نشریه علوم گیاهان زراعی ایران
دوره ۴۵، شماره ۱، بهار ۱۳۹۳ (ص۱۱۸-۱۰۷)

تأثیر نانوذرات نقره، نیکل، روی و روی- مس بر جوانه‌زنی، استقرار و فعالیت‌آنزیمی بذر گیاه یونجه

فاطمه رمضانی[۱]، علی شایان‌فر[۱]، رضا توکل‌افشاری[۲*] و کرامت‌الله رضایی[۳]
۱، کارشناسان ارشد، رشتهٔ علوم و تکنولوژی بذر،۲ و۳، استادان، پردیس کشاورزی و منابع‌طبیعی دانشگاه تهران، کرج، ایران.
(تاریخ دریافت: ۹۱/۷/۱۹ – تاریخ تصویب: ۹۳/۲/۳)

چکیده

به‌منظور بررسی اثر نانوذرات نقره، روی، نیکل، روی- مس بر جوانه‌زنی، استقرار و فعالیت آنزیمی بذر گیاه یونجه تحقیقی در قالب آزمایش فاکتوریل به‌صورت کاملاً تصادفی با سه تکرار در آزمایشگاه بذر گروه زراعت و اصلاح‌نباتات پردیس کشاورزی و منابع‌طبیعی دانشگاه تهران انجام گرفت. هدف از این تحقیق تعیین تأثیر احتمالی نانوذرات مختلف بر گیاه یونجه و آستانهٔ تحمل به نانوذرات مختلف است. در وضعیت آزمایشگاهی بیشترین کاهش در سرعت‌جوانه‌زنی و طول ساقه‌چه به‌ترتیب در تیمار ۴۰ میلی‌گرم بر لیتر روی- مس و نقره مشاهده شد. در وضعیت اتاقک رشد نیز تنها شاخص سرعت سبزشدن در سطح یک‌درصد معنادار شد و کمترین مقدار آن مربوط به تیمار ۸۰ میلی‌گرم بر لیتر روی- مس گزارش شد. آنزیم کاتالاز در گیاه یونجهٔ تیمارشده با نانوذره در سطح ۵ درصد معنادار شد، اما هیچ تفاوت معناداری بین شاهد و تیمار نانوذره از نظر مقدار فعالیت آنزیم‌های سوپراکسیددیسموتاز و آسکوربات‌پراکسیداز مشاهده نشد. در بین همهٔ نانوذرات، بیشترین مقدار نانوذرهٔ جذب‌شده در گیاهچه، نانوذرهٔ نیکل بود که در تیمار ۴۰ میلی‌گرم بر لیتر نیکل مشاهده شد. براساس نتایج، کاهش‌خسارت فلزات در وضعیت اتاقک رشد نسبت به کشت آزمایشگاهی مشاهده شد که ممکن است ناشی از بستر جوانه‌زنی بذرها باشد.

واژه‌های کلیدی: **استقرارگیاهچه، جوانه‌زنی، فعالیت‌آنزیمی، نانوذرات، یونجه.**

مقدمه

با پیشرفت روزافزون فناوری نانو، افزایش نانوذرات در محیط انکارناپذیر است و تأثیر زیادی بر صنعت، جامعه و محیط دارد. طی چند سال اخیر کاربردهای نانوذرات به‌عنوان یکی از ابعاد اصلی فناوری نانو پیشرفت‌های چشمگیری داشته است. این پیشرفت‌ها در زمینه‌های زیست‌پزشکی، داروسازی، مواد نیمه‌هادی لوازم آرایشی، کامپوزیت‌ها و روکش‌ها، پارچه‌های ضدلک و عینک‌های آفتابی ضدخش، بوده است (Biswas *et al.*, 2005). نانوذرات در نتیجهٔ برخی فعالیت‌های بشر، مانند نانوذرات تولیدشده در بخش صنعت که وارد هوا یا اکوسیستم‌های آبی می‌شوند یا استفاده از نانوذرات به‌صورت برخی کودها در فعالیت‌های کشاورزی، به‌عمد یا غیرعمد وارد محیط زیست می‌شوند. با اینکه نانوذرات به‌راحتی در نتیجهٔ فعالیت‌های بشر وارد محیط می‌شود و آن را آلوده می‌کند، هنوز اطلاعات دقیقی از تأثیر این مواد بر محیط و آثار سمی یا سایر خصوصیات آنها وجود ندارد (Shah & Belozerova., 2009). در معدود تحقیقات انجام‌گرفته در مورد سمیت نانوذرات در گیاهان، نتایج حاکی از اختلال در جوانه‌زنی بذر و رشد گیاهان است. این سمیت با دیگر تنش‌ها می‌تواند تأثیر مخرب بیشتری را سبب شود.

سازوکار دفاعی گیاهان برای مقابله با خسارت‌های ناشی از تنش اکسیداتیو و حذف گونه‌های فعال اکسیژن، شامل آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت و آنتی‌اکسیدانت‌ها است. سازوکارهای آنزیمی، شامل سوپراکسیددیسموتاز، کاتالاز، پراکسیداز، گلوتاتیون ردوکتاز، دهیدروآسکوربات ردوکتاز و غیره، غلظت سوپراکسید و پراکسید هیدروژن

تلفن: ۰۲۶۳۲۲۲۱۴۸۲
E-mail: tavakkol@ut.ac.ir

را کاهش می‌دهند. آنتی‌اکسیدانت‌های تولیدشده توسط سازوکارهای غیرآنزیمی در گیاهان نیز شامل ویتامین E، آسکوربات، گلوتاتیون، ترکیبات فلاونوئیدی، کاروتنوئیدها و غیره هستند (Esfandiari *et al*., 2008 ; Noctor & Foyer, 1998). تیمارهای نیترات‌نقره و کلریدجیوه به مدت کوتاه (۲ تا ۵ دقیقه)، سبب افزایش جوانه‌زنی بذر نخود در وضعیت تاریکی شدند. این تیمارها در بذرهای خراش‌داده‌شده مؤثر نبودند (Hatano,1971). مطالعات نشان دادند که یونجه می‌تواند در وضعیت حاوی فلزات سنگین رشد کند. غلظت‌های کم کادمیوم، کروم، مس، نیکل و روی، رشد ریشه و ساقه‌چه را در یونجه افزایش می‌دهند. تنها فلز روی توانست در غلظت‌های بیش از ۲۰ و ۴۰ میلی‌گرم بر لیتر، موجب افزایش رشد ریشه‌چه نسبت به ریشهٔ گیاهچه‌های شاهد شود (Peralta *et al*., 2000). در بین فلزات روی، سرب، مس، جیوه، کبالت و کادمیوم، جیوه بیشترین اثر بازدارندگی را بر جوانه‌زنی و رشد گیاهان گندم و خیار داشت. به‌جز برخی استثناها، در همهٔ تیمارهای فلزی، در غلظت‌های انتخاب‌شده، کاهش معناداری در سرعت جوانه‌زنی هر دو گیاه نسبت به شاهدهای آنها مشاهده شد Munzuroglu & Geckil (2002,). در تحقیقی با بررسی اثر کادمیوم و جیوه بر رشد آرابیدوپسیس نتایج نشان داد که حساسیت رشد گیاهچه به جیوه، بسیار بیشتر از درصد جوانه‌زنی بود. سمیت جیوه در مرحلهٔ دوم جوانه‌زنی (۱۲ تا ۲۴ ساعت بعد از آبنوشی) بیشتر بود، درحالی‌که بازدارندگی کادمیوم بر جوانه‌زنی در دورهٔ اول (۰ تا ۱۲ ساعت پس از آبنوشی)، بیشتر از دورهٔ دوم بود (Li *et al*., 2007). نانوذرات روی، درصد جوانه‌زنی چچم چندساله و ذرت را کاهش داد، همچنین رشد ریشه را در گیاهان تربچه، کلزا، چچم، کاهو، ذرت و خیار متوقف کرد. نانوذرات آلومینیوم تأثیری بر درصد جوانه‌زنی این گیاهان نداشت (Lin & xing, 2007). در حضور نانوذرات روی، بیومس چاودار به‌طور معناداری کاهش یافت. نوک ریشه چروکیده شد و اپیدرم و سلول‌های بیرونی ریشه به مقدار بسیار زیادی حفره‌دار شدند یا از بین رفتند. تأثیر نانوذرات اکسیدروی کمتر از نانوذرات یون روی بود (Lin & xing, 2008). در آزمایشی مشخص شد که بازدارندگی فلزات بر طول ریشه در محیط آگار بیشتر از کاغذ جوانه‌زنی بود. درصد جوانه‌زنی در دو محیط، تفاوت معناداری را نشان نداد. براساس نتایج در بین فلزات مس، کادمیوم، نیکل و سرب، کادمیوم بیشترین بازدارندگی را بر طول‌ریشه دارد. در بین گیاهان کلم، کاهو، گوجه‌فرنگی و تربچه، کاهو بیشترین حساسیت را به فلزات سنگین نشان داد (Salvatore *et al*., 2008).

گیاهان چهارده‌روزهٔ آفتابگردان که با محلولی از آهن، مس و کادمیوم به مدت دوازده ساعت در حضور نور تیمار شده بودند، کلروفیل کمتری نسبت به شاهد داشتند و در آنها فعالیت لیپوکسیژناز و پراکسیداسیون نیز افزایش یافت. برخلاف یون‌های آهن و کادمیوم که سبب کاهش فعالیت سوپراکسید دیسموتاز شدند، یون مس آن را افزایش داد. البته هر سه یون به کاهش دیگر آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت (کاتالاز، آسکوربات پراکسیداز، گلوتاتیون ردکتاز و دهیدروآسکوربات) منجر شدند. این نتایج نشان داد که یون‌های آهن، کادمیوم و مس، به اکسیداتیو در برگ گیاهان خسارت می‌زنند (Gallego *et al*., 1996). فلزات سرب، نیکل و کادمیوم موجب افزایش فعالیت سوپراکسیددیسموتاز می‌شوند. نیکل در غلظت‌های ۵۰ و ۳۰۰ میلی‌گرم بر لیتر، جوانه‌زنی بذر یونجه را بیش از رشد گیاه و طول ریشه‌چه کاهش داد (Zenovia *et al*., 2008). گیاه بابونه به‌راحتی فلز روی را جذب می‌کند. با این حال، گیاهان تحت آزمایش هیچ نشانه‌ای از زیادی روی در گیاه نشان ندادند. بیشترین مقدار روی جذب‌شده در ساقهٔ گیاه تجمع می‌یابد. همچنین، افزایش روی در خاک سبب کاهش جذب کادمیوم توسط گیاه شد (Grejtovsky *et al*., 2006). هدف این تحقیق تعیین تأثیر احتمالی نانوذرات مختلف بر بذر و گیاهچهٔ یونجه و آستانهٔ تحمل به نانوذرات مختلف است. در این تحقیق به اثر نانوذرات مختلف بر رشد و نمو بذر یونجه در محیط آزمایشگاهی و اتاقک رشد و سیستم آنتی‌اکسیدانت بذر پس از تیمار با غلظت‌های مختلف نانوذرات پاسخ داده خواهد شد.

مواد و روش

مواد گیاهی

به‌منظور اجرای این تحقیق از گیاه یونجه با نام علمی *Medicago sativa* رقم همدان استفاده شد. این پروژه

در قالب آزمایش فاکتوریل به‌صورت کاملاً تصادفی با سه تکرار در آزمایشگاه بذر گروه زراعت و اصلاح نباتات پردیس کشاورزی و منابع‌طبیعی دانشگاه تهران در سال ۸۹-۱۳۸۸ انجام گرفت.

نانوذره

نانوذرات استفاده‌شده دراین پروژه شامل نقره (Ag)، نیکل (Ni)، روی (Zn) و ترکیب روی و مس (۴۰Zn-۶۰Cu) بود که از شرکت سیگما خریداری شد؛ این نانوذرات در غلظت‌های ۲۰، ۴۰ و ۸۰ میلی‌گرم در لیتر mg/l (ppm) استفاده شدند. برای هر تیمار استفاده‌شده یک تیمار شاهد قرار داده شد.

نام نانوذره	مشخصات
نقره	۱۰۰ نانومتر – پودر
روی	۵۰ نانومتر – پودر
نیکل	۱۰۰ نانومتر – پودر
روی - مس	نسبت ۴۰ به ۶۰

بررسی اثر تیمارها بر صفات جوانه‌زنی در وضعیت آزمایشگاهی

تهیهٔ غلظت‌های مختلف نانوذرات فلزی

غلظت‌های مورد استفاده در این آزمایش ۲۰، ۴۰ و۸۰ میلی‌گرم در لیتر بود. این غلظت‌ها با تهیهٔ سوسپانسیون به‌دست آمد.

تهیهٔ محیط کشت

برای تهیهٔ یک محیط کشت که در آن سوسپانسیون کاملاً یکنواخت باقی بماند، از آگار استفاده شد. بدین منظور ۱۴ گرم آگار در یک لیتر آب مقطر حل شد و پس از اتوکلاو شدن، ۵۰ سی‌سی از آن به سوسپانسیون تهیه‌شده اضافه شد. در نهایت غلظت سوسپانسیون همراه با آگار، همان غلظت مورد نظر بود. هر کدام از سوسپانسیون تهیه‌شده در ۳ پتری‌دیش ۹ سانتی‌متری که اتوکلاو شده بودند، تقسیم شدند.

کشت در پتری‌دیش

بذرها با وایتکس ۲ درصد (هیپوکلریت سدیم) به مدت ۲ دقیقه، ضدعفونی شدند. سپس سه بار با آب مقطر شست‌وشو داده شدند. بذرها در پتری‌دیش‌های ۹ سانتی‌متری حاوی محیط آگار همراه با فلزات، کشت شدند. تعداد بذر داخل هر پتری‌دیش، ۲۵ عدد بود. پتری‌ها در انکوباتور با دمای ۲۰ درجهٔ سانتی‌گراد و وضعیت تاریکی، قرار داده شدند. ملاک جوانه‌زنی، خروج ۲-۱ میلی‌متر ریشه‌چه بود. در آخرین روز جوانه‌زنی، از هر پتری‌دیش ۱۰ گیاهچه به‌طورتصادفی انتخاب شدند و طول ریشه‌چه، ساقه‌چه و وزن خشک گیاهچهٔ آنها اندازه‌گیری شد. برای اندازه‌گیری وزن خشک، گیاهچه‌ها در پاکت‌های کاغذی قرار داده شده و به‌مدت ۴۸ ساعت در آون ۷۰ درجهٔ سانتی‌گراد خشک شدند.

بررسی اثر تیمارها بر صفات جوانه‌زنی در وضعیت اتاقک رشد

تهیهٔ گلدان‌های حاوی فلزات

هر گلدان (۱ کیلوگرم) حاوی ۲۵۰ گرم مخلوط ۱:۳ پرلیت و ماسه بود. برای تهیهٔ غلظت‌های ۲۰، ۴۰ و ۸۰ میلی‌گرم در لیتر به‌ترتیب ۰/۰۰۵، ۰/۰۱۰ و ۰/۰۲۰ گرم از نانوذرات روی، نقره، نیکل، ترکیب روی- مس به‌طور جداگانه در گلدان ریخته شده و با پرلیت و ماسه مخلوط شد.

کشت در گلدان

بذور با وایتکس ۲ درصد ضدعفونی شدند. سپس سه بار با آب مقطر شست‌وشو داده شدند. در هر گلدان ۱۰ بذر در عمق ۱ سانتی‌متر، کاشته شدند. گلدان‌ها در اتاقک-های رشد با دمای ۲۲ درجهٔ سانتی‌گراد، ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی قرار داده شدند. گلدان‌ها روزانه با ۲۰ سی‌سی آب مقطر آبیاری شدند. شمارش بذور سبزشده به‌صورت روزانه بود. ملاک سبزشدن، ظهورگیاهچه در سطح گلدان بود. در پایان کار، تمامی گیاهچه‌های رویش‌یافته، انتخاب شده و طول ریشه‌چه و ساقه‌چه و وزن خشک آنها اندازه‌گیری شد.

اندازه‌گیری فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت

برای بررسی آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت، تیمار معنادار در آزمون‌های آزمایشگاهی انتخاب شدند. تیمارمنتخب، روی- مس با غلظت ۸۰ میلی‌گرم در لیتر بود. پس از

کشت در پتری‌های حاوی آگار همراه با نانوذرات، پس از روزهای تعیین‌شده برای جوانه‌زنی استاندارد، گیاهان از پتری‌دیش به فویل آلومینیوم منتقل شده و فویل‌ها به‌سرعت در ازت مایع قرار داده شدند تا فریز شوند. پس از پودر کردن نمونه‌ها با ازت مایع، ۵ سی‌سی بافر-استخراج به ۰/۵ گرم نمونهٔ پودرشده اضافه شد. سپس به مدت ۳۰ ثانیه ورتکس شد. سانتریفیوژ به مدت ۱۸ دقیقه با دور ۱۴۰۰۰ و در دمای درجهٔ سانتی‌گراد انجام گرفت. عصارهٔ محتوی هر فالکون به چند تیوب ۱/۵ منتقل شد تا با ذوب و یخ‌شدن متناوب در حین کار، فعالیت آنزیم‌ها کاهش نیابد.

اندازه‌گیری غلظت پروتئین

پس از رسم منحنی استاندارد پروتئین به کمک سرم آلبومین BSA، سنجش مقدار پروتئین بر مبنای روش برادفورد انجام گرفت (Bradford, 1976).

فعالیت آنزیم آسکوربات‌پراکسیداز (APX)، کاتالاز (CAT) و سوپراکسید دیسموتاز (SOD)

پس از تهیهٔ عصارهٔ آنزیمی، فعالیت آنزیم‌های آسکوربات‌پراکسیداز (APX)، کاتالاز (CAT) و سوپراکسید دیسموتاز (SOD) اندازه‌گیری شد. فعالیت SOD در طول موج ۵۶۰ نانومتر براساس روش Fridovich & Beauchamp (1971) محاسبه شد. میزان فعالیت آنزیمی کاتالاز براساس میزان تجزیه شدن H_2O_2 در طول‌موج ۲۴۰ نانومتر براساس روش Bergmeyer (1970) اندازه‌گیری شد. فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز نیز براساس میزان تجزیه شدن H_2O_2 تعیین شد. فعالیت ویژهٔ آنزیم آسکوربات پراکسیداز به‌صورت تعداد میکرومول H_2O_2 تجزیه‌شده در دقیقه در میلی‌گرم پروتئین براساس روش Nakano & Asada (1981) محاسبه شد.

اندازه‌گیری مقدار نانوذرات جذب‌شده توسط گیاهچه

عصاره‌های تهیه‌شده در دستگاه جذب اتمی مدل SHIMADZO، با لامپ‌های مخصوص فلز استفاده‌شده در تیمار تحت مطالعه، قرار داده شدند و مقدار فلزات موجود در عصارهٔ گیاهی بر حسب میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن‌خشک گیاهچه به‌دست آمد.

محاسبات و تجزیهٔ داده‌ها

الف) درصد جوانه‌زنی

$$\text{درصد جوانه زنی} = \frac{\text{کل بذور جوانه زده}}{\text{کل بذور موجود در پتری}}$$

ب) سرعت جوانه‌زنی

سرعت جوانه‌زنی= تعداد بذر جوانه‌زده در اولین روز شمارش ÷ تعداد روز شمارش+ ...+ تعداد بذر جوانه‌زده در آخرین روز شمارش ÷ تعداد روز شمارش.

آنالیز واریانس و مقایسهٔ میانگین‌ها به کمک نرم‌افزارهای MINITAB و MSTATC انجام گرفت.

بحث

بررسی اثر تیمارها بر صفات جوانه‌زنی در وضعیت آزمایشگاهی

تیمارهای نانوذرات در مقایسه با شاهد تأثیر معناداری بر سرعت‌جوانه‌زنی، طول‌ساقه‌چه و وزن‌خشک گیاهچه داشت (جدول ۱). تأثیر نانوذرات بر بذر گیاه یونجه یکنواخت نبود. برخی تیمارها اثر مثبت و بعضی دیگر اثر منفی را در صفت‌های مختلف نشان دادند.

آنالیز واریانس نشان داد تأثیرات متقابل نانوذرات و غلظت آنها بر سرعت جوانه‌زنی، طول ریشه‌چه و ساقه‌چه در یونجه معنادار بود (جدول ۲).

جدول۱. تجزیهٔ واریانس تیمارهای نانوذرات بر شاخص‌های جوانه‌زنی گیاه یونجه

منابع تغییرات	درجهٔ آزادی	درصد جوانه‌زنی	سرعت جوانه‌زنی	طول ریشه‌چه	طول ساقه‌چه	وزن خشک گیاهچه
نانو ذرات	۱۲	۳/۶۹۲ns	۳/۹۲۵۶**	۶/۳۵۰۶**	۰/۴۷۵۲۰**	۰/۰۰۱۴۶۸۱*
تکرار	۲	۰/۴۱۰ns	۰/۶۴۴۴ns	۰/۰۹۱۶ns	۰/۱۶۴۸۱ns	۰/۰۰۰۹۹۷۱ns
خطا	۲۴	۳/۰۷۷	۰/۳۷۰۸	۰/۰۳۹۴	۰/۰۴۳۰۴	۰/۰۰۰۶۱۶۶

ns غیرمعنادار، * معنادار در سطح احتمال ۵ درصد، ** معنادار در سطح احتمال ۱ درصد.

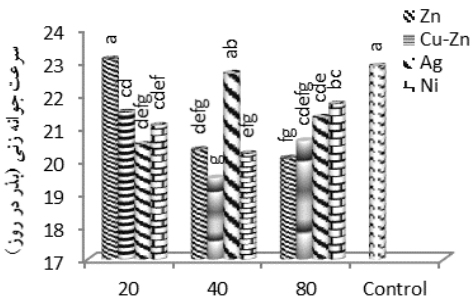
جدول۲. تجزیهٔ واریانس اثر متقابل نانوذرات و غلظت بر شاخص‌های جوانه‌زنی گیاه یونجه

منابع تغییرات	درجه آزادی	درصد جوانه‌زنی	سرعت جوانه‌زنی	طول ریشه‌چه	طول ساقه‌چه	وزن خشک گیاهچه
نانوذرات (A)	۳	۵/۳۳۳^{ns}	۱/۴۶۳۹*	۱۱/۱۷۴۹**	۰/۵۴۳۴۷**	۰/۰۰۳۴۲۳**
غلظت (B)	۲	۰/۴۴۴^{ns}	۲/۳۴۴۰**	۱۵/۳۴۷۲**	۰/۳۷۰۱۴**	۰/۰۰۰۷۴۷^{ns}
تکرار	۲	۰/۴۴۴^{ns}	۰/۵۳۴۷^{ns}	۰/۱۳۰۵^{ns}	۰/۱۶۱۹۱*	۰/۰۱۱۵۵^{ns}
A*B	۶	۴^{ns}	۴/۷۸۳۱**	۲/۲۵۹۷**	۰/۵۱۹۴۶**	۰/۰۰۰۹۵۷^{ns}
خطا	۲	۳/۳۵۴	۰/۳۸۶۵	۰/۰۳۴۰	۰/۰۴۲۳۳	۰/۰۰۰۶۵۷

ns غیرمعنادار، * معنادار در سطح احتمال ۵ درصد، ** معنادار در سطح احتمال ۱ درصد.

سرعت جوانه‌زنی

اثر کاهشی نانوذرات بر سرعت جوانه‌زنی یونجه در مقایسه با شاهد معنادار بود (شکل ۱). نانوذرهٔ روی در غلظت‌های بالای ۴۰ و ۸۰ میلی‌گرم بر لیتر، کاهش معناداری را در سرعت جوانه‌زنی سبب شد، اما غلظت ۲۰ میلی‌گرم بر لیتر آن تأثیری بر این صفت نشان نداد. ۳ نانوذرهٔ نقره، نیکل و روی- مس، در تمامی غلظت‌های خود تأثیر کاهشی را در صفت جوانه‌زنی نشان دادند، هرچند نقره در غلظت ۴۰ میلی‌گرم بر لیتر کاهش کمی داشت و این تأثیر معنادار نبود. نانوذرهٔ ترکیبی روی- مس در غلظت ۴۰ میلی‌گرم بر لیتر، بیشترین کاهش

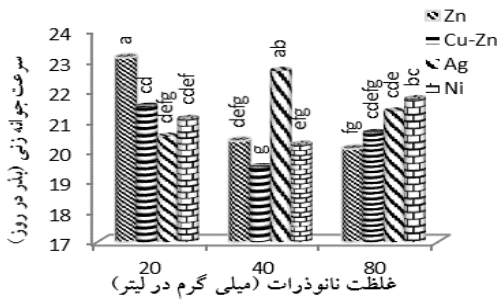


شکل۱. مقایسه میانگین تیمارهای نانوذرات با شاهد بر سرعت جوانه زنی یونجه

طول ریشه‌چه

طول ریشه‌چهٔ یونجه تحت تأثیر غلظت‌های مختلف نانوذرات قرار گرفت (شکل ۳). طول ریشه‌چه با افزایش غلظت نانوذرات کاهش یافت. هرچند نانوذرات نقره و نیکل در غلظت کم ۲۰ میلی‌گرم بر لیتر سبب افزایش معناداری در طول ریشه‌چه نسبت به شاهد شدند، نانوذرهٔ روی در این غلظت تأثیر معناداری را نشان نداد. نانوذرهٔ روی- مس حتی در غلظت کم کاهش بسیار زیادی را سبب شد. بیشترین کاهش طول ریشه‌چه حدود ۸۳ درصد و بیشترین افزایش ۳۴/۵ درصد، ۱۵ درصدی را در این صفت داشت، اما در مطالعهٔ دیگری بر بذر برنج نانوذرهٔ روی اثر معناداری را نشان نداد (Boonyanitipong *et al*., 2011).

اثر متقابل نانوذرات و غلظت بر سرعت جوانه‌زنی معنادار بود (شکل ۲). کمترین سرعت جوانه‌زنی در تیمار ۴۰ میلی گرم در لیتر روی- مس و بیشترین سرعت در تیمار ۲۰ میلی‌گرم در لیتر روی به‌دست آمد. اختلاف این دو تیمار حدود ۱۶ درصد بود. به‌طور کلی غلظت ۴۰ میلی‌گرم در لیتر کاهش بیشتری را نسبت به دو غلظت دیگر نشان داد.



شکل۲. مقایسه میانگین متقابل نانوذرات و غلظت بر سرعت جوانه زنی یونجه

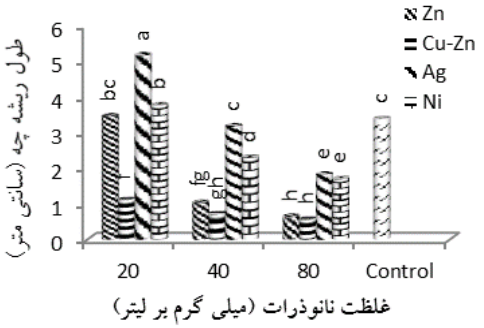
به‌ترتیب در تیمار روی- مس ۸۰ میلی‌گرم بر لیتر و تیمار ۲۰ میلی‌گرم بر لیتر نقره بود. روند کاهشی طول ریشه‌چه با افزایش غلظت در تمامی نانوذرات افزایش یافت (شکل ۴). نانوذرهٔ روی- مس بیشترین کاهش و نانوذرهٔ نقره کمترین کاهش در طول ریشه‌چه را نشان داد. در تحقیق روی بذرهای در حال جوانه‌زنی برنج نیز مشاهده شد که نانوذرهٔ روی آثار نامطلوبی بر رشد ریشه‌چه داشتند (Boonyanitipong *et al*., 2011). هرچند تفاوت میان غلظت‌های نانوذرهٔ نقره بیشتر از سایر نانوذره‌ها بود، به‌طوری‌که اختلاف بین طول ریشه-

چه در غلظت‌های ۲۰ و ۴۰ میلی‌گرم بر لیتر نقره، ۶۵ درصد بود.

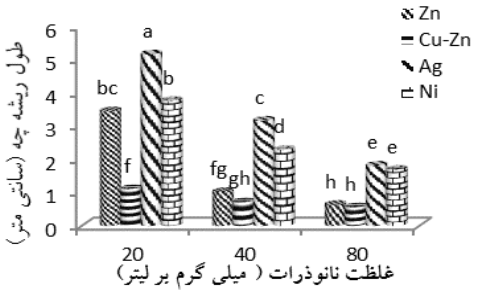
وزن‌خشک گیاهچه

در مقایسه با شاهد، نانوذرهٔ روی در دو غلظت بالای خود (۴۰ و ۸۰ میلی‌گرم در لیتر)، تأثیر آشکاری بر وزن خشک گیاهچه نشان دادند (شکل ۷). هرچند در غلظت ۸۰ میلی‌گرم در لیتر این اثر معنادار نشد، در غلظت میانی روی، اثر افزایشی معناداری بر این صفت مشاهده شد. اثر متقابل نانوذرات و غلظت بر وزن خشک معنادار نشد.

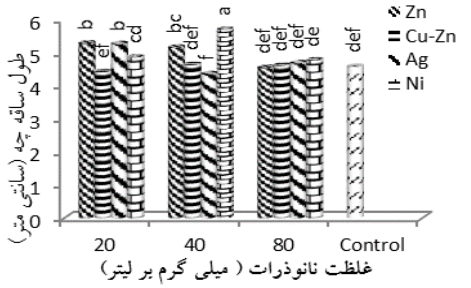
نانوذرات مختلف، اثرهای متفاوتی بر این صفت داشتند (شکل ۸). بیشترین مقدار این صفت در نیکل و کمترین آن در روی- مس مشاهده شد. در مطالعه‌ای تأثیر نانوذرهٔ روی بر بیومس چاودار بررسی شد که نتایج حاکی از آثار منفی این نانوذره بر بیومس گیاه بود (Lin & xing, 2008). تفاوت بین این دو تیمار، کاهش ۱۰ درصدی وزن‌خشک گیاهچه در تیمار روی- مس نسبت به تیمار نیکل بود.



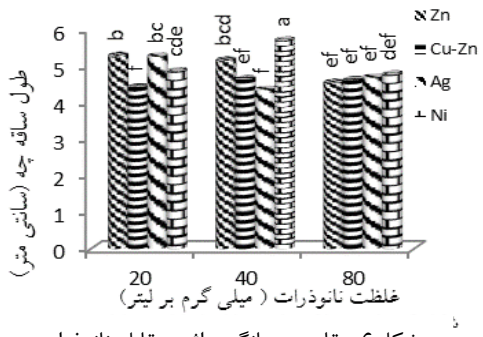
شکل۳. مقایسه میانگین تیمارهای نانوذرات با شاهد بر ریشه چه یونجه



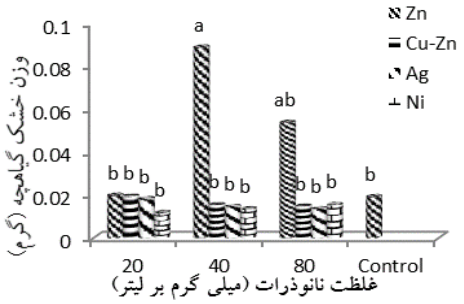
شکل۴. مقایسه میانگین اثر متقابل نانوذرات و غلظت بر طول ریشه چه یونجه



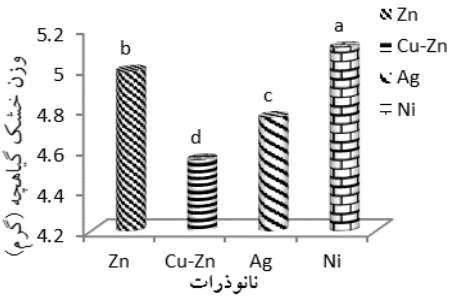
شکل۵. مقایسه میانگین تیمارهای نانوذرات با شاهد بر طول ساقه چه یونجه



شکل۶. مقایسه میانگین اثر متقابل نانوذرات و غلظت بر طول ساقه چه یونجه



شکل۷. مقایسه تاثیر تیمارهای نانوذرات با شاهد بر وزن گیاهچه یونجه



شکل۸. مقایسه میانگین اثر نانوذرات بر وزن خشک گیاهچه یونجه

طول ساقه‌چه

برخی نانوذرات به‌طور معناداری موجب افزایش طول ساقه‌چهٔ یونجه شدند (شکل ۵). روی در دو غلظت کم و نقره تنها در غلظت ۲۰ میلی‌گرم بر لیتر به افزایش معناداری در این صفت منجر شدند. روی- مس در تمام غلظت‌های خود نسبت به شاهد تأثیر معناداری بر این صفت نشان نداد. بیشترین افزایش طول ساقه‌چه در تیمار ۴۰ میلی‌گرم بر لیتر نیکل بود. این افزایش حدود ۲۰ درصد بود. در غلظت بالای ۸۰ میلی‌گرم بر لیتر، تمامی نانوذرات بیشترین اثر کاهشی را بر طول ساقه‌چه داشتند، درحالی‌که تفاوت چندانی بین خود نانوذرات در این غلظت مشاهده نشد (شکل ۶). در بررسی دو بذر سورگوم و لوبیا مشاهده شد گیاهانی که تحت تأثیر نانوذرهٔ نقره بودند، رشد کمتری نسبت به شاهد داشتند (Lee *et al*., 2012). در مقایسه با شاهد، نانوذرهٔ روی در دو غلظت بالای خود (۴۰ و ۸۰ میلی‌گرم بر لیتر)، تأثیر آشکاری بر وزن خشک گیاهچه داشتند. هرچند در غلظت ۸۰ میلی‌گرم بر لیتر این اثر معنادار نشد، در غلظت میانی روی، اثر افزایشی معناداری بر این صفت مشاهده شد. اثر متقابل نانوذرات و غلظت بر وزن خشک معنادار نشد. نانوذرات مختلف، اثرهای متفاوتی بر این صفت داشتند.

بررسی اثر تیمارها بر صفات سبزشدن در وضعیت اتاقک رشد

در وضعیت اتاقک رشد، نانوذرات سرعت سبزشدن را در گیاه یونجه تحت تأثیر قرار دادند (جدول ۳). این تیمارها در مقایسه با شاهد، هیچ تأثیری بر دیگر صفات جوانه‌زنی نداشتند. آنالیز واریانس نشان داد که اثر متقابل نانوذرات و غلظت، حتی بر سرعت سبز شدن نیز مؤثر نبود (جدول ۴). اثر تیمارها بر سرعت به‌دلیل تفاوت بین تأثیر نانوذرات بر این صفت بود. اثر نانوذرات در سطح ۱ درصد معنادار شد.

جدول ۳. تجزیهٔ واریانس تیمارهای نانوذرات بر شاخص‌های سبز شدن گیاه یونجه

منابع تغییرات	درجهٔ آزادی	درصد سبز شدن	سرعت سبز شدن	طول ریشه‌چه	طول ساقه‌چه	وزن خشک گیاهچه
نانوذرات	۱۲	۱۳۳/۳۳^{ns}	۰/۲۸۳۸۴**	۳/۴۸۶^{ns}	۰/۸۵۶۲^{ns}	۰/۰۰۰۲۴۴۴^{ns}
تکرار	۲	۱۷۱/۷۹^{ns}	۰/۳۰۹۰^{ns}	۰/۵۹۱^{ns}	۰/۲۳۱۶^{ns}	۰/۰۰۰۲۵۳۴^{ns}
خطا	۲۴	۹۶/۷۹	۰/۰۷۶۳۴	۲/۴۷۱	۰/۶۳۰۱	۰/۰۰۰۲۷۸۸

ns غیر معنادار، * معنادار در سطح احتمال ۵ درصد، ** معنادار در سطح احتمال ۱ درصد

جدول ۴. تجزیهٔ واریانس اثر متقابل نانوذرات و غلظت بر شاخص‌های سبز شدن یونجه

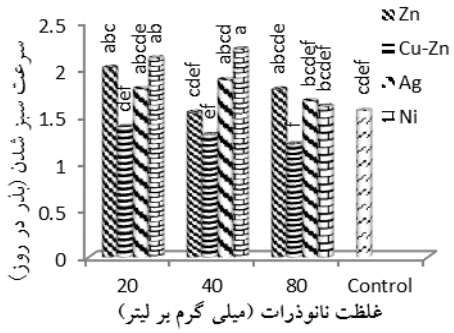
منابع تغییرات	درجهٔ آزادی	درصد سبز شدن	سرعت سبز شدن	طول ریشه‌چه	طول ساقه‌چه	وزن خشک گیاهچه
نانوذرات (A)	۳	۷۶/۸۵^{ns}	۰/۷۴۹۷۶**	۴/۲۰۴^{ns}	۰/۳۱۷۱^{ns}	۰/۰۰۰۴۸۷۳^{ns}
غلظت (B)	۲	۱۰۲/۷۸^{ns}	۰/۲۱۲۰۰^{ns}	۴/۹۴۲^{ns}	۱/۳۸۸۸^{ns}	۰/۰۰۰۱۵۴۷^{ns}
تکرار	۲	۲۰۲/۷۸^{ns}	۰/۰۴۲۷۰^{ns}	۱/۹۶۲^{ns}	۰/۱۶۹۹^{ns}	۰/۰۰۰۲۶۹۴^{ns}
A*B	۶	۱۸۷/۹۶^{ns}	۰/۱۱۲۱۰^{ns}	۲/۶۳۸^{ns}	۱/۰۰۴۷^{ns}	۰/۰۰۰۱۹۳۵^{ns}
خطا	۲۲	۹۹/۷۵	۰/۰۷۶۸۷	۲/۱۷۷	۰/۶۸۹۲	۰/۰۰۰۳۰۰۸

ns غیرمعنادار، * معنادار در سطح احتمال ۵ درصد، ** معنادار در سطح احتمال ۱ درصد

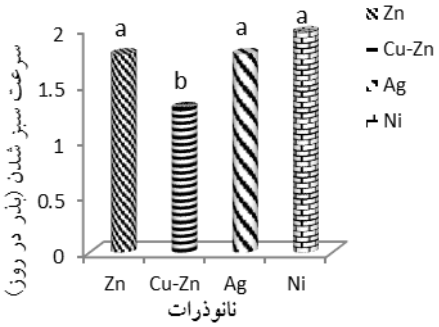
سرعت سبزشدن

کاهش سرعت سبز شدن در هیچ‌یک از تیمارها معنادار نبود (شکل ۹). نیکل در دو غلظت ۲۰ و ۴۰ میلی‌گرم در لیتر افزایش معناداری در سرعت سبزشدن یونجه داشت. بیشترین مقدار افزایش این صفت نسبت به شاهد در نیکل ۴۰ میلی‌گرم در لیتر، ۳۰ درصد بود. تأثیر تیمارها در نانوذرات روی، نقره و نیکل تفاوت معناداری نداشتند (شکل ۱۰). در تحقیقی تأثیر دو نانوذرهٔ نیترات نقره و پلی‌وینیل پیرولیدین-نیترات نقره بر جوانه‌زنی و رشد اولیهٔ یازده گیاه بررسی و مشاهده شد که نانوذرهٔ نیترات نقره تأثیر منفی ناچیزی بر سبز شدن گیاه داشت، ولی نانوذرهٔ پلی‌وینیل پیرولیدین- نیترات نقره تنها سبب کاهش جوانه‌زنی و قدرت سبز شدن یکی از گیاهان شد (Yin *et al*., 2012).

اثر نانوذرهٔ روی- مس بر سرعت سبزشدن یونجه با سایر نانوذرات کاملاً متفاوت بود. سرعت سبز شدن در روی- مس حدود ۳۴ درصد کمتر از نیکل بود.



شکل۹. مقایسه میانگین تیمارهای نانوذرات با شاهد سرعت سبز شدن یونجه



شکل۱۰. مقایسه میانگین اثر نانوذرات بر سرعت سبز شدن یونجه

فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت

کاتالاز

گیاه یونجهٔ تیمارشده با نانوذرهٔ روی- مس به‌منظور بررسی فعالیت آنزیمی انتخاب شد. آنزیم کاتالاز در گیاه یونجه‌ای که با نانوذره تیمار شده بود، در مقایسه با گیاه شاهد افزایشی را نشان داد.

آسکوربات پراکسیداز

گیاه یونجهٔ تیمارشده با نانوذرهٔ روی- مس با گیاه شاهد از نظر فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز تغییر معناداری را نشان نداد.

جدول ۵ . تجزیهٔ واریانس مقایسهٔ فعالیت آنزیم کاتالاز یونجه با تیمار نانوذرهٔ روی- مس

منابع تغییرات	درجهٔ آزادی	فعالیت آنزیم کاتالاز
تیمار	۱	۰/۰۰۰۰۲۰۰۳۵*
تکرار	۲	۰/۰۰۰۰۰۰۲۹۷ns
خطا	۲	۰/۰۰۰۰۰۰۲۹۹۹

ns غیر معنادار، * معنادار در سطح احتمال ۵ درصد، ** معنادار در سطح احتمال ۱ درصد

جدول۶. تجزیهٔ واریانس مقایسهٔ فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز یونجه با تیمار نانوذرهٔ روی- مس

منابع تغییرات	درجهٔ آزادی	فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز
تیمار	۱	۰/۰۰۰۰۰۱۷۰۲ns
تکرار	۲	۰/۰۰۰۰۰۰۳۷۱ns
خطا	۲	۰/۰۰۰۰۰۴۹۲۹

ns غیرمعنادار، * معنادار در سطح احتمال ۵ درصد، ** معنادار در سطح احتمال ۱ درصد

سوپراکسید دیسموتاز

اندازه‌گیری آنزیم سوپراکسید دیسموتاز در گیاه یونجه که تحت تیمارهای روی- مس قرار گرفته بود، نشان داد که این آنزیم در گیاه یونجه و شاهد تفاوت معناداری با یکدیگر نداشتند.

جدول ۷. تجزیهٔ واریانس مقایسهٔ فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز یونجه با تیمار نانوذرهٔ روی- مس

منابع تغییرات	درجهٔ آزادی	فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز
تیمار	۱	۳۶۵۵۱۰۴/۰۴۶ns
تکرار	۲	۱۳۵۷۵۸۵/۲۳۹ns
خطا	۲	۳۹۵۸۱۸۵/۵۳۹

ns غیرمعنادار، * معنادار در سطح احتمال ۵ درصد، ** معنادار در سطح احتمال ۱ درصد

اندازه‌گیری غلظت نانوذرات در گیاهچه

در بین تمامی نانوذرات بیشترین نانوذرهٔ جذب‌شده توسط گیاه یونجه نانوذرهٔ نیکل بود که تحت وضعیت تیماری ۴۰ میلی‌گرم بر لیتر نیکل در گیاهچهٔ یونجه مشاهده شد، اما این مقدار نیز تفاوت معناداری را نسبت به شاهد نشان نداد و مقدار آن ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر گزارش شد.

جدول ۸. تجزیهٔ واریانس مقایسهٔ غلظت نانوذرهٔ نیکل در گیاهچه‌های یونجه

منابع تغییرات	درجهٔ آزادی	غلظت نیکل
تیمار	۱	۶۰۱۰/۳۳۵ ns
تکرار	۲	۹۷۵/۳۶۵ ns
خطا	۲	۹۷۵/۳۶۵

ns غیرمعنادار، * معنادار در سطح احتمال ۵ درصد، ** معنادار در سطح احتمال ۱ درصد

نتیجه‌گیری کلی

نتایج آزمون‌های آزمایشگاهی و اتاقک رشد، حاکی از تأثیر سمیت ایجادشده توسط نانوذرات بر رشد گیاه بررسی‌شده بود. در وضعیت آزمایشگاهی این سمیت بیشتر مشاهده شد و نانوذرات مانع جوانه‌زنی و موجب کاهش رشد شدند، اما در اتاقک رشد گیاهچه‌های کشت‌شده نشان دادند که در وضعیت گلدانی نانوذرات تنها بر رشد گیاهان تأثیرگذارند و نمی‌توانند برای جوانه‌زنی آنها مانعی ایجاد کنند.

پوشش بذر نقش مهمی در محافظت از جنین در برابر عوامل خارجی دارد و می‌تواند خاصیت نفوذپذیری انتخابی هم داشته باشد. به‌نظر می‌رسد آلاینده‌ها تأثیر بازدارنده‌ای بر رشد ریشه دارند، اما اگر به درون پوشش بذر وارد نشوند، ممکن است نتوانند بر جوانه‌زنی تأثیر بگذارند (Lin & xing, 2007).

پوستهٔ بذر نقش مهمی در حفاظت از بذر در وضعیت تنش دارد. بذرهای دارای پوسته در غلظت‌های زیادی از فلز روی توانستند جوانه‌زنی داشته باشند. اما جنین‌های بدون پوسته، در غلظت‌های خیلی‌کم نیز از بین رفتند و جوانه نزدند (Li *et al*., 2007).

با افزایش فلزات سنگین در وضعیت رشد گیاهان، مقدار ABA در بذر گیاهان افزایش یافت و این می‌تواند دلیلی برای کاهش جوانه‌زنی در حضور فلزات باشد (Munzuroglu *et al*., 2008).

از بین شاخص‌های اندازه‌گرفته‌شده، تأثیر بارز تیمارها بر طول ریشه‌چه و ساقه‌چه نمایان بود. با توجه به وجود پوستهٔ بذر و محافظت از بذر قبل از جوانه‌زنی، شاید بتوان دلیل اصلی حساسیت بیشتر طول ریشه‌چهٔ گیاهان به تنش‌های محیطی را عنوان کرد.

در تحقیقی روی جوانه‌زنی و رشد آرابیدوپسیس گزارش شد که رشد گیاهچه نسبت به جوانه‌زنی، به فلزاتی چون جیوه، سرب، روی و مس حساسیت بیشتری داشت. سمیت فلزات سنگین در مراحل مختلف فیزیولوژیکی بذر، متفاوت خواهد بود (Li *et al*., 2007).

رشد ریشه‌چه در کشت پتری‌دیش، در گیاه یونجه کاهش یافت. این کاهش در گیاه یونجه ناشی از نانوذرات مختلف بود، البته نانوذرهٔ روی- مس بیشترین کاهش را سبب شد. تجزیهٔ واریانس داده‌های به‌دست‌آمده از اندازه‌گیری طول ساقه‌چهٔ گیاه یونجه، روند جدیدی را در نتایج نشان داد. یونجه‌های تحت تیمار نانوذرات، دارای طول ساقه‌چهٔ بزرگ‌تری نسبت به شاهد بودند. در آزمایشگاه نیکل موجب افزایش ۲۰ درصدی در طول ساقه‌چهٔ یونجه شد، اما در وضعیت گلدانی افزایش این صفت در مقایسه با شاهد معنادار نبود.

با اینکه تأثیر سمی فلزات بر گیاهان در بیشتر مطالعات مشاهده شده است، غلظت‌های کم کادمیوم، کروم، مس، نیکل و روی، رشد ریشه و ساقه‌چه را در یونجه افزایش می‌دهند. تنها روی در غلظت‌های بالای ۲۰ و ۴۰ میلی‌گرم بر لیتر رشد ریشه را نسبت به شاهد افزایش داد. البته در تحقیق حاضر، اثر نیکل و مس در غلظت ۲۰ میلی‌گرم بر لیتر نیز مثبت گزارش شد، که متفاوت با گزارش پرالتا بود (Peralta *et al*., 2002).

گیاهان سازوکارهای سلولی پیچیده‌ای دارند که ممکن است در سمیت‌زدایی فلزات و در نتیجه ایجاد مقاومت به فلزات در گیاهان دخیل باشند (Hall, 2002). این سازوکارها شامل کاهش جذب فلزات توسط گیاه، ایجاد ترکیبات غیرفعال با فلزات به‌وسیلهٔ پپتیدهای گیاهی برای اصلاح پروتئین‌های خسارت‌دیده از استرس یا دسته‌بندی فلزات درون واکوئل‌ها است. برخی‌گیاهان مقاوم می‌توانند فلزات را در دیوارهٔ سلول‌های اپیدرمی، با تشکیل باندهای پروتئینی و سیلیکاتی، ذخیره کنند (Bringezu *et al*., 1999).

ترکیبات فلزی به‌وسیلهٔ سیستم انتقال‌فعال، به درون تونوپلاست منتقل شده و در واکوئل‌ها ته‌نشین می‌شوند (Rea ,1999 ؛ Tommasini *et al*., 1998).

کاهش خسارت فلزات در وضعیت اتاقک رشد نسبت به کشت آزمایشگاهی مشاهده شد. مقایسهٔ همهٔ تیمارهای نانوذرهٔ فلزی نشان داد درصد جوانه‌زنی، وزن خشک گیاهچه و طول ریشه‌چه در گیاه یونجه در اتاقک رشد تحت تأثیر فلزات قرار نگرفتند. با توجه به اینکه اثر سمی فلزات در مراحل رشد فیزیولوژیکی گیاهان متفاوت است (Li *et al*., 2007)، این تفاوت توجیه‌پذیر است. کشت آزمایشگاهی تنها در مدت زمان لازم برای جوانه‌زنی استاندارد گیاهان انجام گرفت، اما در اتاقک رشد، شاخص‌های جوانه‌زنی در مراحل رشدی بعد از جوانه‌زنی صورت پذیرفت. علاوه بر مراحل رشدی، مسئلهٔ شایان توجه و تأثیرگذار دیگر، بستر کشت است. احتمال می‌رود بستر کشت گلدانی حاوی پرلیت، تأثیر نانوذرات بر گیاهان را کاهش داده باشد.

پرلیت می‌تواند کادمیوم را از محلول‌های آبی جذب کند. حذف کادمیوم توسط پرلیت در ساعات اولیه سرعت بیشتری داشت. به‌نظر می‌رسد جذب فلزات توسط دانه‌های پرلیت مانعی برای جذب این فلزات از طریق ریشه‌های ابتدایی و ظریف گیاهان باشد (Viraraghavan & Mathialagan, 2002). قرارگرفتن در معرض فلزات سنگین، سیستم آنتی‌اکسیدانت را تحریک می‌کند، اما نحوهٔ این پاسخ بسته به گونهٔ گیاهی، بافت‌های آنالیزشده، فلزات به‌کاررفته و شدت‌استرس متفاوت است؛ هرچند برخی از واکنش‌ها مشترک است. برای مثال، یک پاسخ مشترک به کادمیوم افزایش مصرف گلوتاتیون برای تولید فیتوژلاتین است (Zenk, 1996). تجزیهٔ واریانس نشان داد که کاتالاز در مقایسه با سوپراکسید دیسموتاز و پراکسیداز، حساسیت بیشتری به وضعیت تنش دارد، به‌گونه‌ای که در گیاه یونجه، در تیمارهای روی- مس، افزایش معنادار را نشان داد. در گندم نتایج آنزیمی مشابه این تحقیق به‌دست آمد. آنزیم کاتالاز در مقایسه با سوپراکسید دیسموتاز و پراکسیداز از حساسیت بیشتری برخوردار بوده است. در عین حال، آنزیم‌های آنتی‌اکسیدآنتی دیگر از جمله سوپراکسید دیسموتاز و آسکوربات پراکسیداز، افزایش چشمگیر در مقابله با تنش فلزات سنگین، نداشتند. به‌نظر می‌رسد خسارت حاصل از تنش‌ها، نشان‌دهندهٔ عدم سیستم آنتی‌اکسیدآنتی فعال در گیاه باشد. تنش حاصل از فلزات سنگین احتمالاً سبب از بین رفتن سیستم دفاعی می‌شود و فعالیت آنتی‌اکسیدانت‌ها را کاهش می‌دهد (Bakalova *et al*., 2004).

به‌طور کلی می‌توان گفت تنش فلزات سنگین، که در اینجا ترکیب روی- مس مدنظر است، همراستا با کاهش جوانه‌زنی و رشد گیاهان، سیستم آنتی‌اکسیدآنتی آنها را نیز تحریک می‌کند. بسته به نوع گیاه، گونهٔ خاصی از آنتی‌اکسیدانت فعال می‌شود یا از بین می‌رود. با توجه به اثر کاهشی شدید این نانوذرهٔ فلزی بر رشد گیاهان، سیستم دفاعی گیاه فعال می‌شود. احتمال می‌رود در برخی گیاهان این نانوذره حتی به سیستم دفاعی گیاه نیز آسیب وارد کرده باشد. به‌منظور اثبات نتایج به‌دست‌آمده، بهتر است دیگر آنزیم‌های دخیل در سیستم دفاعی بررسی و این سیستم در تیمارهای دیگر نیز ارزیابی شود.

مقدار فلزات‌سنگین درون گیاه نشان‌دهندهٔ غلظت فلزات سنگین در محیط است. زمانی‌که فلزات سنگین در محیط باشند، سیستم ریشهٔ گیاهان آنها را جذب می‌کنند (Kabata & Pendias, 1984). غلظت نانوذرات در گیاهچه‌های کشت‌شده در گلدان، اندازه‌گیری شد. سنجش این فلزات تنها در تیمارهایی که بیشترین تأثیر منفی را بر گیاه داشتند صورت گرفت. نتایج تحقیقات روی گونه‌های گیاهی با جذب بالای فلزات سنگین، نشان داد که این فلزات به‌صورت ترکیبات آلی در این گیاهان ذخیره می‌شوند. تیمار گیاهان مطالعه‌شده با

کادمیوم و نیکل، به افزایش اسید سیتریک، اسید مالیک و اسید مالونیک در ریشه منجر شد (Bominathan & Doran, 2002). با توجه به اینکه در گیاه یونجه که مقدار فلز تحت مطالعه (نیکل) در آن، نسبت به شاهد تغییری نکرد، برای بررسی بیشتر، بهتر است سیستم اسیدهای چرب و مقدار جذب‌شده از محیط نیز بررسی شود. نتایج آزمایش‌های جوانه‌زنی و بررسی سیستم دفاعی گیاه، مشخص کرد که وجود فلزات سنگین در محیط، نوعی تنش در دورهٔ زندگی گیاه محسوب می‌شود.

REFERENCES

1. Bakalova, S., Nikolova, A. & Nedeva, D. (2004). Isoenzyme profiles of proxidase, catalase and superoxide dismutase as affected by dehydration stress and ABA during germination of wheat seeds. *Bulg. J. Plant Physiol*, 30, 64-77.
2. Beauchamp, C. O. D. & Fridovich, I. (1971). Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels.*Anal. Biochem*, 44, 276–287.
3. Bergmeyer, N. (1970). Methoden der enzymatischen Analyse, vol. 1, *Akademie Verlag*, Berlin, pp: 636–647.
4. Biswas, P. D. & Wu, C. Y. (2005). Critical review: nanoparticles and the environment. *J. Air Waste Manag, Assoc*. 55, 708-746.
5. Bominathan, R. & Doran, P. M. (2002). Organic acid complexation, heavy metal distribution and the effect oa ATPase inhibition in hairy roots of hyperaccumulator plant species. *Journal of Biotechnology*, 101, 131-146.
6. Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem*, 72, 248–254.
7. Bringezu, K., Lichtenberger, O., Leopold, I. & Neumann, D. (1999). Heavy metal tolerance of Silene Vulgaris. *Journal of Plant Physiology*, 154, 536-547.
8. Boonyanitipong, P., Kositsup, B., Kumar, P., Baruah, S., Dutta, J. (2011). Toxicity of ZnO and TiO2 Nanoparticles on Germinating Rice Seed. *International Journal of Bioscience, Biochemistry and Bioinformatics*, 1, 282-285.
9. Esfandiari, E. & Mahbob, S. (2008). Damaging effects of reactive oxygen species, plant defense mechanisms and necessity of taking them into consideration. Key papers, *The 10th agronomy congress*, 1-22.
10. Gallego, M. S., Benavides, M. P. & Tomaro, M. L. (1996). Effect of heavy metal ion excess on sunflower leaves: evidence for involvement of oxidative stress. *Plant Science*, 121, 151-159.
11. Grejtovsky, A. & Markusova, K. & Eliasova, A. (2006). The response of chamomile (*Matricaria chamomolla* L.) plants to soil zinc supply. *Plant Soil Environ*, 52, 1-7.
12. Hall, J. L. (2002). Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance. *Journal of Experimental Botany*, 53, 1-11.
13. Hatano, K. I. (1971). Stimulating effect of mercuric chloride and silver nitrate on the dark germination of Pine seeds. Tokyo University Forest Experiment Station, Tanashi, Tokyo.
14. Kabata, P. A. & Pendias, H. (1984). Trace elements in the soils and plants. CRD Press, Florida.
15. Lee, W-M., Kwak, Jin. & An, Y-J. (2012). Effect of silver nanoparticles in crop plants *Phaseolus radiates* and *Sorghum bicolor*: Media effect on phytotoxicity. *Chemosphere*, 86, 491–499.
16. Li, W., Khan, M. A., Yamaguchi, S. & Kamiya, Y. (2007). Effects of heavy metals on seed germination and early seedling growth of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Growth Regulation*, 46, 45-50.
17. Lin, D. & Xing, B. (2007). Phytotoxicity of nanoparticles: Inhibition of seed germination and root growth. *Environmental Pollution*, 150, 243-250.
18. Lin, D. & Xing, B. (2008). Root uptake and phytotoxicity of ZnO nanoparticles. *Environ. Sci. Technol*, 42, 5580-5585.
19. Mathialagan, T. & Viraraghavan, T. (2002). Adsorption of cadmium from aqueous solutions by perlite. *Journal of Hazardous Materials*, B94: 291-303.
20. Munzuroglu, O. & Geckil, H. (2002). Effects of metals on seed germination, root elongation, and coleoptiles and hypocotyls growth in *Triticum aestivum* and *Cucumis sativus*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol*, 43, 203-213.
21. Munzuroglu, O., Zengin, F. K. & Yahyagil, Z. (2008). The abscisic acid levels of wheat (*Triticum aestivum* L.cv. Cakmak 79). *G.U.Journal of Science*, 21, 1-7.
22. Nakano,Y. & Asada, K. (1981). Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-spesific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant Cell Physiol*, 22, 867–880.

23. Noctor, G. & Foyer, C. (1998). Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. Annu. Rev. *Plant Physiol. Plant Mol. Biol*, 49, 249-279.
24. Peralta, J. R., Gardea-Torresdey, J. K., Tiemann, K. J., Gomez, E., Arteaga, S., Rascon, E., Parsons, J. G. (2000). Study of the effect of heavy metals on seed germination and plant growth on alfalfa plant (*Medicago sativa*) grown in solid media. In: *Proceeding of the conference on hazardous waste research*.
25. Rea, P. (1999). MRP subfamily ABC transporters from plants and yeast. *Journal of Experimental Botany*, 50, 895-913.
26. Salvatore, M. Di., Carafa, A. M., Carratu, G. (2008). Assessment of heavy metals phytotoxicity using seed germination and root elongation tests: a comparison of tow growth substrates. *Chemosphere*, 73, 1461-1464. Gallego, M.S., M. P. Benavides, M.L.
27. Shah, V. & Belozerova, I. (2009). Influence of metal nanoparticles on the soil microbial community and germination of lettuce seeds. *Water Air Soil Poll*, 197, 143-148.
28. Tommasini, R., Vogt, E., Fromenteau, M., Hoertensteiner, S., Matile, P., Amrhein, N., Martinoia, E. (1998). An ABC-transporter of Arabidopsis thaliana has both glutathione-conjugate and chlorophyll catabolite transport activity. *The Plant Journal*, 13, 773-780.
29. Yin, L., Colman, B. P., McGill, B. M., Wright, J. P., Bernhardt, E. S. (2012). Effects of Silver Nanoparticle Exposure on Germination and Early Growth of Eleven Wetland Plants. *PLoS ONE*, 7 (10), e47674.
30. Zenk, M. H. (1996). Heavy metal detoxification in higher plants-a review. *Gene*, 179, 21-30.
31. Zenovia, O., Anisoara, S., Alexandina, M., Naela, C. (2008). The influence of some heavy metals on *Medicago sativa* seed germination and seedling growth. Faculty of biology, “Al.I. Cuza” University, Bd. CarolI, 20 A, 700505, Romania, Iasi.