایی هوگلند بر شاخص‌های رویشی گیاه شبدر سفید (*Trifolium repens*)، (الف) وزن خشک ساقه (mg)، (ب) وزن خشک برگ (mg) و (ج) وزن خشک ریشه (mg). حروف غیرمشترک نشان‌دهنده‌ی تفاوت معنی‌دار میانگین‌ها، بر اساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن است ($p \leq 0.05$).



شکل ۷- مقایسه‌ی اثر سطوح مختلف نیکل در محلول غذایی هوگلند بر شاخص‌های رویشی گیاه شبدر سفید (*Trifolium repens*)، (الف) طول اندام هوایی (mm)، (ب) طول ریشه (mm) و (ج) میانگین سطح برگ (mm^2). حروف غیرمشترک نشان‌دهنده‌ی تفاوت معنی‌دار میانگین‌ها، بر اساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن است ($p \leq 0.05$).

نتیجه‌گیری کلی

در این پژوهش که اثر تیمار سطوح مختلف نیکل (غلظت‌های صفر، ۱۰، ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میکرومولار) بر شاخص-های جوانه‌زنی بذر و شاخص‌های بیوشیمیایی و فیزیولوژیک گیاه شبدر سفید مورد بررسی قرار گرفت، درصد و سرعت جوانه‌زنی، شاخص بنیه‌ی بذر و طول گیاهچه، در حضور سطوح پایین و بالای تیمار نیکل، به ترتیب افزایش و کاهش پیدا کرد. در شرایط کشت هیدروپونیک، سطوح ۱۰۰ میکرومولار و بالاتر نیکل، منجر به مرگ گیاهچه‌ها گردید. با افزایش غلظت تیمار نیکل، غلظت آن در ریشه و اندام هوایی افزایش یافت. غلظت ۱۰ و ۵۰ میکرومولار نیکل به ترتیب منجر به افزایش و کاهش وزن خشک ساقه و طول اندام هوایی، وزن خشک و سطح برگ نسبت به شاهد گردید. با توجه به مقادیر به دست آمده از همه‌ی شاخص‌های رشد گیاه شبدر سفید تحت تیمارهای مختلف نیکل، به نظر می‌رسد سطح مناسب نیکل برای رشد این گیاه، ۱۰ میکرومولار باشد و سطح ۵۰ میکرومولار، در اکثر شاخص‌ها به عنوان غلظت سمی عمل کرده است. همچنین به نظر می‌رسد که شبدر سفید، گیاهی حساس به نیکل بوده وتوانایی تحمل و تجمع نیکل را ندارد. از این رو، رشد و عملکرد آن در مزارعی با آلاینده‌گی نیکل، کاهش می‌یابد و گزینه مناسبی برای اهداف گیاه‌پالایی نیست.

منابع

امینی، ف. و امیرجانی، م. (۱۳۹۱). اثر تیمار نیکل و سرب بر محتوای کلروفیل و تجمع این فلزات در گیاه یونجه. *تولید و فرآوری محصولات زراعی و باغی*، ۲(۶): ۱۱-۲۰.

امینی، ف. و بلوچی، ح. ر. (۱۳۹۶). تأثیر فلزات سنگین و ترکیبات مختلف بستر کاشت بر آنزیم‌های پاداکساینده و عملکرد لوبیا چیتی (*Phaseolus vulgaris* L.cv. Sadri). *پژوهش‌های گیاهی*، ۳۰(۳): ۴۹۸-۵۱۱.

سوهانی، م. ه. (۱۳۸۹). کنترل و گواهی بذر. چاپ سوم، انتشارات دانشگاه گیلان، ۳۰۶ صفحه.

شهبازی، م. و محقق¬دوست، ز. ت. (۱۳۷۵). بررسی اثرات سدیم کلراید بر رشد و انباشت ترکیبات آلی و معدنی در گندم. *علوم کشاورزی ایران*، ۲۷(۴): ۶۹-۷۸.

عباسی، م.ر. و زمانیان، م. ه. (۱۳۸۴). بررسی پتانسیل تولید، صفات مهم در عملکرد و گروه‌بندی ژرم پلاسم شبدرهای ایرانی چند چین. اولین همایش ملی گیاهان علوفه‌ای، کرج، ایران.

عزیزی، م. و قاسمی، ز. (۱۳۸۹). تحریک انباشت نیکل در شرایط کمبود آهن در گیاه *Alyssum inflatum*. پایان نامه کارشناسی‌ارشد فیزیولوژی، گروه زیست‌شناسی، پیام نور اصفهان، اصفهان، ایران.

قادری فر، ف. سلطانی، ا. و صادقی پور، ح.ر. (۱۳۹۳). تغییرات بیوشیمیایی طی زوال بذرهای کدویی تخم کاغذی پراکسیداسیون لیپید و صدمات غشا. *زیست‌شناسی گیاهی ایران*، ۶(۱): ۹۶-۱۱۲.

مهدویان،ک. قربانلی، م. منوچهری کلانتری، خ. و محمدی، غ. (۱۳۸۵). تأثیر باندهای مختلف اشعه‌ی ماوراء بنفش بر عوامل فیزیولوژیکی و ریخت‌شناسی فلفل (*Capsicum annuum* L.). *زیست‌شناسی ایران*، ۳۳(۳): ۵۰-۶۰.

Abdul-baki, A. A. & Anderson, J. D. (1973). Vigor determination in soybean seed by multiple criteria. *Journal of Crop Science*, 13(6): 630-633.

Aggarwal, N. I. D. H. I., Laura, J. S. & Sheoran, I. S. (1990). Effect of cadmium and nickel on germination, early seedling growth and photosynthesis of wheat and pigeonpea. *International Journal of Tropical Agriculture*, 8(2): 141-147.

Ahmad, M. S. A., Ashraf, M. & Hussain, M. (2011). Phytotoxic effects of nickel on yield and concentration of macro- and micro-nutrients in sunflower (*Helianthus annuus* L.) achenes. *Journal of Hazardous Materials*, 185(2-3): 1295-1303.

Alloway, B. J. (1995). Heavy metal in soils. Springer.

Aschmann, S. G., & Zasoski, R. J. (1987). Nickel and rubidium uptake by whole oat plants in solution culture. *Physiologia Plantarum*, 71(2): 191-196.

Azooz, M. M., Youssef, M. M. & Al-Omair, M. A. (2011). Comparative evaluation of zinc and lead and their synergistic effects on growth and some physiological responses of *Hassawi okra* (*Hibiscus esculentus*) seedlings. *American Journal of Plant Physiology*, 6(6): 269-282.

Baek, S. A., Han, T., Ahn, S. K., Kang, H., Cho, M. R., Lee, S. C. & Im, K. H., 2012. Effects of heavy metals on plant growths and pigment contents in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Pathology Journal*, 28(4): 446-452.

Bouman, R., van Welzen, P., Sumail, S., Echevarria, G., Erskine, P. D. & van der Ent, A. (2018). *Phyllanthus rufuschaneyi*: a new nickel hyperaccumulator from Sabah (Borneo Island) with potential for tropical agromining. *Botanical Studies*, 59(1): 1-12.

Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1-2): 248-254.

Brooks, R. R., Morrison, R. S., Reeves, R. D., Dudley, T. R. & Akman, Y. (1979). Hyperaccumulation of nickel by *Alyssum linnaeus* (Cruciferae). *Biological Sciences*, 203(1153): 387-403.

DalCorso, G., Fasani, E., Manara, A., Visioli, G. & Furini, A. (2019). Heavy metal pollutions: state of the art and innovation in phytoremediation. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(14): 3412.

Duan, Y., Sangani, C. B., Muddassir, M. & Soni, K. V. (2020). Copper, chromium and nickel heavy metal effects on total sugar and protein content in *Glycine max*. DOI: 10.21203/rs.3.rs-107829/v1

Ewais, E. A. (1997). Effects of cadmium, nickel and lead on growth, chlorophyll content and proteins of weeds. *Biologia Plantarum*, 39(3): 403-410.

Fargašová, A. (1998). Root growth inhibition, photosynthetic pigments production, and metal accumulation in *Sinapis alba* as the parameters for trace metals effect determination. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 61(6): 762-769.

Fuentes, D., Disante, K. B., Valdecantos, A., Cortina, J. & Vallejo, V. R. (2007). Response of *Pinus halepensis* Mill. seedlings to biosolids enriched with Cu, Ni and Zn in three Mediterranean forest soils. *Environmental Pollution*, 145(1): 316-323.

Gabbrielli, P., Pandolfini, T., Vergnano, O. & Palandri, M. R. (1990). Comparison of two serpentine species with different nickel tolerance strategies. *Plant and Soil*, 122(2): 271-277.

Gajewska, E., Skłodowska, M., Słaba, M. & Mazur, J. (2006). Effect of nickel on antioxidative enzyme activities, proline and chlorophyll contents in wheat shoots. *Biologia Plantarum*, 50(4): 653-659.

Gheibi, M. N., Malakouti, M. J., Kholdebarin, B., Ghanati, F., Teimouri, S. & Sayadi, R. (2009). Significance of nickel supply for growth and chlorophyll content of wheat supplied with urea or ammonium nitrate. *Journal of Plant Nutrition*, 32(9): 1440-1450.

Gray, C. W. & Mclaren, R. G. (2006). Soil factors affecting heavy metal solubility in some New Zealand soils. *Water, Air, and Soil Pollution*, 175(1): 3-14.

Hassan, M. U., Chattha, M. U., Khan, I., Chattha, M. B., Aamer, M., Nawaz, M. & Khan, T. A. (2019). Nickel toxicity in plants: reasons, toxic effects, tolerance mechanisms, and remediation possibilities—a review. *Environmental Science and Pollution Research*, 26(13): 12673-12688.

Hattab, S., Chouba, L., Ben Kheder, M., Mahouachi, T. & Boussetta, H. (2009). Cadmium-and copper-induced DNA damage in *Pisum sativum* roots and leaves as determined by the Comet assay. *Plant Biosystems*, 143(1): 6-11.

John, R., Ahmad, P., Gadgil, K. & Sharma, S. (2008). Effect of cadmium and lead on growth, biochemical parameters and uptake in *Lemna polyrrhiza* L. *Plant Soil and Environment*, 54(6): 262.

Kabir, M., Iqbal, M. Z., Shafiq, M. & Farooqi, Z. R. (2008). Reduction in germination and seedling growth of *Thespesia populnea* L., caused by lead and cadmium treatments. *Pakistan Journal of Botany*, 40(6): 2419-2426.

Kennedy, J. F. & Chaplin, M. F. (1994). Carbohydrate analysis: a practical approach. Oxford University Press.

Krupa, Z. & Baszynski, T. (1995). Some aspects of heavy metals toxicity towards photosynthetic apparatus-direct and indirect effects on light and dark reactions. *Acta Physiologiae Plantarum*, 2(17).

Li, B., Zhang, X., Wang, X. & Ma, Y. (2009). Refining a biotic ligand model for nickel toxicity to barley root elongation in solution culture. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 72(6): 1760-1766.

Lichtenthaler, H. K. (1987). Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. *Methods in Enzymology*, 148: 350-382.

Manivasagaperumal, R., Vijayarengan, P., Balamurugan, S. & Thiyagarajan, G. (2011). Effect of copper on growth, dry matter yield and nutrient content of *Vigna radiata* (L.) Wilczek. *Journal of Phytology*, 3(3): 53-62.

Márquez-García, B., Márquez, C., Sanjosé, I., Nieva, F. J. J., Rodríguez-Rubio, P. & Muñoz-Rodríguez, A. F. (2013). The effects of heavy metals on germination and seedling characteristics in two halophyte species in Mediterranean marshes. *Marine Pollution Bulletin*, 70(1-2): 119-124.

Mishra, D. & Kar, M. (1974). Nickel in plant growth and metabolism. The Botanical Review, 40(4): 395-452.

Mishra, S., Srivastava, S., Tripathi, R. D., Govindarajan, R., Kuriakose, S. V., and Prasad, M. N. V. (2006). Phytochelatin synthesis and response of antioxidants during cadmium stress in *Bacopa monnieri* L. Plant Physiology and Biochemistry, 44(1): 25-37.

Molas, J. (2002). Changes of chloroplast ultrastructure and total chlorophyll concentration in cabbage leaves caused by excess of organic Ni (II) complexes. *Environmental and Experimental Botany*, 47(2): 115-126.

Nie, J., Pan, Y., Shi, J., Guo, Y., Yan, Z., Duan, X. & Xu, M. (2015). A comparative study on the uptake and toxicity of nickel added in the form of different salts to maize seedlings. *International journal of environmental research and public health*, 12(12): 15075-15087.

Nieminen, T. M., Ukonmaanaho, L., Rausch, N. & Shotyk, W. (2007). Biogeochemistry of nickel and its release into the environment. *Metal Ions in Life Sciences*, 2: 1-30.

Nishida, S., Tsuzuki, C., Kato, A., Aisu, A., Yoshida, J. & Mizuno, T. (2011). AtIRT1, the primary iron uptake transporter in the root, mediates excess nickel accumulation in *Arabidopsis thaliana*. *Plant and Cell Physiology*, 52(8): 1433-1442.

Parida, B. K., Chhibba, I. M. & Nayyar, V. K. (2003). Influence of nickel-contaminated soils on fenugreek (*Trigonella corniculata* L.) growth and mineral composition. *Scientia Horticulturae*, 98(2): 113-119.

Parker, D. R. & Norvell, W. A. (1999). Advances in solution culture methods for plant mineral nutrition research. *Advances in Agronomy*, 65: 151-213.

Peralta-Videa, J. R., Gardea-Torresdey, J. L., Tiemann, K. J., Gomez, E., Arteaga, S., Rascon, E. & Parsons, J. G. (2001). Uptake and effects of five heavy metals on seed germination and plant growth in alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 66(6): 727-734.

Posmyk, M. M., Kontek, R. & Janas, K. M. (2009). Antioxidant enzymes activity and phenolic compounds content in red cabbage seedlings exposed to copper stress. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 72(2): 596-602.

Rahman, H., Sabreen, S., Alam, S., & Kawai, S. (2005). Effects of nickel on growth and composition of metal micronutrients in barley plants grown in nutrient solution. *Journal of Plant Nutrition*, 28(3): 393-404.

Rao, K. M. & Sresty, T. V. S. (2000). Antioxidative parameters in the seedlings of pigeonpea (*Cajanus cajan* (L.) Millspaugh) in response to Zn and Ni stresses. *Plant Science*, 157(1): 113-128.

Saito, A., Saito, M., Ichikawa, Y., Yoshiba, M., Tadano, T., Miwa, E., & Higuchi, K. (2010). Difference in the distribution and speciation of cellular nickel between nickel-tolerant and non-tolerant *Nicotiana tabacum* L. cv. BY-2 cells. *Plant, Cell & Environment*, 33(2): 174-187.

Schutzendubel, A. & Polle, A. (2002). Plant responses to abiotic stresses: heavy metal-induced oxidative stress and protection by mycorrhization. *Journal of Experimental Botany*, 53(372): 1351-1365.

Seregin, I. & Kozhevnikova, A. D. (2006). Physiological role of nickel and its toxic effects on higher plants. *Russian Journal of Plant Physiology*, 53(2): 257-277.

Sinha, S., Bhatt, K., Pandey, K., Singh, S. & Saxena, R. (2003). Interactive metal accumulation and its toxic effects under repeated exposure in submerged plant Najas indica Cham. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 70(4): 0696-0704.

Soltani, A., Gholipoor, M. & Zeinali, E. (2006). Seed reserve utilization and seedling growth of wheat as affected by drought and salinity. *Environmental and Experimental Botany*, 55(1-2): 195-200.

Suman, J., Uhlik, O., Viktorova, J. & Macek, T. (2018). Phytoextraction of heavy metals: a promising tool for clean-up of polluted environment? *Frontiers in Plant Science*, 9: 1476.

Taiz, L. & Zeiger, E. (2002). Plant Physiology. The Benjamin Cummings Publishing Company.

Tripathi, B. N., Mehta, S. K., Amar, A. & Gaur, J. P. (2006). Oxidative stress in Scenedesmus sp. during short-and long-term exposure to Cu2+ and Zn2+. *Chemosphere*, 62(4): 538-544.

Verma, S. & Dubey, R. S. (2001). Effect of cadmium on soluble sugars and enzymes of their metabolism in rice. *Biologia Plantarum*, 44(1): 117-123.

Wagner, G. J. (1979). Content and vacuole/extravacuole distribution of neutral sugars, free amino acids, and anthocyanin in protoplasts. *Plant Physiology*, 64(1): 88-93.

Yan, A., Wang, Y., Tan, S. N., Yusof, M. L. M., Ghosh, S. & Chen, Z. (2020). Phytoremediation: a promising approach for revegetation of heavy metal-polluted land. *Frontiers in Plant Science*, 11: 359.

Zhong, W. S., Ren, T. & Zhao, L. J. (2016). Determination of Pb (Lead), Cd (Cadmium), Cr (Chromium), Cu (Copper), and Ni (Nickel) in Chinese tea with high-resolution continuum source graphite furnace atomic absorption spectrometry. *Journal of Food and Drug Analysis*, 24(1): 46-55.

Evaluation of nickel acumulation and tolerance by *Trifolium repens* L. in hydroponic culture

S. Amir Ahmady[1], T. Asemaneh [2*], A. S. Javanmard[3]

Received: 2021.05. 24

Accepted: 2022.02.22

Abstract

Although nickel is an essential element for plants, it has toxic effects at high concentrations. White clover (*Trifolium repens*) is a widely cultivated forage crop with high biomass. On the other hand, nickel pollution on farms has increased. Accordingly, in this study, the effects of nickel treatments (at 0, 10, 50, 100, 200, 500, and 1000 µM levels) were investigated on seed germination characteristics of the plant in a growth chamber and then on biochemical and physiological parameters in hydroponic culture, in a completely randomized statistical design. The results showed that seed germination, percent and speed, seed vigor, and seedling length increased and decreased with low and high levels of nickel, respectively. Seedlings' death was observed at 100 µM and higher concentrations of nickel. Concentrations of 10 and 50 µM of nickel harmed biochemical parameters including chlorophyll, carbohydrate, protein, and peroxidase activity and raised the content of carotenoids. By increase in levels of nickel treatments, nickel concentrations increased in roots, and shoots. In comparison to the control, the treatments of 10 and 50 µM nickel concentrations led to an increase and decrease in stem dry weight, shoot length, leaf area, and leaf dry weight, respectively. It seems that 10 µM and 50 µM concentrations of nickel function as suitable and toxic levels for the growth of this plant, respectively. It also seems that white clover is a nickel-sensitive plant and not able to tolerate and accumulate nickel, and it is not a proper candidate for phytoremediation.

Key words: Heavy metal resistance, Nickel accumulation, Phytoremediation, Trifolium repens L.

---

1 M.Sc. in Plant Physiology, Yasouj University, Yasuj, Iran.
2 Assistant Professor, Biology Depatment, Yasouj University, Yasuj, Iran.
3 Assistant Professor, Biology Depatment, Yasouj University, Yasuj, Iran.* Corresponding author: asemaneh@yu.ac.ir