

تأثیر عناصر سنگین بر آناتومی، برخی فلاونوئیدها و نیتروتوکسین‌های برگ *Coronilla varia* L. در کشت هیدروپونیکفریبا امینی<sup>۱</sup> Ph.D.، میترا نوری<sup>۲</sup> Ph.D.، مونا فروغی<sup>۳</sup> M.Sc. دانشجوی

۱- دانشگاه اراک، دانشکده علوم، گروه زیست‌شناسی، کد پستی ۳۸۱۵۶-۸-۸۳۴۹

۲- دانشجوی کارشناسی ارشد فیزیولوژی گیاهی

\* پست الکترونیک نویسنده مسئول: [F-Amini@araku.ac.ir](mailto:F-Amini@araku.ac.ir)

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۰/۲/۲۵

تاریخ دریافت: ۱۳۸۹/۱۱/۱۲

## چکیده

**هدف:** در این پژوهش اثر دو عنصر روی و نیکل بر آناتومی برگ و دو نوع متابولیت ثانویه برگ (فلاونوئیدها و نیتروتوکسین‌ها) در گیاه یونجه تاجی مورد بررسی قرار گرفت.

**مواد و روش‌ها:** گیاهان ۴۰ روزه که به مدت ۲۴ و ۷۲ ساعت در شرایط هیدروپونیک در تنش با غلظت‌های ۰، ۷/۵، ۱۵، ۲۲/۵ و ۳۰ میلی‌مولار کلرید روی و ۰، ۲/۵، ۵، ۷/۵ و ۱۰ میلی‌مولار کلرید نیکل قرار گرفته بودند برداشت و آناتومی برگ‌ها بررسی گردید. مطالعه فلاونوئیدها به دو روش کروماتوگرافی دو بعدی و کروماتوگرافی لایه نازک صورت گرفت. همچنین میزان نیتروتوکسین‌ها با استفاده از اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری گردید. داده‌ها با نرم افزار SPSS آنالیز گردید و مقایسه میانگین‌ها بر اساس روش Duncan انجام گرفت.

**نتایج:** نتایج به دست آمده، تغییر در آناتومی برگ گیاهان تحت تنش را نشان داد. تغییرات شدید انواع فلاونوئیدها همراه با افزایش در میزان کل فلاونوئیدها نیز در تنش روی و نیکل مشاهده شد. نتیجه دیگری که حاصل شد، افزایش معنی‌دار نیتروتوکسین در طی تنش با عناصر سنگین به کار برده شده بود.

**نتیجه‌گیری:** احتمالاً گیاه *Coronilla varia* L. با افزایش و تغییر در میزان فلاونوئیدها و افزایش مقدار نیتروتوکسین‌ها تا حدی توانسته است در مقابل آسیب ناشی از تنش عناصر سنگین روی و نیکل مقاومت نماید.

**واژگان کلیدی:** آناتومی، فلاونوئیدها، کلرید روی و نیکل، نیتروتوکسین‌ها، یونجه تاجی

## مقدمه

عناصر سنگین دسته‌ای از آلوده کننده‌های محیطی می‌باشند که میزان آنها با پیشرفت صنعت روز به روز در حال افزایش است. ورود این آلاینده‌ها به درون اکوسیستم زمین به عنوان یک خطر جدی برای حیات اکوسیستم به شمار می‌آید (۱). میزان ورود این عناصر سنگین به داخل محیط زیست، بسیار فراتر از میزانی است که به وسیله فرآیندهای طبیعی برداشت می‌شوند. بنابراین تجمع این عناصر در محیط زیست که ماندگاری طولانی مدت و تقریباً دائمی نیز در محیط داشته سلامت انسان را به مخاطره می‌اندازد و مواجهه انسان با بعضی از آنها از طریق آب و مواد غذایی می‌تواند مسمومیت‌های مزمن و حاد و خطرناکی ایجاد نماید (۲). گیاهان بامکانیسم‌های مختلفی در برابر این عناصر مقاومت می‌نمایند. تغییر در مورفولوژی برگ‌ها در گیاهان تحت تنش می‌تواند به عنوان مزیت سازشی مطرح شود که برگ‌ها را قادر می‌سازد تا بتوانند زندگی خود را در برابر تنش حفظ بنمایند. نیکل موجب بروز کلروز در برگ می‌گردد که در نهایت به صورت نکروز ادامه یافته و سپس برگ به طور کامل تیره می‌شود (۳). کاهش در میزان آب نسبی گیاه (۴)، کاهش سطح برگ و شدت تعرق، به علت زیادی عناصر سنگین در محیط کشت می‌باشد که جذب و انتقال آب را کاهش می‌دهد (۵) و می‌تواند بر سیستم فتوسنتزی نیز اثر گذارد (۶). در نتیجه در طی تنش با عناصر سنگین، گیاهان به سوی پژمردگی رفته و به طور کلی با کاهش جذب آب، تعداد روزنه‌ها را در برگ افزایش می‌دهند. مشخص شده است که عناصر سنگین ساختار اپیدرمی را تغییر می‌دهند و می‌توانند سبب کاهش اندازه سلول، افزایش کوتیکول، تعداد روزنه و کرک و همچنین کاهش اندازه سلول‌های نگهبان شوند (۷).

گیاهان انواع شگفت‌انگیزی از متابولیت‌های ثانویه را دارا هستند. یکی از مهم‌ترین متابولیت‌های ثانویه، فلاونوئیدها هستند. افزایش متابولیسم فلاونوئیدها و مقدار ترکیبات فنلیکی می‌تواند تحت فاکتورهای محیطی مختلف و شرایط تنشی مشاهده شود. افزایش فلاونوئیدهای محلول مانند آن‌هایی که در بیوسنتز لیگنین دخالت می‌کنند می‌توانند منجر به تغییر در آناتومی در طی تنش شوند (۸). فلاونوئیدها همچنین موجب افزایش در پایداری دیواره سلولی و ایجاد مانع فیزیکی برای حفاظت سلول‌ها در مقابل عملکرد مضر عناصر سنگین می‌شوند. در سال‌های اخیر خواص آنتی‌اکسیدانی فلاونوئیدها بیشتر مورد توجه است (۹). فعالیت آنتی‌اکسیدانی آن‌ها به طور عمده مربوط

به خاصیت احیایی آن‌هاست که اجازه می‌دهد به عنوان عوامل احیایی، دهنده هیدروژن، برطرف کننده‌های اکسیژن منفرد و همبند شوندگان با عناصر عمل کنند (۱۰). گزارشات بسیار زیادی، القاء انباشتگی ترکیبات فنلیکی و فعالیت پراکسیدازها در گیاهان تیمار شده با غلظت بالای عناصر را نشان می‌دهند. فلاونوئیدها دارای گروه‌های هیدروکسیل و کربوکسیل هستند که قادرند به طور اختصاصی به عناصر سنگین باند شوند (۱۱). ریشه‌های بسیاری از گیاهان در معرض عناصر سنگین، میزان بالای تولید فلاونوئیدها را دارند (۱۲). نتایج تیمار با عناصر سنگین در گیاه *Phaseolus vulgaris* افزایش قابل توجه در فلاونوئیدها را نشان داد. به طور کلی تصور می‌شود فلاونوئیدها از آسیب اکسیداتیو با جاروب کردن انواع اکسیژن واکنش‌گر و شکستن واکنش‌های زنجیری رادیکالی در طی پروکسیداسیون لیپیدی جلوگیری می‌کنند. این اثرات اکسیداتیوی نیاز به شکل احیاء شده فلاونوئیدها دارد و شکل اکسید شده آن‌ها تنها به عنوان پرواکسیدانت عمل می‌کند (۱۰). مطالعات فلاونوئیدهای برگ ۶ گونه لگوم آلوده به آلاینده‌های فلورایدی با استفاده از روش کروماتوگرافی نشان داد که تغییر در تعداد، مقدار و نوع فلاونوئیدهای گیاهان آلوده نسبت به شاهد رخ می‌دهد و تغییر ترکیبات فلاونوئیدی می‌تواند در پاسخ به تنش آلودگی و نوعی سازش با شرایط نامساعد محیطی باشد (۱۳).

نیترتوکسین‌ها یا نیترتوگلوکوزیدها ترکیبات نیترتوژن‌دار آلیفاتیک سمی می‌باشند که از لحاظ شیمیایی و ساختاری، استرهای گلوکز ۳-نیترتو-۱-پروپوینیک اسید هستند که در برخی از لگوم‌ها مانند *Coronilla varia* یافت شده‌اند. سمیت *Coronilla* ناشی از وجود ۳-نیترتو پروپوینیک اسید در آن است. تنش‌های فیزیولوژیکی سبب افزایش غلظت گلوکوزیدهای سمی در گیاهان می‌شود و این افزایش غلظت می‌تواند به دلیل تنش آب یا کمبودهای تغذیه‌ای باشد. تنش آبی در گیاهان سبب افزایش سمیت در آن‌ها می‌شود و تنش خشکی در *Cyperus rotundus* L. سبب افزایش متابولیت‌های ثانویه سمی در ریشه می‌گردد (۱۴). بر مبنای تحقیقات نوری و همکاران (۱۵) گیاهانی که در مناطق خشک و بیابانی بوده و یا آبیاری نمی‌شوند غلظت بالای از ترکیبات نیترتوکسین را دارا می‌باشند. آبیاری با رطوبت کافی میزان نیترتوکسین‌ها را در گیاهان کاهش می‌دهد. بنابراین به نظر می‌رسد ترکیبات نیترتوژنی در شرایط خشک و بی‌آبی، نقش دفاعی برای گیاه داشته باشند. همچنین لگوم‌های جمع آوری شده از مناطق تحت

مدل Leica Galen III عکس مناسب تهیه شد. دهانه روزنه‌ها در اپیدرم‌های زیری و رویی برگ به کمک گراتی کیول اندازه گیری و ثبت گردید.

**مطالعه فلاونوئیدهای برگ:** بررسی و شناسایی فلاونوئیدها با روش کروماتوگرافی کاغذی به دو روش دو بعدی و لایه نازک به شرح زیر انجام گردید.

**تهیه عصاره از گیاهان:** به ۰/۱ گرم برگ‌های خرد شده هر یک از نمونه‌ها ۵ میلی‌لیتر الکل اتیلیک ۷۰ درصد افزوده شد و در حمام آب گرم ۸۵ درجه سانتی‌گراد به مدت دو دقیقه جوشانده و ۲۴ ساعت در محیط آزمایشگاه قرار داده شد. عصاره برگ‌ها در ظرف‌های جداگانه‌ای صاف شده و اجازه داده شد تا در دمای اتاق تبخیر شوند.

**کروماتوگرافی کاغذی دو بعدی (Two-dimensional Paper chromatography):** به

تعداد نمونه گیاهی کاغذ کروماتوگرافی واتمن NO-1 به ابعاد ۲۳ در ۲۸/۵ سانتی‌متر بریده و تا زده شد. سپس روی خط دوم به فاصله ۷ سانتی‌متری از سمت راست کاغذ، نقطه‌هایی را با مداد برای گذاشتن لکه نمونه علامت‌گذاری کرده و در سمت چپ کاغذ محل قرار گرفتن معرف روتین (Rutin) روی کاغذ کروماتوگرافی علامت‌گذاری شد. به هر شیشه ساعت محتوی عصاره ۰/۵ میلی‌لیتر الکل اتیلیک ۷۰ درصد اضافه و سپس به کمک لوله موئینه (هماتوکریت آبی) کمی از این محلول روی نقطه مشخص شده روی کاغذ قرار داده شد. به موازات این کار به وسیله لوله موئینه‌ای در قسمت سمت چپ کاغذ کروماتوگرافی معرف روتین را قرار داده و دو تا سه بار این کار تکرار گردید.

نیمه استوانه‌های کروماتوتانک مشابه شاندون بزرگ را با محلول BAW (بوتانول، اسید استیک و آب ۴:۱:۵) پر کرده سپس کروماتوگرام‌ها را داخل محلول گذاشته تا محلول به آرامی به طرف پایین حرکت کند (کروماتوگرافی نزولی). وقتی محلول به حدود ۱/۵ تا ۲ سانتی‌متری لبه انتهایی کاغذ رسید، کاغذها از حلال خارج و به مدت ۸ تا ۱۵ ساعت زیر هود آویخته تا کاملاً خشک شود. سپس کروماتوگرام‌ها را در نور UV با طول موج ۳۶۶ نانومتر مطالعه و اندازه و محل لکه‌ها علامت‌گذاری گردید. محل انتهایی حرکت حلال را هم مشخص کرده تا در محاسبه RF (فاصله حرکت لکه بر کل فاصله) هر لکه مورد استفاده قرار

تأثیر آلاینده‌های فلئوئورایدی وجود نیترو توکسین‌ها را در گیاهان آلوده نسبت به گیاهان شاهد نشان دادند (۱۶).

یونجه‌تاجی از خانواده نخود (Leguminosae) متعلق به زیر خانواده Papilionoideae می‌باشد. از آنجا که گیاه یونجه‌تاجی برای کنترل فرسایش خاک به کار می‌رود در صورتی که این گیاه بتواند در برابر تنش عناصر سنگین نیز مقاومت نماید می‌توان از این گیاه در مناطق آلوده به این عناصر نیز استفاده نمود. لذا این تحقیق با هدف بررسی تأثیر دو عنصر سنگین نیکل و روی بر آناتومی، ترکیبات فلاونوئیدی و نیترو توکسین‌ها در گیاه یونجه تاجی طراحی و انجام گردید.

## مواد و روش‌ها

**کشت بذر و تیمار با عناصر نیکل و روی:** بذرهای یونجه تاجی (*Coronilla Varia L.*) از شرکت پاکان بذر اصفهان تهیه گردید. کشت بذر در گلدان با نسبت ۱:۱ خاک کشاورزی به پرلیت کشت گردید. پس از کشت ۲۰ بذر در هر گلدان، آنها با محلول یک دوم هوگلند (۱۷) آبیاری و در اتاق کشت با دمای  $25 \pm 2$  درجه سانتی‌گراد و فتوپریود ۱۶/۸ ساعت و نور ۳۰۰۰ لوکس نگهداری گردیدند. در مراحل اولیه گلدان‌ها هر ۲ روز یکبار با آب مقطر آبیاری شده و در مراحل بعد از جوانه‌زنی (بعد از ۲ هفته از کشت بذر) هفته‌ای یکبار با محلول ۱/۲ هوگلند و یک بار با آب مقطر آبیاری شدند. برای انجام تیمار فلزات سنگین، گیاهان ۴۰ روزه با دقت کامل از خاک مرطوب خارج و ریشه گیاهان چندین مرتبه با آب مقطر شستشو گردیدند. سپس این گیاهان در لوله‌های اپندرفی که انتهای آنها بریده شده بودند قرار گرفتند و در ظرف‌هایی با اندازه ۳۰ در ۱۵ سانتی‌متری و با ارتفاع ۲۰ سانتی‌متر حاوی محلول ۱/۲ هوگلند به عنوان شاهد و ۱/۲ هوگلند همراه با غلظت های ۲/۵، ۵، ۷/۵ و ۱۰ میلی‌مولار کلرید نیکل و ۷/۵، ۱۵، ۲۲/۵ و ۳۰ میلی‌مولار کلرید روی قرار داده شدند. برای انجام تهویه مناسب نیز از پمپ هوا استفاده شد. گیاهان منتقل شده به شرایط هیدروپونیک در همان شرایط دمایی و فتوپریود مذکور قرار داده شد و پس از ۲۴ و ۷۲ ساعت گیاهان در دو مرحله جهت آنالیزهای مورد نظر برداشت گردیدند.

**مطالعه آناتومی برگ:** اپیدرم سطح رویی و زیرین برگ‌ها بر مبنای روش Widuri و همکاران (۱۸) با تهیه اسلایدهای نیمه دایمی مطالعه از آنها به وسیله میکروسکوپ مونیتورینگ

میرستین، کوئرستین، روتین و کامفرول، ویتکسین و رامنتین مقایسه گردید و نوع هر لکه مشخص شد.

**آزمایش تعیین کمی نیتروتوکسین‌ها:** جمع‌آوری و خشک نمودن برگها و تعیین کمی نیتروتوکسین‌های آلیفاتیک بر مبنای روش بیان شده در منابع انجام گرفت (۲۰ و ۲۱). ۰/۰۲ گرم از برگ‌های خشک هر سری گیاه در ۲ لوله آزمایش به صورت پودر درآمدند. لوله شماره یک به عنوان شاهد و لوله شماره ۲ به عنوان نمونه آزمایشی در نظر گرفته شد. به هر ۲ لوله مقدار ۱ میلی‌لیتر اسید کلریدریک ۱ نرمال اضافه گردیده و به مدت ۲ ساعت در محیط آزمایشگاه قرار داده شدند. سپس ۱ میلی‌لیتر پتاس ۲۰ درصد به هر یک از لوله‌ها اضافه و به مدت ۲ ساعت در محیط آزمایشگاه قرار گرفتند. به لوله شاهد، ۲ میلی‌لیتر اسید استیک گلاسیال افزوده و به لوله نمونه، ابتدا ۱ میلی‌لیتر اسید استیک گلاسیال و فوراً ۱ میلی‌لیتر معرف Griess-Ilosvay اضافه شد. در صورت وجود ترکیبات نیتروتوکسین، ظهور فوری رنگ از صورتی تا قرمز تیره قابل مشاهده است. بیشترین مقدار رنگ ۳ دقیقه پس از افزودن معرف مشاهده می‌شود. به هر یک از لوله‌های آزمایش برحسب شدت رنگ، اعداد ۱ تا ۵ داده می‌شود که این مقدار به طور تقریبی بیان‌گر میزان نیتروتوکسین‌ها برحسب  $\text{mg/g NO}_2$  وزن خشک می‌باشد. این اعداد برابر ۱-۴، ۲-۴، ۳-۹، ۴-۱۹ و ۵-۲۵ می‌باشند (۱۵).

**اندازه‌گیری طیف جذبی نمونه‌ها:** محلول حاصل از مرحله قبل را به وسیله کاغذ صافی صاف کرده و میزان جذب هر یک از لوله‌ها در طول موج ۴۰۰-۸۰۰ نانومتر به کمک دستگاه اسپکتروفتومتر مدل CE 4400 UV VIS DOUBLE BEAM SCANNING SPECTROPHOTOMETER خوانده شد و نتایج ثبت گردید.

**آنالیزهای آماری در این تحقیق:** جهت آنالیز داده‌ها از نرم افزار SPSS نسخه ۱۵، مقایسه میانگین‌ها از تست دانکن و رسم نمودارها از نرم افزار Excel استفاده گردید.

گیرد. سپس کروماتوگرام‌ها را از لبه ۷ سانتی‌متری مجدداً تا زده و این بار در کروماتوتانک حاوی اسید استیک ۱۵ درصد قرار گرفتند، پس از رسیدن حلال به ۲-۱/۵ سانتی‌متری انتهای کاغذ، آن‌ها را بیرون آورده و به مدت ۲۴ ساعت زیر هود قرار داده شدند تا کاملاً خشک گردند. مجدداً کروماتوگرام‌ها در نور UV ۳۶۶ نانومتر مطالعه و علامت‌گذاری انجام گردید. مقدار RF برای هر لکه در BAW و اسید استیک ۱۵٪ (HOAc) محاسبه و در جدول ثبت شد (۱۹).

### کروماتوگرافی لایه نازک

**(Thin layer chromatography):** عصاره‌های باقیمانده از مرحله قبلی را در ۱/۵ میلی‌لیتر اتانول ۷۰ درصد حل کرده و ۲ میلی‌لیتر اسید کلریدریک ۲ مولار به هر یک از نمونه‌ها اضافه شده و به مدت نیم ساعت در حمام آب گرم ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند تا به طور کامل هیدرولیز گردیدند. پس از سرد شدن، ۲ میلی‌لیتر اتیل استات ۱۰۰ درصد به هر لوله اضافه کرده تا دو فاز تشکیل گردید. فاز روایی با کمک پی‌پت پاستور جدا و تبخیر گردید. سپس ۰/۵ میلی‌لیتر اتانول ۷۰ درصد به هر یک از آن‌ها اضافه کرده و از عصاره حاصل برای TLC استفاده شد. کاغذهای کروماتوگرافی لایه نازک سلولزی Art. 5565 Dc- plastic Folien cellulose F Merck 6412 3064 به ابعاد مناسب بریده و به وسیله لوله فوق موئینه از عصاره گیاهان تیمار شده و شاهد و معرف‌های فلاونوئید (تهیه شده از مرک، سیگما و فلوکا) شامل میرستین (Myricetin)، کوئرستین (Quercetin)، کامفرول (Kaempferol)، روتین، ویتکسین (Vitexine) و رامنتین (Rhamnetine) روی آن‌ها لکه‌گذاری شد. پس از خشک شدن کروماتوگرام‌ها آن‌ها را در کروماتوتانک‌های حاوی سه نوع حلال CAW (کلروفرم، اسید استیک و آب ۲:۱۵:۳۰) فروستال (اسید کلریدریک، آب و اسید استیک ۳:۱۰:۳۰) و BAW (بوتانل اسید استیک و آب ۵:۱:۴) گذاشته شد. هر حلال را در کروماتوتانک جداگانه ریخته به طوری که ارتفاع حلال یک سانتی‌متر بود. سپس کاغذها داخل کروماتوتانک‌ها قرار داده شدند. وقتی حلال تا یک سانتی‌متر مانده به انتهای کاغذ بالا آمد، کاغذها خشک شده و در نور UV در طول موج ۳۶۶ نانومتر اندازه و رنگ لکه‌ها با مداد مشخص شد. مقدار RF (فاصله حرکت لکه بر کل فاصله) برای هر لکه در BAW، فروستال و CAW محاسبه و اندازه RF استانداردهای

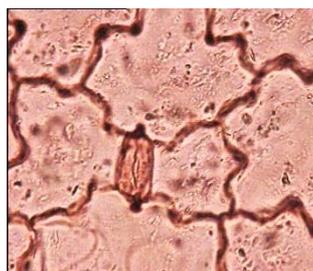
## نتایج

## تغییرات آناتومی برگ در تیمار با غلظت‌های مختلف

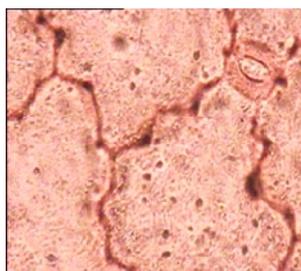
:NiCl<sub>2</sub> و ZnCl<sub>2</sub>

اپیدرم رویی و زیرین گیاه یونجه تاجی تیمار شده با غلظت‌های متفاوت نیکل و روی به مدت ۷۲ ساعت مورد بررسی قرار گرفت (شکل ۱ و ۲). در بررسی آناتومی برگ گیاهان شاهد و تیمارها نشان داده شد که دیواره سلول‌های اپیدرمی با افزایش غلظت تیمار افزایش چین خوردگی را نسبت به شاهد نشان داد (داده‌ها

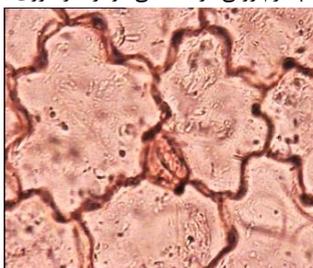
نشان داده نشده است). میزان باز بودن دهانه روزنه هوایی نیز تحت تأثیر تنش عناصر سنگین قرار گرفت. آنالیز داده‌های اندازه دهانه روزنه نشان داد که با افزایش غلظت تیمار باز بودن دهانه روزنه به طور معنی‌داری کاهش یافت و در غلظت‌های بالاتر تیمار این کاهش منجر به بسته شدن کامل دهانه روزنه شد. بالاترین اندازه دهانه روزنه هوایی مربوط به گیاه شاهد بود (شکل ۳).



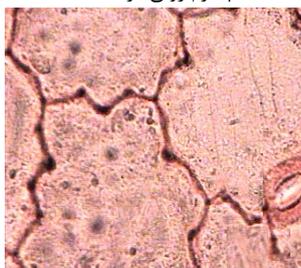
اپیدرم رویی در ۳۰ میلی مولار کلریدروی



اپیدرم رویی در شاهد

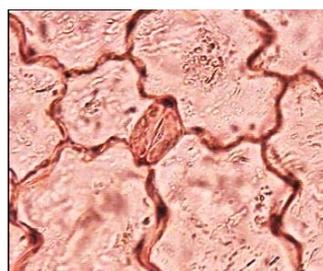


اپیدرم زیرین در ۳۰ میلی مولار کلریدروی

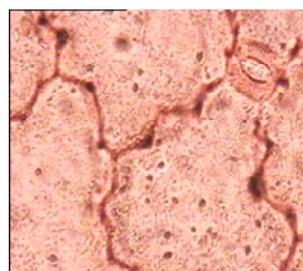


اپیدرم زیرین در شاهد

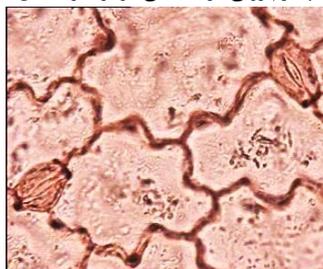
شکل ۱: اپیدرم رویی و زیرین برگ گیاه در ۷۲ ساعت تیمار با غلظت‌های متفاوت کلریدروی (بزرگنمایی ۴۰).



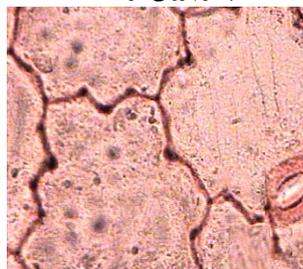
اپیدرم رویی در ۱۰ میلی مولار کلریدنیکل



اپیدرم رویی در شاهد

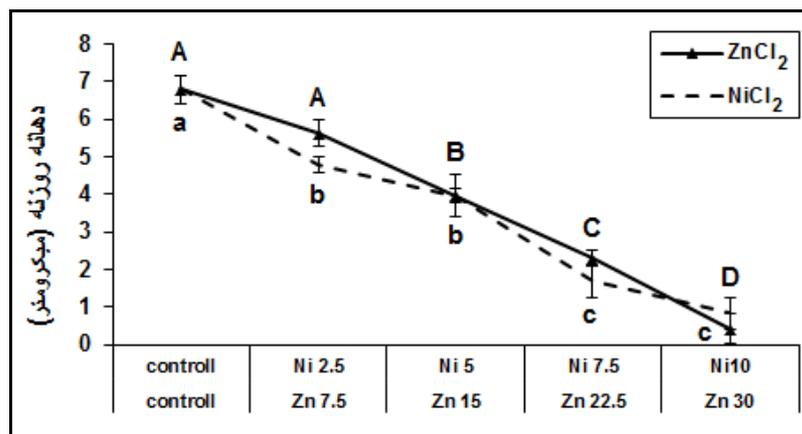


اپیدرم زیرین در ۱۰ میلی مولار کلریدنیکل

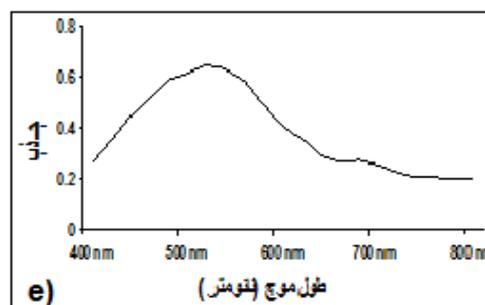
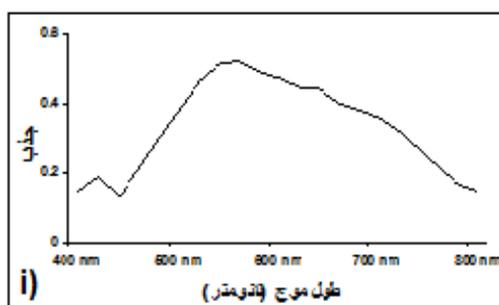
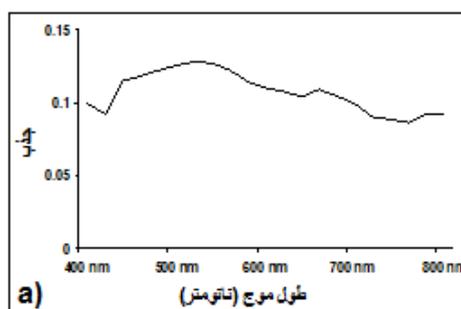


اپیدرم زیرین در شاهد

شکل ۲: اپیدرم رویی و زیرین برگ گیاه در ۷۲ ساعت تیمار با غلظت‌های متفاوت کلریدنیکل (بزرگنمایی ۴۰).



شکل ۳: تأثیر عناصر سنگین روی و نیکل با غلظت‌های مختلف در ۷۲ ساعت تیمار بر اندازه گشودگی روزنه در گیاه یونجه تاجی. حروف نامشابه در هر زمان نشان‌دهنده معنی‌دار بودن در غلظت‌های مختلف می‌باشد. داده‌ها میانگین  $\pm$  انحراف معیار می‌باشند



شکل ۴: طیف جذبی نیتروتوکسین در طول موج ۴۰۰ تا ۸۰۰ نانومتر در شاهد (a)، تیمار با غلظت ۳۰ میلی مولار کلرید روی (e) و ۱۰ میلی مولار کلرید نیکل (i)

غلظت‌های تیمار با روی و نیکل و همچنین گیاه شاهد دیده شد. فلاونوئید Aglycone نیز در تیمار با کلرید روی در هر دو زمان ۲۴ و ۷۲ ساعت پس از تیمار و تیمار با کلرید نیکل در ۲۴ و ۷۲ ساعت پس از تیمار به طور معنی‌داری افزایش نشان داد. فلاونوئیدهای رامنتین، کامفرول، میرستین، ویتکسین، روتین و کوئرستین نیز در گیاه شاهد و غلظت‌های مختلف تیمار با کلرید روی و کلرید نیکل تغییراتی داشتند که در جداول شماره ۱ و ۲ قابل مشاهده می‌باشد.

#### بررسی میزان فلاونوئیدها در تیمار با غلظت‌های مختلف ZnCl<sub>2</sub> و NiCl<sub>2</sub>:

مطابق جداول ۱ و ۲ نتایج اندازه‌گیری فلاونوئید نشان داد که در برگ گیاهان یونجه تاجی که در تیمار با کلرید روی و کلرید نیکل با غلظت‌های مختلف قرار گرفته بودند، تعداد فلاونوئید کل (NTF) با افزایش غلظت تیمار در هر دو زمان ۲۴ و ۷۲ ساعت پس از تیمار به طور معنی‌داری افزایش یافت. Flavone C&O-glycosides و Flavonoid sulfates نیز در تمام

طیف جذبی نیتروتوکسین در طول موج بین ۴۰۰-۸۰۰ نانومتر در تیمارهای کلریدروی و کلریدنیکل در شکل ۴ نشان داده شده است.

بررسی میزان نیتروتوکسین‌ها در تیمار با غلظت‌های مختلف  $\text{ZnCl}_2$  و  $\text{NiCl}_2$ :

بررسی داده‌های نیتروتوکسین نشان داد که در تنش عناصر سنگین روی و نیکل میزان نیتروتوکسین به طور معنی‌داری نسبت به گیاه شاهد افزایش می‌یابد (جدول شماره ۳).

جدول ۱: تغییرات میزان فلاونوئیدها در برگ گیاه یونجه‌تاجی در تیمار با غلظت‌های مختلف کلریدروی و کلریدنیکل به مدت ۲۴ و ۷۲ ساعت.

	Treatment (mM)	Time (h)	NTF	Flavonoid sulfates	Flavone C & C/O-glycosides	Aglycones	Markers					
							Rh	K	M	V	Ru	Q
CMF1	Control	24	5	4	1	0	+	-	-	-	-	+
CMF2	Control	72	4	3	1	0	+	-	+	-	+	+
CMF3	ZnCl2 7/5	24	6	4	2	0	+	-	+	+	-	-
CMF4	ZnCl2 7.5	72	6	3	3	0	++	-	-	+	-	-
CMF5	ZnCl2 15	24	6	3	3	0	+	+	+	+	-	-
CMF6	ZnCl2 15	72	7	3	4	0	+	++	+	+	+	-
CMF7	ZnCl2 22/5	24	7	3	3	1	+	++	+	++	-	+
CMF8	ZnCl2 22/5	72	8	3	4	1	-	+	-	+	+	+
CMF9	ZnCl2 30	24	11	4	4	2	++	++	-	+	+	+
CMF10	ZnCl2 30	72	12	4	5	3	++	++	+++	+	+	++
CMF11	NiCl2 2/5	24	5	4	1	0	+	-	-	-	-	+
CMF12	NiCl2 2/5	72	4	3	1	0	+	-	+	-	+	+
CMF13	NiCl2 5	24	6	4	2	0	+	++	-	-	++	+
CMF14	NiCl2 5	72	6	3	3	0	++	++	-	-	++	+
CMF15	NiCl2 7/5	24	6	3	2	1	-	++	-	-	+	+
CMF16	NiCl2 7/5	72	7	3	3	1	+	+	-	-	+	+
CMF17	NiCl2 10	24	8	5	2	1	-	++	-	+	++	+
CMF18	NiCl2 10	72	8	2	5	1	+	+	-	+	++	++

NTF= Number of total flavonoids, Ru=Rutin, Q= Quercetin, K= Kaempferol M= Myricetin, Rh=Rhamnetine, V= Vitexine-(non flavonoid), + (few flavonoid), ++ (high concentration of flavonoid) and +++ (very high concentration of flavonoid).

جدول ۲: آنالیز داده‌های بررسی فلاونوئیدها در تیمار با روی و نیکل در مدت زمان ۲۴ و ۷۲ ساعت.

	F(ZnCl2,24hours)	F(ZnCl2, 72hours)	F(NiCl2,24hours)	F(ZnCl2, 72hours)
NTF	16/5**	26/4**	5/4*	15**
Flavonoid sulfates	0/9 <sup>ns</sup>	۰/6 <sup>ns</sup>	1/5 <sup>ns</sup>	۰/721 <sup>ns</sup>
Flavone C& C/O-glycosides	3/9*	6/9**	1/5 <sup>ns</sup>	8/154**
Aglycones	6**	12/75**	1/5 <sup>ns</sup>	5/342*
Rh	0/6 <sup>ns</sup>	2/625 <sup>ns</sup>	3/5*	۰/9 <sup>ns</sup>
k	5*	5*	3 <sup>ns</sup>	2/625 <sup>ns</sup>
M	1/5 <sup>ns</sup>	7/5**	۰ <sup>ns</sup>	2/5 <sup>ns</sup>
V	1/875 <sup>ns</sup>	۰/75 <sup>ns</sup>	6**	11/875**
Ru	3 <sup>ns</sup>	۰/75 <sup>ns</sup>	3 <sup>ns</sup>	۰/9 <sup>ns</sup>
Q	1/5 <sup>ns</sup>	3/5*	0 <sup>ns</sup>	۰/654 <sup>ns</sup>

\*\* معنی‌دار در سطح ۰/۰۱

\* معنی‌دار در سطح ۰/۰۵

جدول ۳: میزان تقریبی نیتروتوکسین و ماکزیمم طول موج جذبی نیتروتوکسین در طول موج ۴۰۰-۸۰۰ نانومتر در گیاهان تیمار شده با غلظت‌های مختلف کلریدروی و کلریدنیکل. حروف نامشابه در هر عنصر و در هر زمان نشان‌دهنده معنی‌دار بودن می باشد

Heavy metal	Concentration (mM)	Time (hour)	Nitrotoxin (Mg/g)	Maximum wavelength	
ZnCl <sub>2</sub>	0	24	1-4 <sup>a</sup>	0.161	
	7.5		9-13 <sup>bc</sup>	0.401	
	15		14-19 <sup>c</sup>	0.438	
	22.5		4-8 <sup>ab</sup>	0.338	
	30		14-19 <sup>c</sup>	0.589	
	0		72	1-4 <sup>a</sup>	0.129
	7.5	4-8 <sup>a</sup>		0.361	
	15	14-19 <sup>b</sup>		0.512	
	22.5	14-19 <sup>b</sup>		0.505	
	30	20-25 <sup>b</sup>		0.648	
	NiCl <sub>2</sub>	0		24	1-4 <sup>a</sup>
		2.5	4-8 <sup>a</sup>		0.412
5		14-19 <sup>b</sup>	0.587		
7.5		14-19 <sup>b</sup>	0.508		
10		20-25 <sup>b</sup>	0.631		
0		72	1-4 <sup>a</sup>		0.129
2.5			4-8 <sup>ab</sup>	0.382	
5			4-8 <sup>bc</sup>	0.338	
7.5			20-25 <sup>cd</sup>	0.622	
10			14-19 <sup>d</sup>	0.522	

## بحث

نگهبان روزنه آب خود را از دست داده و منجر به بسته شدن دهانه روزنه‌ها می‌شود (شکل ۱ و ۲). از طرف دیگر کاهش رشد ناشی از تنش عناصر سنگین سبب افزایش بارگیری فلوئم شده و منجر به کاهش فعالیت آنزیم‌ها و واکنش‌های چرخه کالوین می‌شود و در نهایت منجر به تنظیم منفی فتوسنتز و کاهش زنجیره انتقال الکترون می‌گردد (۲۲) که این کاهش نیاز به دی‌اکسیدکربن ناشی از کاهش چرخه کالوین سبب کاهش میزان دهانه روزنه شده و در نتیجه روزنه‌ها بسته می‌شوند (۲۳).

**تغییرات فلاونوئیدها در تنش روی و نیکل:** تغییرات قابل توجه در میزان فلاونوئیدها در غلظت‌های مختلف تیمار روی و نیکل نسبت به شاهد مشاهده گردید. طبق جدول شماره ۲ میزان فلاونوئید کل (NTF) در طی تنش با هر دو عنصر روی و نیکل و در هر دو زمان ۲۴ و ۷۲ ساعت به طور معنی‌داری افزایش نشان داد. Flavone C & C/O-glycosides و Flavonoid sulfates در شاهد و همه غلظت‌های تیمار با روی و نیکل در هر دو زمان ۲۴ و ۷۲ ساعت وجود داشتند. Aglycone و Flavone C & C/O-glycosides افزایش

**تغییرات آناتومی برگ در تنش روی و نیکل:** با افزایش غلظت تیمار روی و نیکل، اندازه دهانه روزنه‌ها به طور معنی‌داری کاهش یافت (شکل ۳). به طور کلی روزنه‌ها به عنوان نمایش‌گرهای زیستی آلودگی محیطی عمل می‌کنند. مشابه با نتایج ما در آزمایشی با تیمار جوانه‌های ۱۵ روزه دو گونه *Lens culinaris* و *Phaseolus mungo* با عناصر سنگین نشان داده شد که اندازه دهانه روزنه در گیاه شاهد در مقایسه با تیمارها بزرگ‌تر بود و در تیمارها اندازه دهانه روزنه کاهش یافته بود (۴). افزایش میزان عناصر سنگین در محیط کشت می‌تواند سبب کاهش در میزان آب نسبی گیاه شود که با کاهش سطح برگ و کاهش شدت تعرق همراه است که در کل جذب و انتقال آب را کاهش می‌دهد (۵) که این امر می‌تواند بر سیستم فتوسنتزی گیاه نیز اثر گذارد (۶). همچنین انباشتگی عناصر سنگین در ریشه‌ها بازدارنده انتقال آب می‌باشد که این امر می‌تواند موجب بسته‌تر شدن دهانه روزنه‌ها گردد. از دیگر علل کاهش میزان دهانه روزنه‌ها می‌تواند کاهش میزان آب سلول در نتیجه کاهش جذب آب باشد که فشار تورژسانس کاهش یافته و سلول‌های

معنی‌داری را در تنش با عنصر روی در هر دو زمان ۲۴ و ۷۲ ساعت نشان داد و در مورد تنش نیکل تنها در زمان ۷۲ ساعت افزایش معنی‌دار بود. به طور کلی در گیاهان بسته به ماهیت تنش وارده به آن‌ها انواع مختلفی از فلاونوئیدها تولید می‌شود (۲۴). سنتز ایزوفلاون‌ها و برخی فلاونوئیدهای دیگر، وقتی گیاهان آلوده یا مجروح شوند یا تحت دماهای پایین و شرایط کمبود تغذیه‌ای قرار گیرند، القاء می‌شوند. القاء بیوسنتز ترکیبات فنلی در گندم در پاسخ به سمیت نیکل و در ذرت در پاسخ به سمیت آلومینیوم مشاهده شده است (۸). در آزمایش دیگری که توسط Sakihama و همکاران (۱۰) در تیمار با سرب در گیاه *Phaseolus vulgaris* انجام گرفت افزایش قابل توجه در ترکیبات فنلی نشان داده شد. یکی از علل افزایش فنلیک‌ها می‌تواند افزایش در فعالیت آنزیم‌های دخیل در متابولیسم ترکیبات فنلیکی طی تنش عناصر سنگین باشد (۸). طبق تحقیقات Feucht و همکاران (۲۵) بر روی گونه *Fagus sylvatica* در منطقه با آلودگی هوای سنگین تغییرات شدیدی در میزان فلاونول مشاهده کرد (۲۶). طبق جدول شماره ۱ میزان کامفرول و میرستین و کوئرستین در تیمار با کلریدروی در مقایسه با گیاه شاهد افزایش یافت به طوری که در ۲۴ ساعت تیمار با کلریدروی تنها میزان کامفرول به طور معنی‌داری افزایش نشان داد اما با افزایش مدت تیمار از ۲۴ ساعت به ۷۲ ساعت علاوه بر کامفرول، کوئرستین و میرستین نیز افزایش معنی‌داری نشان دادند. این نتیجه با نتایج به دست آمده توسط نوری و همکاران (۲۷) مشابه بود که در گونه *Robina pseudo-acacia L.* افزایش میزان فلاونوئید کل و کامفرول و میرستین را در طی تنش فلئوراید مشاهده کردند. همچنین طبق مطالعات Robles و همکاران (۲۶) فلاون ساده میرستین با آلودگی  $O_3$  رابطه مثبتی داشته و از سبب القاء سنتز میرستین در برگ‌های *Pinus halepensis* شد. در تیمار با کلریدنیکل در ۲۴ ساعت تیمار افزایش معنی‌داری در میزان ویتکسین و کاهش در میزان رامنترین نسبت به گیاه شاهد مشاهده شد در حالی که با افزایش مدت تیمار با کلریدنیکل تنها ویتکسین افزایش معنی‌دار نشان داد (جدول ۲).

موقعیت جغرافیایی، شرایط فصلی، خاک و اقلیم بر میزان ترکیبات نیتروژنی تأثیرگذار است (۲۸). تنش خشکی در *Cyperus rotundus L.* سبب افزایش متابولیت‌های ثانویه سمی در ریشه می‌شود (۱۴). همچنین طبق تحقیقات کوگیل (۲۸) در یک دوره ۶ ساله میزان تولید ترکیبات نیتروتوکسینی در سیزده گونه گون بسته به میزان خشکی و رطوبت متغیر است و در یک سال خشک میزان  $NO_2$  در برگ‌ها ممکن است به ۳۰ تا ۳۵ میلی گرم در گرم وزن خشک برسد. دو عنصر روی و نیکل به طور معنی‌داری سبب افزایش میزان ترکیبات نیتروتوکسین در گیاهان یونجه تاجی تحت تنش نسبت به گیاهان شاهد می‌شوند. بالا بودن میزان عناصر سنگین در محیط کشت می‌تواند منجر به کاهش در میزان آب نسبی گیاه شود (۴) و از آنجایی که در غلظت‌های مورد استفاده در این پژوهش میزان پژمردگی گیاه با تیمار عناصر سنگین افزایش یافت در نتیجه بر مبنای تحقیقات نوری و همکاران (۱۵) گیاهانی که در مناطق خشک و بیابانی بوده و یا آبیاری نمی‌شوند غلظت بالایی از ترکیبات نیتروتوکسین را دارا می‌باشند. آبیاری با رطوبت کافی، میزان  $NO_2$  را در گیاهان کاهش می‌دهد، بنابراین به نظر می‌رسد ترکیبات نیتروژنی در شرایط تنش خشکی و بی‌آبی، نقش دفاعی برای گیاه داشته باشند.

### نتیجه گیری

همان‌طور که در بخش‌های قبلی بیان گردید برخی از عناصر سنگین برای رشد و نمو گیاهان مورد نیاز بوده و در برخی از فرآیندهای متابولیسمی مهم در گیاهان شرکت می‌کنند اما افزایش این عناصر بیش از حد طبیعی در سلول می‌تواند سبب برهم زدن هومئوستازی یونی سلول‌ها گردند. از طرف دیگر چون عناصر سنگین دارای الکترون‌های جفت نشده در اوربیتال d خود می‌باشند، در نتیجه دهنده خوب الکترون بوده و می‌توانند با دادن الکترون به اکسیژن معمولی، انواع اکسیژن واکنش‌گر را درون سلول افزایش داده و به نوبه خود آسیب به پروتئین‌ها، غشاء، DNA و کاهش کلروفیل در نتیجه تجزیه اکسیداتیو کلروفیل را سبب شوند. افزایش فلاونوئیدها می‌تواند به عنوان یک آنتی‌اکسیدان در برطرف کردن انواع اکسیژن واکنش‌گر و به عنوان همبند شونده با عناصر سنگین در کاهش آسیب ناشی از عناصر سنگین کمک کنند. کاهش سنتز کلروفیل به نوبه خود منجر به توقف زنجیره انتقال الکترون شده و در نهایت اختلال در چرخه کالوین را به همراه دارد که سبب کاهش دهانه روزنه

### تغییرات میزان نیتروتوکسین در تنش روی و نیکل:

تنش‌های فیزیولوژیکی باعث افزایش غلظت گلیکوزیدهای سمی در گیاه می‌شود. این افزایش غلظت، می‌تواند به دلیل تنش آب یا کمبودهای تغذیه‌ای باشد. مرحله‌ی رشد گیاه، نوع بافت،

8. Michalak A. Phenolic compounds and their antioxidant activity in plants growing under heavy metal stress. *J. of Environ. Stud.* 2006; 15 (4): 523-530.
9. Diaz J, Bernal A, Pomar F, Merino F. Induction of shikimate dehydrogenase and peroxidase in pepper (*Capsicum annum* L.) seedlings in response to copper stress and its relation to lignification. *Plant Sci.* 2001; 161:179.
10. Sakihama Y, Yamasaki H. Lipid peroxidation induces by phenolics in conjunction with aluminium ions. *Biol. Plantarum.* 2002; 45: 249- 254.
11. Jung CH, Maeder V, Funk F, Frey B, et al. Release of phenols from *Lupinus albus* L. roots exposed to Cu and their possible role in Cu detoxification. *Plant Soil.* 2003; 252: 301.
12. Winkel-Shirley, B. . Biosynthesis of flavonoids and effects of stress. *Curr. Opin. Plant Biol.* 2002; 5: 218.
13. Noori M., Malayeri BE., Jafari M. Determination of fluoride  $\alpha$  its effects on flavonoids in some legumes. *Toxicol. Environ. Chem.* 2009; 91 (3): 409-418.
14. Einhelling FA. 1999. An Integrated view of allelochemicals amid multiple stresses. In: Inderpit, S., Dakshini, KMM., Foy, CL. Principles and practices in plant ecology. CRC Press, Boca Raton. pp. 479-494.
15. Noori M, Chehrehgany A, Hatami A. Nitrotoxins in three genera of Papilionoideae (Leguminosae) found in the central of Iran and potential health implications. *Toxicol. Environ. Chem.* 2007; 89(3): 479-485.
16. Noori M., Malayeri, BE., Jafari M. Fluoride pollutants as causative agent of nitrotoxins producing in some legume plants. *Toxicol., Environ. Chem.* 2010; 92 (1): 97-105.
17. Hoagland DR, Arnon DI. The water-culture method for growing plants without soil. *California Agricultural Experiment Station Circular.* 1950; 347: 1-32.
18. Widuri R., Welzen PV. A revision of the genus *Cephalomappa* (Euphorbiaceae) in Malesia, *Reinwardtia.* 1993; 11 (3): 153-184.
19. Markham KR. Techniques of Flavonoid Identification. Academic Press.: London.
20. Cooke AR. The toxic constituent in *Indigofera endecaphylla*. *Arch. Biochem. Biophys.* 1955; 55:114-120.

هوایی به علت کاهش نیاز به دی‌اکسیدکربن شده و به دلیل کاهش فتوسنتز و کاهش تولید مواد قندی منجر به کاهش رشد می‌شود. کاهش جذب آب می‌تواند منجر به کاهش فشار تورژسانس در سلول‌های نگهبان روزنه و بسته شدن روزنه‌های هوایی و پژمردگی گیاه شود. بنابراین به طور کلی به نظر می‌رسد که گیاه یونجه تاجی با تغییر در میزان فلاونوئیدها و همچنین تغییر در میزان نیتروتوکسین‌ها تا حدی در مقابل آسیب ناشی از تنش عناصر سنگین روی و نیکل مقاومت نماید.

### تشکر و قدردانی

نویسندگان مقاله از حوزه معاونت محترم پژوهشی و فناوری دانشگاه اراک برای حمایت مالی و اجرایی این تحقیق صمیمانه تشکر و قدردانی می‌نمایند.

### منابع

1. Nriego JO. Global inventory of natural and anthropogenic emissions of trace metals to the atmosphere. *Nature.* 1979; 279: 409-411.
2. Jiang LY, Yang XE, He ZL. Growth response and phytoextraction of copper at different levels in soils by *Elsholtzia splendens*. *Chemosphere.* 2004; 55:1179-1187.
3. Abdel Latif EA, Rabie H, Abo-shelbeya MAM, Nofal MA. The effect of nickel on plants. I. Effect of seed soaking in Ni- sulphate solutions on growth and chemical composition of Sorghum. *J. Agric. Res. Dev.* 1988; 10(1): 33-46.
4. Azmat R, Haider S, Riaz M. An inverse relation between  $Pb^{+2}$  and  $Ca^{2+}$  ions accumulation in *Phaseolus mungo* and *Lens culinaris* under Pb stress. *Pak. J. Bot.* 2009; 41(5): 2289-2295.
5. Azmat R, Haider S, Askari S. Phytotoxicity of Pb I: Effect of Pb on germination, growth, morphology and histomorphology of *Phaseolus mungo* and *Lens culinaris*. *Pakistan J. Biol. Sci.* 2006; 9: 979-984.
6. Haider H, Kanwal S, Uddin F, Azmat R. Phytotoxicity of Pb. II: Changes in chlorophyll absorption spectrum due to toxic metal Pb stress on *Phaseolus mungo* and *Lens culinaris*. *Pakistan J. Bio. Sci.* 2006; 9: 2062-2068.
7. Weryszko-Chmielewska E, Hwil M. Lead-induced histological and ultrastructural changes in the leaves of soybean (*Glycine max* (L.) Merr). *Soil Sci. and Plant Nutr.* 2005; 51: 203-212.

21. Williams MC., Parker R. Distribution of organic nitrites in Astragalus. *Weed Sci.* 1974; 22(3): 259–262.
22. Krupa ZA., Siedlecka W., Malsymiec K., Baszynski T. In vivo responses Of photosynthetic apparatus of *Phaseolus vulgaris* L. to nickel toxicity. *J. Plant Physiol.* 1993; 142: 664-668.
23. Sharma P., Dubey RS. Lead toxicity in plants. *Brazilian J. Plant Physiol.* 2005; 17: 35–52.
24. Dixon RA., Paiva NL. Stress-induced phenylpropanoid metabolism. *Plant Cell.* 1995; 7: 1085–1097.
25. Feucht W., Treutter D., Christ E. Role of flavanols in yellowing beech trees of Black Forest. *Tree Physiol.* 1997; 17: 335. Cited in Inderjit SKMM. Dakshini, and C.L. Foy. 1999. Principles and Practices in Plant Ecology. 328–329, Boca Raton: CRC Press. Pp. 313-329.
26. Robles C., Greff S., Pasqualini V., Garzino S., Bousquet-Melou A., Fernandez C., Korboulewsky N., Bonin G. Phenols and flavonoids in Aleppo pine needles as bioindicators of air pollution. *J. Environ. Quality.* 2003; 32: 2265–71.
27. Majak M. Review of toxic glycosides in rangeland and pasture forages. *J. Range Manage.* 2001; 54:494–498.
28. Cowgill UM. Variation in the nitrotoxin concentration of 13 species of *Astragalus* (Fabaceae) over a 6-year period. *Biol. Res.* 1991; 31: 111–118.

## The Effects of Heavy Metals on Leaf Anatomy, Some Flavonoids and Nitrotoxins of *Coronilla varia L.* in Hydroponic Culture

Amini F, Ph.D.<sup>1\*</sup>, Noori M, Ph.D.<sup>1</sup>, Foroghi M, M.Sc. Student<sup>2</sup>

1- Biology Department, Faculty of Sciences, Arak University, Arak 38156-8-8349, Iran

2- M.Sc Student of Plant Physiology

\* Email corresponding author: [F-Amini@araku.ac.ir](mailto:F-Amini@araku.ac.ir)

Received: 1 Feb. 2011

Accepted: 15 May. 2011

---

### Abstract

**Aim:** In this study, the effects of Ni and Zn to leaf anatomy, some flavonoids and nitrotoxin of *Coronilla varia* were investigated.

**Material and Methods:** 40 days aged grown *Coronilla varia L.* plants in equal growth condition were treated with different concentration of ZnCl<sub>2</sub> (0, 7.5, 15, 22.5 and 30 mM) and NiCl<sub>2</sub> (0, 2.5, 5, 7.5 and 10 mM) for 24 and 72 hours in hydroponic culture and the effects of imposing heavy metals on Leaf anatomy, some flavonoids of control and treated plants examined and compared using 2-DPC (Two Dimensional Paper Chromatography) and TLC (Thin Layer Chromatography) methods. Nitrotoxin measured using spectrophotometer too. All of Data compared together.

**Results:** Results showed anatomical changes in polluted plants responses to Zn and Ni. In general results showed a wide changes in leaf flavonoids profile with increases number of total flavonoids at Zn and Ni stress. However, Nitrotoxin increased significantly when Zn and Ni increased.

**Conclusion:** Probably, *C. varia L.* can tolerate against heavy metals stress of Zn and Ni with changes of flavonoids content and nitrotoxin.

**Key words:** Anatomy, *Coronilla varia L.*, Flavonoids, Nitrotoxins, Zn and NiCl<sub>2</sub>