پاسخ فیزیولوژیکی نهال‌های برگ نو(*Ligustrum vulgare*) تحت تنش سرب و کادمیم

لیلا حکیمی (نویسنده مسئول)[1*]، محمد متینی‌زاده[2] و اسماعیل خسروپور[3]

۱*- استادیار، گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، واحد ساوه، دانشگاه آزاد اسلامی، ساوه، ایران، hakimi_l@yahoo.com

۲- دانشیار، مؤسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع، سازمان تحقیقات آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران، matini@ritr.ac.ir

۳- دکتری، گروه اکولوژی جنگل، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تهران، کرج، ایران، es.Khosropur@gmail.com

تاریخ دریافت: مهر ۱۳۹۶ تاریخ پذیرش: آذر ۱۳۹۶

Physiological responses of *Ligustrum vulgare* under lead and cadmium-induced stress

Leila Hakimi[1*], Mohammad Matinizadeh[2] and Esmail Khosropour[3]

1*- Assistant Professor, Department of Horticulture, Agriculture college, Saveh Branch, Islamic Azad University, Saveh, Iran, hakimi_l@Yahoo.com

2- Associate Professor, Research Institute of Forest and Rangeland, Education and Extension Organization(AREEO), Tehran, Iran, matini@ritr.ac.ir

3- Ph.D, Department of Forest Ecology, Agriculture College, University of Tehran, Karaj, Iran, es.Khosropur@gmail.com

*Corresponding author: Leila Hakimi

Received: September 2017 Accepted: November 2017

چکیده

تحقیق حاضر به منظور بررسی پاسخ فیزیولوژیک نهال‌های برگ نو(*Ligustrum vulgare*) نسبت به تجمع سرب و کادمیم در برگ انجام گردید. به این منظور، ۱۰۰ اصله نهال انتخاب و کادمیم و سرب در مقادیر ۰، ۱۰۰، ۲۰۰، ۴۰۰ و ۶۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم خاک در قالب طرح کاملاً تصادفی اعمال شد. نتایج نشان داد که با افزایش مقدار کادمیوم، جذب آن نیز افزایش یافت و به جز تیمار ۱۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم در تمامی سطوح تنش میزان جذب در مقایسه با شاهد معنی‌دار بود، ولی تفاوت معنی‌داری برای سرب مشاهده نشد. همچنین با افزایش مقدار کادمیوم و سرب محتوای کلروفیل در مقایسه با شاهد تغییر نکرد ولی مقدار کاروتنوئید در تیمارهای مختلف کمتر از شاهد بود. مقدار فعالیت کاتالاز و پراکسیداز در تیمارهای مختلف سرب و کادمیم تفاوت معنی‌داری با شاهد نشان نداد در حالیکه مقادیر مختلف سرب و کادمیم تاثیر معنی‌داری روی فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز داشتند به طوریکه بیشترین فعالیت در تیمار سرب و کادمیم به ترتیب در غلظت‌های ۱۰۰ و ۶۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم مشاهده شد. تغییرات مشاهده‌شده در صفات فیزیولوژیک برگ نو از راهکارهای این گونه گیاهی جهت مقابله با مقدار تنش ناشی از تجمع سرب و کادمیم در برگهاست. از میان صفات بررسی‌شده، کاروتنوئید و آنزیم سوپراکسید دیسموتاز از صفات فیزیولوژیکی حساس به مقدار آلاینده هستند و بررسی این صفات در چنین مقداری از آلاینده، ما را در بررسی شرایط بحرانی یا عادی گیاه کمک می‌کند.

کلمات کلیدی: آنزیم‌های آنتی اکسیدان، برگ نو، سرب، کلروفیل.

Abstract

The aim of present study was to investigate physiological responses of *Ligustrum vulgare* to lead and cadmium accumulation in its leaves. For this purpose, 100 seedlings were treated by 0 (control), 100, 200, 400, and 600 mg of $CdCl_2$ and $Pb(NO_3)_2$ per kg of soil. The Pb and Cd accumulation in leaves, chlorophyll and carotenoid contents, and activity of CAT, SOD, and POD were measured. The results showed the Cd accumulation in leaves increased with increasing its concentration in soil, and there was found a significant difference between control and 200, 400 and 600 mg/kg. Increasing the Cd and Pb concentration did not affect chlorophyll content, while there was obtained a significant reduction by increasing these pollutants. There was not found a significant difference for CAT and POD in different concentrations of Pb and Cd, whereas SOD was affected by these pollutants so that the highest SOD activity was recorded in 100 and 600 mg/kg for Pb and Cd, respectively. The change in physiological properties of *Ligustrum vulgare* is its strategy to cope with stresses induced by Cd and Pb in leaves. Carotenoid and SOD are considered as sensitive traits to these concentrations of Pb and Cd, which they help the managers to make an appropriate decision in such conditions.

Keywords: Antioxidant enzymes, Chlorophyll, Lead, *Ligustrum vulgare*.

مقدمه و کلیات

امروزه یکی از چالش‌های مهم در زمینه محیط زیست، افزایش تدریجی یا تجمع فلزات سنگین به دلیل عدم تجزیه آنها توسط میکروارگانیسم‌هاست. این فلزات باتوجه به داشتن خواص و اثرات بالقوه بر انسان و سایر موجودات زنده حیات آنها را با خطرات جدی مواجه کرده است(Alloway, 2013). از طرفی دیگر، ورود و تخلیه پساب‌های صنعتی و کشاورزی همراه با دفن لجن و زباله و نیز کودهای شیمیایی در زمین‌های کشاورزی سبب تغییرات شگرفی بر کیفیت فیزیکی، شیمیایی، و بیولوژیکی خاک‌های این مناطق و به دنبال آن افزایش تجمع این فلزات در بافت‌های مختلف گیاهی و محصولات کشاورزی را به‌همراه دارد. در سال‌های اخیر تحقیقات گیاه‌پالایی، بر گیاهان بیش‌اندوز که توانایی انباشت مقادیر بالایی از فلزات را دارند متمرکز شده است(Ali *et al*, 2013). این گیاهان کندرشد بوده، سیستم ریشه‌ای کم‌عمق داشته و زیست‌توده کمی تولید می‌کنند. استفاده از بیش‌اندوزهای(Hyperaccumulator) علفی و یا گونه‌های چوبی منتخب که دارای ویژگی‌هایی چون مقاومت در برابر حضور فلزات، سرعت رشد بالا، سیستم ریشه‌ای عمیق و قدرت رشد در خاک‌های فقیر از موادغذایی باشند، گزینه مناسبی برای پاک-سازی خاک‌های آلوده به فلزات است(Pulford and Watson, 2003). فلزات سنگین به دو صورت باعث سمیت می‌شوند، بصورت غیر مستقیم از طریق رقابت با سایر عناصر غذایی ضروری و جایگزین شدن آنها در ساختمان رنگدانه‌ها یا آنزیم‌ها و تخریب عملکرد آنها، مستقیم با تخریب ساختار سلول. حضور فلزات سنگین باعث ایجاد تنش اکسیداتیو و افزایش تولید فرمهای مولکولی فعال اکسیژن(ROS)[1] می‌شوند. این گونه‌ها شامل رادیکال سوپر اکسید(O_2)، رادیکال هیدروکسیل(OH) وپراکسید هیدروژن(H_2O_2) هستند که در جریان فعالیت‌های انتقال الکترون به طور عمده در کلروپلاست و میتوکندری تولید و به نوبه خود باعث ایجاد اثرات سمی مختلف در گیاهان نظیر کاهش رشد، کاهش محتویات کلروفیل و فتوسنتز، مهار فعالیت‌های آنزیمی به‌خصوص آنزیم‌های مسیر بیوسنتز کلروفیل، آنزیم‌های چرخه کالوین و آنزیم روبیسکو آسیب به مولکول‌های زیستی نظیر لیپیدها، پروتئینها و نوکلئیک اسیدها به‌خصوص DNA، پراکسیداسیون غشای سلولی و آسیب به اندامک‌های مهم سلولی نظیر کلروپلاست‌ها و میتوکندری‌ها را به دنبال دارد(Vitoria *et al.*, 2001). سلول‌های گیاهی برای مقابله با آسیب‌های اکسیداتیو ناشی از ROS و حفظ سلول، دارای شبکه‌ای از مواد آنتی اکسیدان با جرم مولکولی پایین مانند آسکوربات، گلوتاتیون، پرولین، ترکیبات فنلی و کاروتنوئیدها و تعدادی آنزیم هضم‌کننده اکسیژن‌های واکنشگر مانند سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز و پراکسیداز هستند(Laspina *et al.*, 2005). آنزیم‌ها و متابولیت‌های آنتی‌اکسیدان یک سیستم با کارایی بالا ایجاد می‌کنند که ROS تولید شده را غیرفعال کرده و خسارت ناشی از آنها را کاهش می‌دهند. واکنش آنزیم‌ها و متابولیت‌های آنتی-اکسیدانی بستگی به شدت تنش اعمال شده، مدت زمان تنش، نوع گونه، سن و مرحله رشدی گیاه دارد(Mittler and Zilinskas, 1994). مطالعات مختلفی به پاسخ فیزیولوژیکی گیاه برای مقابله با تجمع آلاینده‌های محیط زیستی از جمله سرب و

۱- گروهی از رادیکال‌های آزاد هستند که براساس اتم مرکزی اکسیژن نامگذاری شده-اند و می‌توان به سوپراکسید و هیدروکسیل در این گروه اشاره کرد.

کادمیم در ریشه و اندام‌هوایی گیاهان اشاره کرده‌اند. برای مثال در برخی تحقیقات کاهش محتوای کلروفیلی(Doğanlar and Atmaca, 2013; Baruah *et al*., 2014) و در برخی دیگر هم افزایش فعالیت-های آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی (Woo *et al*., 2007; Uddin *et al*., 2015) اشاره کرده‌اند. برگ نو(*Ligustrum vulgare*) درختچه‌ای از تیره زیتون Oleaceaeاست که دارای شاخه‌های متعدد به وضع قائم، برگ‌های آن بیضوی نوک تیز یا نیزه‌ای ساده و فیلوتاکسی آن متقابل و حاشیه برگ آن گوه‌ای و پهنک فاقد کرک است ودر پای هر برگ یک جوانه دیده می شود(مظفریان، ۱۳۸۳). با توجه به اهمیت این گیاه در مناطق خشک و نیمه‌خشک و سطح قابل توجه این گیاه در پوشش فضای سبز شهری این مسئله مورد توجه قرار می‌گیرد که اطلاعات دقیق‌تر و با صحت بیشتری از توان گیاه‌پالایی و پاسخ‌های فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی آن جمع‌آوری گردد تا با دقت بیشتری مدیریت صورت گیرد. بنابراین مطالعه حاضر به منظور پاسخ فیزیولوژیک نهال‌های برگ نو(*Ligustrum vulgare*) به تنش سرب و کادمیم انجام شد.

فرآیند پژوهش

۱۰۰ نهال سه ساله(در مجموع ۲۰۰ نهال) در نهالستان البرز وابسته به موسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع واقع در کرج انتخاب شد. سعی بر آن بود تا ارتفاع، قطر و سیستم ریشه‌ای نهال‌های انتخاب شده یکسان باشد. خاک گلدان‌ها مخلوطی از خاک طبیعی با ماسه و کود حیوانی به نسبت ۱:۱:۳ بود. پنج نمونه خاک پیش از کاشت جهت تعیین بافت، pH، EC، N، P، K و غیره به آزمایشگاه ارسال شد(جدول ۱). سپس نهال‌های گیاه در گلدان‌ها کاشت شد و پس از یک ماه تیمارها اعمال گردید.

جدول ۱: خصوصیات فیزیکوشیمیایی خاک گلدان‌های برگ نو

Table1: Physicochemical Properties of Soil *Ligustrum vulgare* pots

ویژگی	مقدار(واحد)
pH	۷/۵
هدایت الکتریکی	۱/۲(میلی زیمنس/سانتی متر)
ظرفیت تبادل کاتیونی	۱۶/۵(میلی‌اکی‌والان/۱۰۰گرم)
بافت	لوم
مواد آلی	۱/۲(٪)
نیتروژن	۱۵(٪)
فسفر	۹/۸(میلی‌گرم/کیلوگرم)
پتاسیم	۳۴۰(میلی‌گرم/کیلوگرم)

اعمال تیمارهای سرب و کادمیم: نهال‌ها با نمک‌های کلرید کادمیوم($CdCl_2$)، نیترات سرب($Pb(NO_3)_2$) در ۰، ۱۰۰، ۲۰۰، ۴۰۰ و ۶۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم خاک تیمار شدند. پس از اعمال آلودگی عملیات داشت و مراقبت از نهال‌ها تا آغاز فصل خزان ادامه داشت. سپس در اواسط تیرماه از برگ‌های هر نهال در چهار جهت تاج نمونه‌برداری به‌عمل آمد.

سرب و کادمیم برگ: روش هضم با دستگاه igesdahl(مدل Hach، کشور کانادا) انجام شد و مقدار سرب و کادمیم با دستگاه ICP(Agilent4500 Series، آمریکا) اندازه‌گیری شد. برای این منظور،۴ میلی‌لیتر اسید سولفوریک به ۰/۲۵ گرم از نمونه‌های برگی خشک‌شده اضافه شد. نمونه‌ها ۵ دقیقه درون دستگاه Digesdahl در دمای ۴۴۰ درجه سانتی‌گراد حفظ شدند و سپس ۱۳ میلی‌لیتر آب اکسیژنه از قسمت بالای دستگاه به آن اضافه شد. پس از مصرف کامل آب اکسیژنه از قسمت بالای دستگاه به‌ترتیب متعلقات آن بیرون آورده شد و در نهایت بشر حاوی نمونه را از دستگاه igesdahl خارج گردید. پس از سرد شدن عصارهٔ بدست آمده، با استفاده از آب مقطر دوبار تقطیر، به حجم ۱۰۰ میلی‌لیتر رسید و در نهایت عصاره از کاغذ صافی عبور داده شد. محلول به‌دست-آمده برای سنجش مقدار سرب و کادمیم با دستگاه

ICP استفاده شد.

کلروفیل: اندازه گیری میزان محتوای کلروفیل بر مبنای روش(1949) Arnon انجام شد. برای این منظور قطعاتی از برگ‌های جوان هم سن انتخاب و پس از تکه تکه شدن با کمک استون ۸۰٪ در داخل هاون چینی به صورت یکنواخت در آمدند. عصاره تهیه شده با کاغذ صافی و اتمن شماره ۲ صاف گردید. هاون، قیف و باقیمانده مواد گیاهی روی کاغذ صافی دوباره با استون ۸۰٪ شسته شد و حجم نهایی صاف‌شده یادداشت گردید. از دستگاه اسپکتروفتومتر برای اندازه‌گیری میزان تجمع نمونه‌ها استفاده شد. ابتدا دستگاه با استون ۸۰ درصد صفر شده و سپس میزان تجمع عصاره استخراج شده در طول موج‌های ۶۴۵ نانومتر، ۶۶۳ نانومتر ، ۴۸۰ نانومتر و ۵۱۰ نانومتر قرائت شد. سپس با استفاده از روابط زیر میزان کلروفیل a، کلروفیل b، کلروفیل کل و کارتنوئید محاسبه گردید:

$= [(12.7\times A_{663})- (2.69\times A_{645})]\times V / 1000\times W$

میلی گرم کلروفیل a در هر گرم برگ تر

$= [(22.9\times A_{645})- (4.69\times A_{663})]\times V / 1000\times W$

میلی گرم کلروفیل b در هر گرم برگ تر

$= [(20.2\times A_{645}) + (8.02\times A_{663})]\times V / 1000\times W$

میلی‌گرم کلروفیل کل در هر گرم برگ تر

$=7.6\times(A_{480})- 14.9 \times (A_{510}) \times V/1000\times W$ میلی گرم کارتنوئید در هر گرم برگ تر

در روابط بالا A میزان تجمع در طول موج مورد نظر، V حجم نهایی استون ۸۰ درصد بر حسب میلی‌لیتر و W اندازه برگ تازه برحسب گرم می‌باشد.

ارزیابی‌های آنزیمی: نمونه‌های برگ با نیتروژن مایع پودر شدند. سپس ۰/۵ گرم از نمونه‌ها جدا شده و در تیوب‌های ۲ میلی‌لیتر با محلول عصاره‌گیری بافر فسافات به حجم رسانده شد. سپس عصاره به‌دست آمده سانتریفوژ(۱۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد با ۳۰۰۰ دور) شد. محلول رویی به تیوب‌های ۱/۵میلی لیتری انتقال و به یخچال منتقل شدند(Velikova *et al*., 2000).

آنزیم کاتالاز: فعالیت آنزیم کاتالاز با استفاده از روش(1998)Eising and Gerhardt اندازه‌گیری شد. برای این منظور از ۱۰۰ میلی‌لیتر بافر فسفات ۰/۱ میلی‌مولار و ۲۰۰ میکرولیتر پراکسید هیدروژن ۳ درصد برای تهیه بافر نهایی کار استفاده شد. سپس ۲ میلی‌لیتر بافر نهایی در کووت ریخته شده و به آن ۱۰ میکرولیتر عصاره اضافه شد. در نهایت تجمع هر نمونه پس از ۱ دقیقه قرائت در دستگاه اسپکتروفوتومتر در طول موج ۲۴۰ نانومتر و براساس واحدUnit/mg FW محاسبه و گزارش گردید.

آنزیم پراکسیداز: فعالیت آنزیم پراکسیداز مطابق روش(1955) Chance and maehly اندازه‌گیری شد. برای این منظور از بافر فسفات(pH=7.5) ۰/۱ میلی مولار، محلول پیروگالول ۴ میلی مولار، پراکسید هیدروژن ۳ میلی مولار و ۱۰۰ میکرولیتر عصاره استفاده شد. طول موج دستگاه روی ۴۲۰ نانومتر تنظیم و طول موج‌ها هر ۲۰ ثانیه به مدت ۲ دقیقه اندازه‌گیری گردید و بیش‌ترین میزان اختلاف یعنی تفاوت اولین طول موجی که رو به کاهش گذاشت و قبل از آن را وارد فرمول کمیت سنجی کرده و با واحد فعالیت بر میلی‌گرم وزن تر گزارش گردید.

سوپر اکسید دیسموتاز: فعالیت آنزیمی‌سوپر اکسید دیسموتاز طبق روش Giannopolitis and Ries(1977) بر اساس واحد آنزیمی بر میلی‌گرم پروتئین برای تمام نمونه‌ها محاسبه گردید. فعالیت این آنزیم به صورت فوتومتریک بررسی می‌شود. بافر اصلی واکنش شامل بافر فسفات(pH=۷/۸) ۵۰

میلی‌مولار، متیونین ۱۳ میلی‌مولار، نیتروبلو تترازولیوم(NBT) ۷۵ میکرومولار، EDTA ۰/۱ میلی مولار و ریبوفلاوین ۱۳ میکرومولار بود. از بافر اصلی به هر چاهک به میزان ۲۹۰ میکرولیتر اضافه شد. دستگاه روی طول موج ۵۶۰ نانومتر کالیبره شد. برای سنجش هر نمونه ۵۰ میکرولیتر از عصاره پروتئینی استفاده شد.

تجزیه و تحلیل آماری: تحقیق حاضر در قالب طرح کاملا تصادفی انجام شد. مقایسه میانگین داده‌ها با آزمون دانکن در نرم افزار SAS انجام گرفت.

نتایج و بحث

نتایج تحقیق نشان داد که با افزایش کادمیوم، جذب آن نیز افزایش یافت و به غیر از تیمار ۱۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم در تمامی سطوح تنش میزان جذب در مقایسه با شاهد معنی‌دار بود، ولی تفاوت معنی‌داری برای سرب مشاهده نشد(جدول ۲). دامنه جذب کادمیوم در برگ گیاه ۳/۹۶-۱۱/۵۳ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن خشک بود. بیشترین میزان جذب در تیمار ۶۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم مشاهده شد(۱۱/۵۳ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن خشک) ولی تفاوت معنی‌داری برای جذب سرب در برگ با افزایش مقدار آن در خاک مشاهده نشد. به طور کلی می‌توان بیان کرد افزایش جذب کادمیوم توسط گیاه با بیشتر شدن مقدار آلاینده می‌تواند نشان از توانایی گیاهان در جذب بیشتر این آلاینده باشد و این توانایی برای جذب سرب وجود ندارد. رفعتی و همکاران(۱۳۹۱)؛ Robinson *et al.* (2000); McGee *et al.* (2006) افزایش جذب سرب را گزارش کردند. Hattab *et al.* (2009) نیز افزایش جذب کادمیوم در برگ را گزارش کردند که با نتایج بدست آمده حاصل از این تحقیق مطابقت دارد.

جدول ۲: مقدار کادمیوم و سرب در برگ سبز در مقادیر مختلف آلاینده

Table 2: The amount of $CdCl_2$ and $Pb(NO_3)_2$ in green leaves in different pollutants

غلظت آلاینده	آلاینده	
(میلی‌گرم در کیلوگرم)	سرب	کادمیم
شاهد	۵۹/۴ a	۴/۱ a
۱۰۰	۵۸/۸ a	۴/۹ a
۲۰۰	۶۱/۳ a	۷/۵ b
۴۰۰	۶۳/۶ a	۱۰/۶ c
۶۰۰	۶۵/۲ a	۱۱/۲ c

میانگین‌های دارای حروف مشابه بر اساس آزمون دانکن در سطح ۵٪ تفاوت معنی‌داری ندارند.

Averages with the same letters According to the Duncan test, 5% difference was not significant

اندازه‌گیری کلروفیل و کاروتنوئید: نتایج حاصل از این آزمایش نشان داد که با افزایش کادمیوم و سرب محتوای کلروفیل a، کلروفیل b و کلروفیل کل در مقایسه با شاهد تغییر نکرد ولی مقدار کاروتنوئید در تیمارهای مختلف کمتر از شاهد بود(جدول ۳ و شکل‌های ۱ و۲). بیشترین میزان کاروتنوئید در تنش کادمیوم در شاهد مشاهده گردید و کمترین میزان آن نیز در تیمار ۱۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم خاک بدست آمد. با افزایش شدت تنش میزان کاروتنوئید نیز افزایش یافت به طوریکه در بین سطوح تنش بیشترین میزان کاروتنوئید مربوط به تیمار ۴۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم بود. با این حال تمامی سطوح تنش از میزان کاروتنوئید کمتری نسبت به شاهد برخوردار بودند و می‌توان گفت کادمیوم موجب کاهش محتوای کاروتنوئید گیاه شده است. از طرف دیگر، میزان محتوای کاروتنوئید در تنش سرب نیز نسبت به شاهد کمتر و معنی‌دار بود اما گیاه در تمامی سطوح تنش از میزان کاروتنوئید تقریباً برابری برخوردار بود و اختلافات جزئی در میزان این رنگیزه معنی‌دار نبود. اگرچه کادمیوم به عنوان فلزی بسیار سمی برای بیشتر گیاهان(Ouzounidou *et al.*, 1997) و سرب در مقایسه با آن با سمیت کمتر(Mohan and Hosetti, 1997) معرفی شده است اما نتایج در مورد کلروفیل

خلاف این ادعا را ثابت می‌کند. این گیاه با حفظ محتوای کلروفیل در برابر مقادیر مختلف کادمیوم، توان خود را برای مقابله با این فلز نشان داد. در نهایت این امر موجب دوام فتوسنتز و بقای گیاه در محیط آلوده خواهد شد. محققان کاهش کلروفیل و افزایش کاروتنوئید را در گونه‌های مختلف گیاهی تحت تاثیر فلزات سنگین گزارش کرده‌اند(Sinha and Shrivastava, 2012; Karimi *et al*., 2013 ;Ghorbanli and kiapour, 2012). در این تحقیق کادمیوم و سرب تاثیر تقریباً برابری بر میزان کلروفیل داشتند و موجب کاهش آن شدند. کاهش کلروفیل a و b را Sinha and Shrivastava(2012) در گیاه *Brassica juncea* در اثر تنش سرب گزارش کردند. آنها اظهار داشتند که کاهش محتوای کلروفیل در ارتباط با تنش فلزات سنگین ممکن است نتیجه جلوگیری از فعالیت آنزیم‌های بیوسنتز کننده کلروفیل باشد. سرب نیز با کاهش بیوسنتز کلروفیل از طریق کاهش غلظت عناصر ضروری منیزیوم(Mn) و آهن(Fe) در برگ‌ها، ایجاد کمپلکس با پروتئین‌های فتوسنتزی و افزایش فعالیت کلروفیلاز جهت تجزیه کلروفیل موجب کاهش فتوسنتز گیاه می‌شود(Sharma and Dubey, 2005). کاروتنوئید رنگدانه آنتی اکسیدان غیر آنزیمی می‌باشد که از کلروفیل، غشاء و ترکیب ژنتیکی سلول در برابر ROS تحت تنش فلزات سنگین محافظت می‌کند(Hou *et al*., 2007). مطالعات قبلی گواه بر آن است که کاهش در محتوای کاروتنوئید پاسخی معمول به سمیت فلز می‌باشد(Rout *et al*., 2001) اما افزایش آن به علت نقش مهم این رنگدانه در سمیت‌زدایی ROS می‌باشد(Tewari *et al*., 2002; Chandra *et al*., 2009).

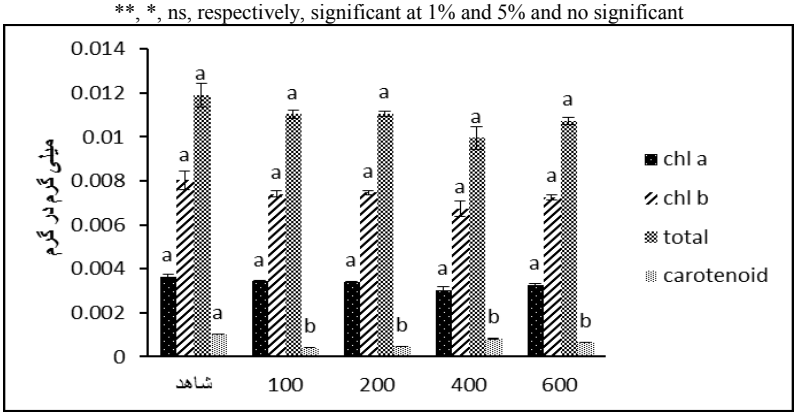
جدول ۳: تجزیه واریانس محتوای کلروفیل و کاروتنوئید برگ‌های گونه برگ نو تحت تنش سرب و کادمیم

Table 3: Analysis of variance of chlorophyll content and carotenoids in leaves of *Ligustrum vulgare* under the stress of $CdCl_2$ and $Pb(NO_3)_2$

منابع تغییر	درجه آزادی	میانگین مربعات						
		کادمیم		سرب				
		کلروفیل a	کلروفیل b	کلروفیل کل	کاروتنوئید	کلروفیل a	کلروفیل b	کلروفیل کل	کاروتنوئید
تنش	۴	$۱/۴۶\times۱۰^{-vns}$	$۶/۵\times۱۰^{-vns}$	$۱۴/۷\times۱۰^{-vns}$	$۱/۹۹\times۱۰^{-v**}$	$۱/۳۶\times۱۰^{-v ns}$	$۸/۲\times۱۰^{-vns}$	$۱۶/۸\times۱۰^{-vns}$	$۴/۰۷\times۱۰^{-۸ ns}$
خطا	۱۰	$۱/۰۹\times۱۰^{-v}$	$۸/۴\times۱۰^{-v}$	$۱۵/۷\times۱۰^{-v}$	$۱/۱۲\times۱۰^{-۹}$	$۹/۳۴\times۱۰^{-۸}$	۹×۱۰^{-v}	$۱۶/۱\times۱۰^{-v}$	$۱/۲۷\times۱۰^{-۸}$
CV%		۹/۸۵	۱۲/۴۵	۱۱/۴۷	۴/۹۵	۹/۳۰	۱۳/۱۳	۱۱/۸۳	۱۳/۵۶

**، *، ns به ترتیب، معنی‌دار در سطح احتمال ۱ و ۵ درصد و غیرمعنی‌دار

**, *, ns, respectively, significant at 1% and 5% and no significant

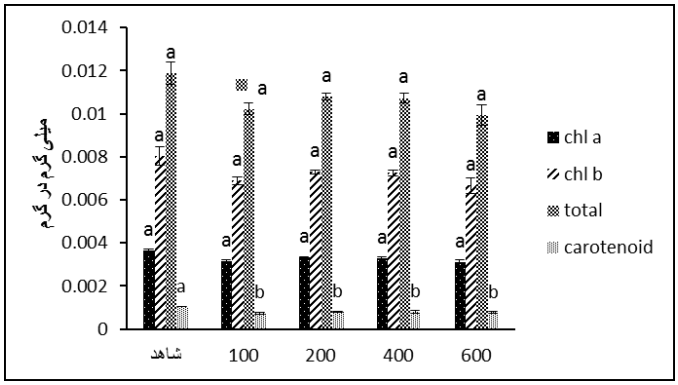


شکل ۱: اثر کادمیوم بر محتوای کلروفیل و کاروتنوئید در مقادیر مختلف آلاینده

Fig 1: The effect of $CdCl_2$ on the content of chlorophyll and carotenoids on different pollutants

میانگین‌های دارای حروف مشابه بر اساس آزمون دانکن در سطح ۵٪ تفاوت معنی‌داری ندارند.

Averages with the same letters According to the Duncan test, 5% difference was not significant



شکل ۲: اثر سرب به تفکیک بر محتوای کاروتنوئید در مقادیر مختلف آلاینده

Fig 2: The effect of $Pb(NO_3)_2$ is distinguished by the content of carotenoids in different pollutants

میانگین‌های دارای حروف مشابه بر اساس آزمون دانکن در سطح ۵٪ تفاوت معنی‌داری ندارند.

Averages with the same letters According to the Duncan test, 5% difference was not significant

آنزیم کاتالاز: مقدار کاتالاز در تیمارهای مختلف سرب و کادمیم تفاوت معنی‌داری با شاهد نشان نداد(جدول ۴ و شکل ۳). آنزیم کاتالاز تجزیه پراکسید هیدروژن به اکسیژن و آب را کاتالیز می‌کند(Jiang and Hung, 2001; Nazari *et al*., 2012). در مطالعه گیاهان تحت تنش زیر واحدهای کاتالاز در سیتوپلاسم یافت شده‌اند، در حالیکه سنتز آنزیم در پراکسی‌زوم کامل می‌شود. بیان ایزوآنزیم‌های(ایزوزایم‌ها) ویژه‌ای از کاتالازها جهت مقابله با تنش اکسیداتیو ناشی از تنش‌های محیطی، مهم و ضروری است و در این صورت باید انتظار داشت فعالیت کاتالاز طی تنش افزایش یابد تا ساختار دفاعی را در گیاه حفظ کند. تنش کادمیوم و سرب سبب تجمع پراکسید هیدروژن می‌شود که گیاهان جهت جلوگیری از تجمع بیشتر و ایجاد غلظت بالای پراکسید هیدروژن و سایر گونه‌های فعال اکسیژن در سلول‌های گیاه، فعالیت ایزوآنزیم‌های کاتالاز۱ و کاتالاز۲ را افزایش می‌دهند. همانگونه که در شکل ۳ مشاهده می‌شود غلظت‌های مختلف کادمیوم تاثیر معنی‌داری بر فعالیت کاتالاز نداشت. هرچند فعالیت آنزیم با بیشتر شدن شدت تنش کادمیوم تا سطح ۲۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم روند افزایش و در سایر سطوح تنش روند کاهشی داشت اما این تغییرات معنی‌دار نبود. در تنش سرب نیز با بیشتر شدن شدت تنش فعالیت آنزیم نیز افزایش یافت، به طوریکه بیشترین فعالیت در سطح تنش ۶۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم مشاهده شد، اما این تغییرات فعالیت آنزیم نیز در مقایسه با شاهد معنی‌دار نبود. گونه‌های فعال اکسیژن که در شرایط ناشی از فلزات سنگین بوجود می‌آیند با حمله به آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان و آسیب‌های اکسیداتیو باعث مهار این آنزیم‌ها می‌شوند(Galleco *et al*., 1996) و با کاهش فعالیت آنزیم کاتالاز، تجمع H_2O_2 افزایش می‌یابد که این فرایند نیز باعث مهار آنزیم‌های کاتالاز و پراکسیداز می‌گردد(Del Rio *et al*., 2005). کاهش فعالیت کاتالاز در تنش کادمیوم می‌تواند به همین دلیل باشد که نتیجه آن کاهش توانایی گیاه برای مقابله با ROS در سطوح بالای تنش می‌باشد. کاهش فعالیت کاتالاز همراه با افزایش کادمیوم در برخی گیاهان به علت کاهش در میزان پروتئین‌های گیاه در اثر سمیت این فلز و تنش اکسیداتیو گزارش شده است(Vajpaee *et al*., 2000). همچنین کاتالاز در اثر پروتئازهای موجود در پراکسی‌زوم‌ها نیز می‌تواند کاهش یابد(Distefano *et al*., 1999).(Qin *et al*. (2015) افزایش فعالیت

کاتالاز در پاسخ به غلظت‌های بالای عناصر سنگین را گزارش کردند که این افزایش می‌تواند نشان از آمادگی گیاه در مقابل شرایط ناسازگار می‌باشد. گزارشات قبلی حاکی از آن است که کاتالاز اولین آنزیمی است که در حذف H_2O_2 نقش ایفا می‌کند و گیاهانی که فعالیت بیشتر کاتالاز دارند معمولاً تحمل بیشتری در برابر تنش‌ها از خود نشان می‌دهند(Bettaieb *et al*., 2007).

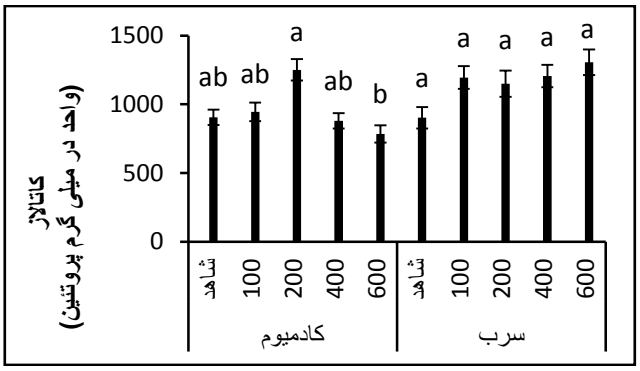
جدول ۴: تجزیه واریانس آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان برگ‌های گونه برگ نو تحت تنش سرب و کادمیم

Table 4: Analysis of variance of antioxidant enzymes in leaves of *Ligustrum vulgare* under the stress of $CdCl_2$ and $Pb(NO_3)_2$

منابع تغییر	درجه آزادی	میانگین مربعات					
		کادمیوم			سرب		
		CAT	SOD	POD	CAT	SOD	POD
تنش	۴	۱۴۵۲۱۱/۹۳^{ns}	۵/۳۶**	۲۳۹/۲۴^{ns}	۲۴۳۵۴۸/۱۵^{ns}	۲/۸۱*	۱۸۴/۱۱^{ns}
خطا	۱۰	۷۵۶۸۶/۱۶	۰/۶۱	۱۰۱/۴۹	۱۴۹۴۷۶/۹۹	۰/۶۸	۱۱۷/۴۷
CV%		۲۷/۷۳	۳۴/۵۸	۲۸/۹۶	۳۰/۶	۴۱/۲۳	۲۸/۴۸

**، *، ns به ترتیب، معنی‌دار در سطح احتمال ۱ و ۵ درصد و غیرمعنی‌دار

**, *, ns, respectively, significant at 1% and 5% and no significant



شکل ۳: اثر کادمیوم و سرب به تفکیک بر فعالیت آنزیم کاتالاز در مقادیر مختلف آلاینده

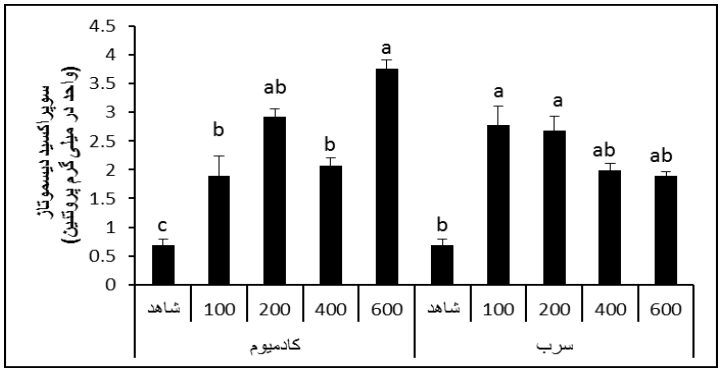
Fig 3: $CdCl_2$ and $Pb(NO_3)_2$ effects differentiated by activity of catalase enzyme on different pollutants

میانگین‌های دارای حروف مشابه بر اساس آزمون دانکن در سطح ۵٪ تفاوت معنی‌داری ندارند.

Averages with the same letters According to the Duncan test, 5% difference was not significant

آنزیم سوپراکسید دیسموتاز: مقادیر مختلف سرب و کادمیم تاثیر معنی‌داری روی فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز داشتند به طوریکه بیشترین فعالیت در تیمار سرب و کادمیم به ترتیب در غلظت‌های ۱۰۰ و ۶۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم مشاهده شد(شکل ۴). آنزیم سوپراکسید دیسموتاز در همه سلول‌های متابولیزم کننده اکسیژن وجود دارد. ایزوزایم‌های SOD در سیتوپلاسم، میتوکندری و کلروپلاست یافت شده‌اند و رادیکال‌های سوپراکسید را به پراکسید هیدروژن تبدیل می‌کند(Alscher *et al*., 2002). میزان فعالیت آنزیم SOD در پاسخ به تنش کادمیوم و سرب در شکل ۴ نشان داده شده است؛ همانگونه که مشاهده می‌شود با اعمال تنش کادمیوم فعالیت SOD در همه سطوح تنش در مقایسه با شاهد بیشتر و معنی‌دار بود. بیشترین فعالیت آنزیم نیز در تیمار ۶۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم کادمیوم مشاهده شد. در تنش سرب نیز در تمامی غلظت‌ها فعالیت آنزیم در مقایسه با شاهد بیشتر و معنی دار بود. با افزایش شدت تنش فعالیت آنزیم نیز افزایش یافت به طوریکه بیشترین فعالیت در تیمار ۱۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم بدست آمد. با بیشتر شدن شدت تنش از میزان فعالیت آنزیم کاسته شد اما این کاهش معنی دار نبود. با این وجود در بین سطوح تنش کمترین میزان فعالیت آنزیم در ۶۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم مشاهده شد. Gratao *et al.* (2005) نشان دادند که آنزیم سوپراکسید دیسموتاز به عنوان اولین خط دفاعی سیستم آنتی‌اکسیدانی در مقابل گونه‌های

فعال اکسیژن فعال می‌شود و باعث تبدیل رادیکال – O2 به پراکسید هیدروژن می‌شود، در ادامه پراکسید هیدروژن ایجاد شده به مولکول آب و اکسیژن تجزیه شده که این عمل توسط آنزیم کاتالاز انجام می‌شود. علاوه بر رادیکال سوپر اکسید سایر گونه‌های فعال اکسیژن به مولکول‌های زیستی از قبیل نوکلوئیک اسید، پروتئین و اسیدهای آمینه حمله کرده و منجر به اختلالات متابولیکی جبران ناپذیر و مرگ سلول می‌شود. از این رو القای آنزیم‌های آنتی اکسیدان از قبیل SOD باعث کاهش آسیب‌های اکسیداتیو در محیط‌های آلوده شده(Zhang *et al*., 2007) و توان گیاه را برای پالایش و حذف اثر سمی فلزات سنگین بالا می‌برد. همچنین بالا بودن فعالیت آنزیم SOD در گیاه به دلیل پراکسیداسیون لیپیدی نیز می‌باشد که در نتیجه تنش ایجاد شده بوسیله کادمیوم و سرب بوجود آمده است(Morsy *et al*., 2012). نتایج مشابهی در گیاهان مختلف مبنی بر کاهش اثرات تنش اکسیداتیو ناشی از فلزات سنگین بوسیله افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدان گزارش شده است(Ciemense, 2001; Candan and Tarhan, 2003; Zembala *et al*., 2010). در برخی موارد با افزایش شدت تنش از میزان فعالیت آنزیم کاسته می‌شود. دلیل احتمالی کاهش فعالیت SOD در سطوح بالای تنش ممکن است با غیر فعال شدن آنزیم از طریق تجزیه آنزیم(Filek *et al*., 2008) و یا اتصال غیر اختصاصی فلزات سنگین به مرکز فعالیت آنزیم مرتبط باشد(Stroinski and Kozlowska, 1997). همانگونه که در شکل ۴ ملاحظه می‌گردد به طور کلی فعالیت SOD در هر دو تنش سرب و کادمیوم بالا می‌باشد. دلیل این امر می‌تواند بالا بودن فعالیت آنزیم در ساقه و یا ریشه باشد زیرا در صورتیکه گیاه بتواند کادمیوم و سرب را در ریشه و ساقه خود نگه دارد گیاه برای مقابله با آن فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدان خود را در ساقه و ریشه نسبت به برگ افزایش خواهد داد. Groppa *et al*(2001) نیز افزایش فعالیت آنزیم‌های SOD و کاتالاز را در ساقه و ریشه گزارش کردند.



شکل ۴: اثر کادمیوم و سرب به تفکیک بر فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز در مقادیر مختلف آلاینده

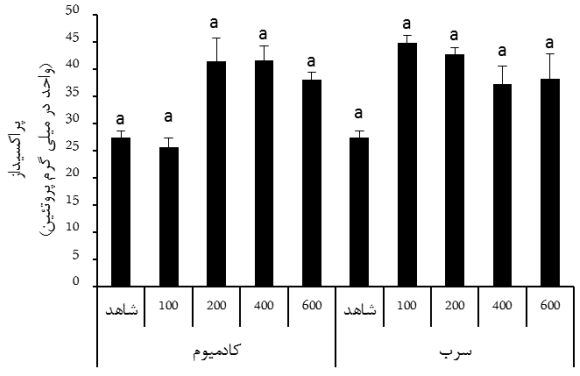
Fig 4: $CdCl_2$ and $Pb(NO_3)_2$ effects differentiated by activity of catalase enzyme on different pollutants

میانگین‌های دارای حروف مشابه بر اساس آزمون دانکن در سطح ۵٪ تفاوت معنی‌داری ندارند.

Averages with the same letters According to the Duncan test, 5% difference was not significant

آنزیم پراکسیداز: مقدار فعالیت پراکسیداز در تیمارهای مختلف سرب و کادمیم تفاوت معنی‌داری با شاهد نشان نداد(شکل ۵). بین سطوح مختلف تنش کادمیوم اختلاف معنی‌دار در فعالیت POD مشاهده نشد هرچند فعالیت این آنزیم در سطح تنش ۱۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم کمتر از شاهد بود. در تنش سرب نیز فعالیت آنزیم در سطوح مختلف تنش بیشتر از شاهد بود اما بین مقادیر مختلف سرب و شاهد تفاوت معنی‌دار نبود. POD از جمله آنزیم‌هایی به

شمار می‌رود که نقش بسیار مهمی در پاسخ گیاه به تنش غیر زیستی مانند فلزات سنگین دارد و تحت تنش فعال می‌شود(Shalini and Duey, 2003). POD در سم زدایی H_2O_2، حذف مالون دی آلدهید و حفظ ثبات و پایداری دیواره سلولی نقش دارد(Hojati *et al*., 2011). آنزیم پراکسید موجب شکسته شدن هیدروژن پراکسید در سلول می‌شود و بدین شکل از تولید ROS جلوگیری می‌کند و بنابراین با بالا رفتن سطوح فعالیت این آنزیم، گیاه کمتر مورد تهاجم ROS قرار می‌گیرد. این گروه از آنزیم‌ها در سیتوسول، واکوئل، کلروپلاست و آپوپلاست وجود دارند(رمضانی‌ویشکی، ۱۳۹۳). نحوه پاسخ آنزیم‌های آنتی اکسیدان به فلزات سنگین متفاوت بوده و می‌تواند از گونه‌ای به گونه دیگر و از بافتی به بافت دیگر بسیار متنوع باشد (Mazhoudi *et al*., 1997). ROS تولید شده در شرایط تنش به آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان هم حمله کرده و باعث مهار آنها می‌شود(Galleco *et al*., 1996). در اثر کاهش فعالیت CAT تجمع H_2O_2 نیز افزایش می‌یابد که یکی از پیامدهای آن مهار POD می‌باشد(Del rio *et al*., 2003). بسیاری از تحقیقات افزایش فعالیت POD را وابسته به افزایش غلظت فلزات سنگین گزارش کرده‌اند(Shu *et al*., 2011; Hayat *et al*., 2013). از طرف دیگر محدود شدن فعالیت POD و کاهش آن در معرض فلزات سنگین گزارش شده است(Palma *et al*., 1987; Luna *et al*., 1994; Qin *et al*., 2014). توانایی گیاهان جهت افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدان برای مقابله با اثرهای تنش محدود به نظر می‌رسد. در مطالعاتی نشان داده شده که غلظت‌های افزایش یافته فلزات سنگین در نهایت به کاهش همه آنزیم‌های آنتی اکسیدان منجر می‌شود(Schutzendubel and Polle, 2002). در نتیجه فعالیت آنزیم‌ها در غلظت کم فلزات زیاد و با افزایش غلظت فلزات، بعد از گذشت از حد آستانه(با توجه به نوع گیاه)، به تدریج رو به کاهش می‌گذارد. هم چنین تاثیر طولانی مدت فلزات سنگین ابتدا سبب القاء و افزایش فعالیت آنزیم ها به خصوص POD شده و بعد از آن باعث کاهش فعالیت می‌گردد (Qadir *et al*., 2004).



شکل ۵- اثر کادمیوم و سرب به تفکیک بر فعالیت آنزیم پراکسیداز در مقادیر مختلف آلاینده

Fig 5: $CdCl_2$ and $Pb(NO_3)_2$ effects differentiated by activity of peroxidase enzyme on different pollutants

میانگین‌های دارای حروف مشابه بر اساس آزمون دانکن در سطح ۵٪ تفاوت معنی‌داری ندارند.

Averages with the same letters According to the Duncan test, 5% difference was not significant

نتیجه‌گیری کلی

به طور کلی تنش‌های غیر زنده از جمله تنش فلزات سنگین در گیاهان تجمع انواع گونه‌های فعال اکسیژن را القا می‌کنند که در غلظت‌های بالا برای سلول

زیان‌آور هستند. گونه های فعال اکسیژن حاصل از تنش اکسیداتیو در قسمت‌های مختلف سلول تولید شده و سبب خسارت به مولکول‌های بزرگ حیاتی در سلول می‌شوند. گیاهان برای مقابله با خسارت‌های ناشی از تنش اکسیداتیو و کاهش غلظت گونه‌های فعال اکسیژن مکانیسم‌های دفاعی مختلفی دارند که شناخته شده ترین آنها مکانیسم‌های آنزیمی و غیر آنزیمی می‌باشند. سیستم آنتی‌اکسیدانی یک جزء مهم مکانیسم‌های حفاظتی در برابر تنش‌های غیر زنده است که خسارت ناشی از گونه‌های فعال اکسیژن را کاهش می‌دهد. از جمله مکانیسم دفاعی آنزیمی می‌توان به آنزیم‌های سم‌زدای کاتالاز، سوپر اکسید دیسموتاز و پراکسیداز و غیره اشاره کرد. در تنش فلزات سنگین نیز با جذب و تجمع این فلزات در گیاهان، سیستم دفاعی گیاه فعال شده و رادیکال‌های آزاد زیادی تولید می‌شود اما ممکن است در اثر افزایش بیش از حد میزان رادیکال‌های آزاد، مکان‌ها جذب و اتصال این رادیکال‌های آزاد توسط آنتی اکسیدان‌ها اشباع شود. بنابراین پاسخ علیه تنش‌های مختلف در سطوح مختلف آن تنش، در یک گونه حائز اهمیت است تا از این طریق واکنش گیاه بررسی شود و امکان بهبود شرایط مقاومت و مقابله با شرایط تنش پیش بینی شود. در مطالعه حاضر کلروفیل برگ نو نسبت به مقدار سرب و کادمیم حساسیتی نشان نداد ولی مقدار کاروتنوئید شاهد با تیمارهای اعمال‌شده متفاوت بود. همچنین تغییرات معنی‌داری بین شاهد با تیمارهای دیگر سرب و کادمیم برای آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز مشاهده شد. در نتیجه می‌توان بیان کرد که محتوای کلروفیلی و آنزیم‌های کاتالاز و پراکسیداز نسبت به مقدار تا ۶۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم واکنش نشان نمی‌دهند ولی مقدار کاروتنوئید و آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز تحت تاثیر قرار می‌گیرند و به عنوان صفات حساس در برگ نو معرفی می‌گردند.

منابع

۱. رفعتی، م.، خراسانی، ن.، مراقبی، ف.، و شیروانی، ا. ۱۳۹۱. توانایی گونه‌های توت سفید(*Morus alba*) و سپیدار(*Populus alba*) در تثبیت و برداشت فلزات سنگین. نشریه محیط زیست طبیعی، مجله منابع طبیعی ایران، دوره ۶۵، ش ۲، ص ۱۹۱-۱۸۱.

۲. مظفریان، و. ۱۳۸۳. *درختان و درختچه‌های ایران*. انتشارات فرهنگ معاصر. ۹۹۱ صفحه.

3. Alscher, RG., Erturk, N. and Heath, L.S. 2002. Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. J. Exp. Bot. 53:1331-1341.
4. Arnon, D.J. 1949. Copper enzymes in isolated chloroplasts. Plant Physiol. 24: 1-15.
5. Baruah, P., Saikia, R. R., Baruah, P. P. and Deka, S. 2014. Effect of crude oil contamination on the chlorophyll content and morpho-anatomy of *Cyperus brevifolius* (Rottb.) Hassk. Environmental Science and Pollution Research. 21(21), 12530-12538.
6. Bettaieb, T., Mahmoud, M., Ruiz de Galarreta, J. I. and Jardin, P.D. 2007. Relation between the Low Temperature Stress and Catalase Activity in Gladiolus Somaclones (*Gladiolus grandilrorus* Hort.). Scientia Horticulturae. 113:49-51.
7. Candan, N. and Tarhan, L. 2003, The correlation between antioxidant enzyme activities and lipid peroxidation levels in Mentha pulegiumorgans grown in Ca^{2+}, Mg^{2+}, Cu^{2+}, Zn^{2+} and Mn^{2+} stress conditions, Plant Science, 163, 769-779.
8. Chance, B. and Maehly, A. C. 1955. [136] Assay of catalases and peroxidases. Methods in enzymology, 2: 764-775.
9. Chandra, R., Bharagava, R. N., Yadav, S. and Mohan, D. 2009. Accumulation and distribution of toxic metals in wheat (*Triticum aestivum* L.) and Indian mustard (*Brassica campestris* L.) irrigated with distillery and tannery effluents. Hazard Mater 162: 1514–1521.
10. Ciemense, S. 2001. Molecular mechanisms of plant metal tolerance and homeostasis. Planta 212: 475-480.
11. Distefano, S., Palma, J. M. and Del Rio, L. A. 1999. Proteolytic cleavage of plant proteins by peroxisomal endoproteases from senescent Pea leaves. Planta, 209: 308-313.

12. Doğanlar, Z. B. and Atmaca, M. 2011. Influence of airborne pollution on Cd, Zn, Pb, Cu, and Al accumulation and physiological parameters of plant leaves in Antakya (Turkey). Water Air Soil Pollut. 214, 509-523.
13. Eising, R. and Gerhardt, B. 1989. Catalase synthesis and turnover during peroxisome transition in the cotyledons of *Helianthus annuus L*. Plant Physiol., 89:1000-1005.
14. Filek, M., Keskinen, R., Hartikainen, H., Szarejko, I., Janiak, A., Miszalski, Z. and Golda, A. 2008. The protective role of selenium in rape seedlings subjected to cadmium stress. Journal of Plant Physiology, 165 (8), 833–844.
15. Ghorbanli, M. and Kiapour, A. 2012. Copper-induced changes on pigments and activity of non-enzimatic and enzymatic defence systems in Portulaca oleraceaL. Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants, Vol. 28, No. 2, 235-247.
16. Giannopolitis, C. N. and Ries, S. K. 1977. Superoxide Dismutases. II. Purification And Quantitative Relationship With Water-Soluble Protein In Seedlings. Plant Physiol. 59, 315-318.
17. Gratão, P. L., Polle, A., Lea, P.J. and Azevedo, R. A. 2005. Making the life of heavy metal-stress plants a little easier. Functional Plant Biology 32: 481–494.
18. Groppa, M. D., Tomaro, M. L. and Benavides M. P. 2001 .“Polyamines as protector against cadmium or copper-induced oxidative damage in sunflower leaf discs,” Plant Sci., vol. 161, pp. 481-488.
19. Hattab, S., Dridi, B., Chouba, L., Ben Kheder, M. and Bousetta, H. 2009. Photosynthesis and growth responses of pea *Pisum sativum L*. Under heavy metals stress. Journal of Environmental Sciences 21. 1552–1556.
20. Hojati, M., Modarres-Sanavy, A. M. M., Karimi, M. and Ghanati, F. 2011. Responses of growth and antioxidant systems in Carthamus tinctorius L. under water deficit stress. Acta Physiologia Plantarum 33: 105-112.
21. Hou, W., Chen, X., Song, G., Wang, Q. and Chang, C.C. 2007. Effects of copper and cadmium on heavy metal polluted waterbody restoration by duckweed (*Lemna minor*). Plant Physiol Biochem 45: 62-69.
22. Jiang, Y. and Huang, B. 2001. Drought and heat stress injury of two cool-season turfgrasses in relation to antioxidant metabolism and lipid peroxidation. Crop Sci. 41: 436-442.
23. Karimi, N., Khanahmadi, M. and Moradi, B. 2013. The effects of lead on some physiological parameters of Artichoke. J. of Plant Production, Vol. 20 (1). 49-62.
24. Laspina, N. V., Groppa, M. D., Tomaro, M. L. and Benavides, M. P. 2005. Nitric oxide protects sunflower leaves against Cd-induced oxidative stress. Plant Science, 169(2), 323-330.
25. Luna, C.M., Gonzalez, C.A. and Trippi, V.S. 1994. Oxidative damage caused by an excess of copper in oat leaves. Plant and Cell Physiology, 35(1): 11-15.
26. Mazhoudi, S., Chaoui, A., Ghorbal, M. H. and ElFerjani, E. 1997. Response of antioxidant enzymes to excess copper in tomato (*Lycopersicon esculentum Mill*.). Plant Science, 127(2): 129-137.
27. McGee, C. J., Fernandez, I. J., Norton, S.A. and Stubbs, C. 2006. Cd, Ni, Pb, and Zn concentration in forest vegetation and soils in Maine. Water Air Soi Pollut 180, 141-153.
28. McGrath, S. P., Zhao, J., & Lombi, E. 2002. Phytoremediation of metals, metalloids, and radionuclides. Advances in Agronomy, 75, 1-56.
29. Mohan, A. S. and Hosetti, B. G. B. 1997. Potential phytotoxicity of lead and cadmium to *Lemna minor* growth in sewage stabilization ponds. Environ. Pollut., 98: 233–238.
30. Morsy, A. A., Salama, K. H. A., Kamel, H. A. and Mansour, M. M. F. 2012. Effect of heavy metals on plasma membrane lipids and antioxidant enzymes of Zygophyllum species. EurAsian Journal of BioSciences Eurasia J Biosci 6, 1-10. DOI:10.5053/ejobios.2012.6.0.1
31. Nazari, M. R., Habibpour Mehraban, F., Maali Amiri, R. and Zeinali Khaneghah, H. 2012. Change in antioxidant responses against oxidative damage in black chickpea following cold acclimation. Russ J Plant Physiol. 59:183-89.
32. Ouzounidou, G., Moustakas, M. and Eleftheriou E.P. 1997. Physiological and ultrastructural effects of cadmium on wheat (*Triticum aestivum* L.) leaves. Arch. Environ. Contam. Toxicol., 32: 154–160.
33. Palma, J. M., Gómez, M., Yáñez, J. and del Río, L. A. 1987. Increased levels of peroxisomal active oxygenrelated enzymes in coppertolerant pea plants. Plant Physiology, 85(2): 570-574.
34. Pivetz, B. E. 2001. Ground water issue: phytoremediation of contaminated soil and ground water at hazardous waste sites. National Risk Management Research.
35. Pulford, I. D. and Watson, C. 2003. Phytoremediation of heavy metal-contaminated land by trees—a review. Environment international, 29(4), 529-540.
36. Qadir, S., Qureshi, M.I., Javed, S. and Abdin, M. Z. 2004. Genotypic variation in phytoremediation potential of Brassica junceacultivars exposed to Cd stress. Plant Science, 167(5): 1171-1181.

37. Qin X., Sun N., Ma L., Chang Y. and Mu L. 2014. Anatomical and physiological responses of Colorado blue spruce to vehicle exhausts. ESPR. 2014: 21, 11094-11098.
38. Robinson, B. H., Mills, T. M., Petit, D., Fung, L. E., Green, S. R. and Clothier, B. E. 2000. Natural and induced cadmium-accumulation in poplar and willow: Implications for phytoremediation. Plant and Soil, 227(1-2), 301-306.
39. Rout, G. R., Samantaray, S. and Das, P. 2001. Aluminum toxicity in plants: a review. Agronomie 21: 3–21.
40. Schützendübel, A. and Polle, A. 2002. Plant responses to abiotic stresses: Heavy metal-induced oxidative stress and protection by mycorrhization. Journal of experimental botany, Vol. 52, No.372, Antioxidants and Reactive Oxygen Species In Plants Special Issue, pp. 1351-1365.
41. Sharma, P. and Dubey, R. S. H. 2005. Lead toxicity in Plants. Plant Physiol. 17: 35–52.
42. Sinha, j. and Sharivastava, S. 2012. Pot experiment study showed the effect of Pb and Cd in Brassica juncea L. by Chlorophyll and Ascorbic acid content estimation. Journal of Current Pharmaceutical Research; 9 (1): 33-36.
43. Stroinski, A. and Kozlowska, M. 1997. Cadmium induced oxidative stress in potato tuber. Acta Soc Bot Pol 66: 189 – 195.
44. Tewari, R. K., Kumar, P., Sharma, P. N. and Bisht S. S. 2002. Modulation of oxidative stress responsive enzymes by excess cobalt. Plant Sci 162: 381–388.
45. Uddin, I., Bano, A. and Masood, S: Chromium toxicity tolerance of *Solanum nigrum* L. and *Parthenium hysterophorus* L. plants with reference to ion pattern, antioxidation activity and root exudation. Ecotoxicology and environmental safety. 2015: 113, 271-278.
46. Vajpayee, P., Tripati, R. D., Rai. U. N., Ali, M. B. and Singh, S. N. 2000. Chromium accumulation reduced chlorophyll biosynthesis, nitrate reductase activity and protein content of Nymphaeae alba. Chemosphere. 41: 1075-1082.
47. Velikova, V., Yordanov, I. and Edreva, A. 2000. Oxidative stress and some antioxidant systems in acid rain-treated bean plants: protective role of exogenous polyamines. *Plant science*, *151*(1), 59-66.
48. Vitoria A. P., Cunha M. Da. and Azevedo R. A. 2005: Ultra structural changes ofRadish leaf exposed to cadmium. Environ. Exp. Bot.58,47-52.
49. Woo, S. Y., Lee, D. K. and Lee, Y. K. 2007. Net photosynthetic rate, ascorbate peroxidase and glutathione reductase activities of *Erythrina orientalis* in polluted and non-polluted areas. Photosynthetica. 45(2), 293-295.
50. Zembala, M., Filek, M., Walas, S., Mrowiec, H., Korna, A., Miszalski, Z. and Hartikainen, H. 2010. Effect of selenium on macro- and microelement distribution and physiological parameters of rape and wheat seedlings exposed to cadmium stress. Plant and Soil 329 (1–2), 457–468
51. Zhang, F., Wang, Y., Lou, Z. and Dong, J. 2007. Effect of heavy metal stress on antioxidative enzymes and lipid peroxidation in leaves and roots of two mangrove plant seedlings (Kandelia candel and Bruguiera gymnorrhiza). Chemosphere 67:44-50.